

ЛЕКЦ, ТОЙМ, ЗӨВЛӨГӨӨ

Ураг орчмын шингэн дэх эсийн бүлэг

(Тойм өгүүлэл)

Ганзүг Ж.¹, Оюунчимэг Ө.²

¹Анагаахын шинжлэх ухааны үндэсний их сургууль, Био-анагаахын сургууль

E-mail: ganzugjugder@gmail.com

² Эх, хүүхдийн эрүүл мэндийн үндэсний төв

E-mail: Ouyunchimeg Unshigbayar nbdp@gmail.com

Түлхүүр үг: Ураг орчмын шингэн, Ураг орчмын шингэний эс, Ураг орчмын шингэн дэх үүдэл эсүүд, Ураг орчмын шингэн дэх мезенхимийн үүдэл эс

Abstract

Cell Population Human Amniotic Fluid

Ganzug Jugder¹, Oyunchimeg Unshigbayar²

¹Mongolian National University of Medical Sciences, Mongolia, School of Biomedicine

²National Center for Maternal and Child Health, Mongolia

Amniotic fluid (AF) holds many important roles in the development of the fetus such as supporting fetal growth as well as protecting it from distress or infection. The fluid can also function as a vital source of fetal cells to be used in prenatal assessment of the fetus. Should it not be used or requested to be used by the patient, it will be discarded. There are numerous reports in the literature on the various cells present in amniotic fluid; as the population of cells is heterogeneous with a diverse range of cells, to include differentiated and undifferentiated cells.

Although AF cells were reported to have limited proliferative capacity and are terminally differentiated cells, telomerase activity was detected in both cultured and uncultured human AF cells from 14 weeks' gestation, suggesting that cells with high proliferative capacity exist in AF. Populations of stem cells in AF are based on their potency, either multipotent or pluripotent. There are 2 types of multipotent AF cells discovered; the amniotic fluid c-Kit+, Lin- (AFKL) cells and amniotic fluid mesenchymal stem cells (AF-MSCs). AFKL are multipotent AF cells having multilineage hematopoietic potential in vitro and express CD4. Furthermore, expression of Oct4 (critical marker for pluripotency) was also discovered, indicating the presence of a pluripotent subpopulation of cells in AF-stem cells. Most importantly, the discovery of stem cells in AF, specifically Amniotic Fluid Stem Cells (AFSC), has elevated the potential of AF as AFSC signify a novel class of pluripotent stem cells with intermediate characteristics of ES cells and adult stem cells.

AFSC are easy to maintain in the laboratory, the proliferation and differentiation of AFSC is both safer and more ethical to use in clinical applications as they are non-tumorigenic and relatively accessible, being acquired using a minimally invasive procedure. Furthermore, AFSC would be an ideal candidate for autologous transplantation as they lack the MHC Class II antigen and are therefore non-immunogenic. These advantages present an interesting application for AFSC in future in vitro and in vivo studies.

In this review, we have summarized some of the important aspects of AF and AFSC and provided an update on those cells present in AF, together with its future potential for prenatal assessment. Consequently, amniotic fluid represents a very valuable tool that has the potential to save lives and reduce human suffering, particularly through regenerative medicine.

Keywords: Amniotic fluid, Amniotic fluid cells, Amniotic fluid stem cells, Amniotic fluid mesenchymal cells

Pp. 65-70, References 55

Оршил

Ураг орчмын шингэн (УОШ) нь эхийн хэвлий дэхь ургийг гадны механик гэмтэл болон үрэвслээс хамгаалах, эхийн хэвлийн дулааныг хэвийн хэмжээнд хадгалах, ургийн булчин, ясны хөгжлийг дэмжиж чөлөөтэй хөдлөх орчин, урагт хүчилтөрөгчийг хүргэж байдаг хүйн холбоосыг шахалт даралтаас хамгаалах, хоол боловсруулах эрхтэн системийн хөгжлийг дэмжих чухал үүргийг гүйцэтгэдэг.^{1,2} УОШ нь ургийн 2 дахь долоо хоногос эхэлж ургийн уушиг болон давсагны шингэний урсгалын үр дүнгээс эхэлдэг бөгөөд энэ нь үр хөврөлийн 8 болон 10 дахь өдрийн дараагаар аажмаар нэмэгдэн нийлэгждэг⁴ тунгалаг сүрлэн шаргал өнгөтэй шингэн юм.³

УОШ-н ихэнх хувийг 98-99% ус, 1-2%-ийг хатуу бодис уураг, глюкоз, энзим, даавар, давс, амин нэгдлүүд мөн ургийн амьдралын ажиллагааны бүтээгдэхүүнүүд агуулагдана^{4,5}.

Клиникт УОШ нь ургийн эсийн эх сурвалж болох бөгөөд ургийн генетикийн шинжилгээ, жирэмсний тээлтийн хугацаанд ургийн хүйсийг тодорхойлноб.

1919 онд Henkel M., полигидроаммионтой өвчтөнд эмчилгээний зорилгоор амниоцентез хийн⁷, 1966 онд Steele MW, Breg WR нар УОШ-ээс эс өсгөвөрлөн ургийн хромосомын бүрдлийг тодорхойлсон байна⁸. 1970-иад оны эхэн үеэс олон улс орон пренатал оношилгооны инвазив аргыг нэвтрүүлэх зорилгоор УОШ-ны материалд цитогенетикийн шинжилгээ хийдэг болсон нь жирэмсний тээлтийн эхний саруудад хромосомын болон удамшлын эмгэгийн оношилгооны практикт нэвтэрч дэлхий дахинаа ихээхэн туршлага хуримтлуулжээ⁹. Эхэн үедээ энэ ажилбараас зарим улс орон татгалздаг байв. Учир нь жирэмсний тээлтийн 15-22 долоо хоногт хэт авиан хяналтан дор хэвлийн гаднаас хатган дээж авах энэ ажилбарын үед цус алдалт, халдвар, зулбалт зэрэг хүндрэлүүд тохиолддог. Тухайлбал амниоцентезын ажилбарын үед бага зэргийн цус гоожилт 10%, жирэмсэн эмэгтэйн умай агших 0.5-1.0%-д, зулбалт 1-2%-д тохиолддог байна^{6,9,10,11}

Өнөө цагт олон орны судлаачид УОШ дэх ургийн эсүүдийн олон төрлийг олж илрүүлсэн нь ураг орчмын

шингэнийг илүү сонирхолтой судалгааны материал болгоход хүргэжээ.

Ураг орчмын шингэн дэх эсийн бүлэг

УОШ-нд олон төрлийн ялгараагүй, ялгарсан болон бие гүйцсэн эсүүд байх бөгөөд хөврөл (эктодерм, мезодерм, эндодерм), ургийн эсүүд нь олон төрлийн эсийн бүлгийг үүсгэдэг.^{3,5,12}

Жирэмсний тээлтийн хугацаа нэмэгдэх тусам УОШ-ний эсүүд олшрохын зэрэгцээ амьдрах чадвартай эсүүд багасна.^{13,14,15} Харин жирэмсний үед эм ураг тээж буй тохиолдолд УОШ-нд олон төрлийн эс байдаг болохыг судалжээ. Учир нь үтрээний эсүүд УОШ-нд орсон болохыг тогтоожээ.^{5,16,17}

Ураг орчмын шингэний эсүүдийг морфологи бүтцээр нь 3 хэв шинж болгон ангилдаг.¹⁸

1. Ураг орчмын шингэний эс (УОШЭ)
2. Эпителиод эс (ЭЭ)
3. Фибробласт эс (ФЭ)

Зохиолоос уншихад УОШ-ний голлох эсийн талаар судлаачид янз бүрийн саналыг дэвшүүлсэн байна. Олонх судлаачдынхаар 60-70%-д УОШЭ-үүд давамгайлдаг бол 20-30% нь ЭЭ-үүд, 10%-ийг ФЭ эзэлдэг гэжээ.^{19, 20,21}

Зарим судалгаанд УОШ-нд ЭЭ-үүд давамгайлан ФЭ цөөвтөр байдаг гэж тэмдэглэжээ.^{3,4,22} ФЭ нь эпители болон эндотели үүсэх боломжтой, хурдан үржих чадвартай эс юм.^{20,23,24}

УОШЭ нь ургийн хальс болон ихсийн трофобластаас, ЭЭ ургийн хальс, шээсний замаас, ФЭ ургийн арьсны фибробласт болон холбох эдээс тус тус үүснэ.^{5,25,26} Жирэмсний эрт үед мезодерм болон эндодермийн эсүүд давамгайлдаг бол жирэмсний хожуу үед эктодермийн эсүүд илүүтэй байдаг байна.^{27,28,29} 2010 оны судалгаанд УОШ-ний ихэнх нь ургийн шээснээс тогтдог учраас УОШ дотор ургийн бөөрний үүдэл эсүүд бас голлох ёстой гэжээ. УОШ-нд жирэмсний тээлтийн 17 долоо хоногийн төгсгөлөөр бөөрний маркер ихэсдэг байна.^{13, 30}

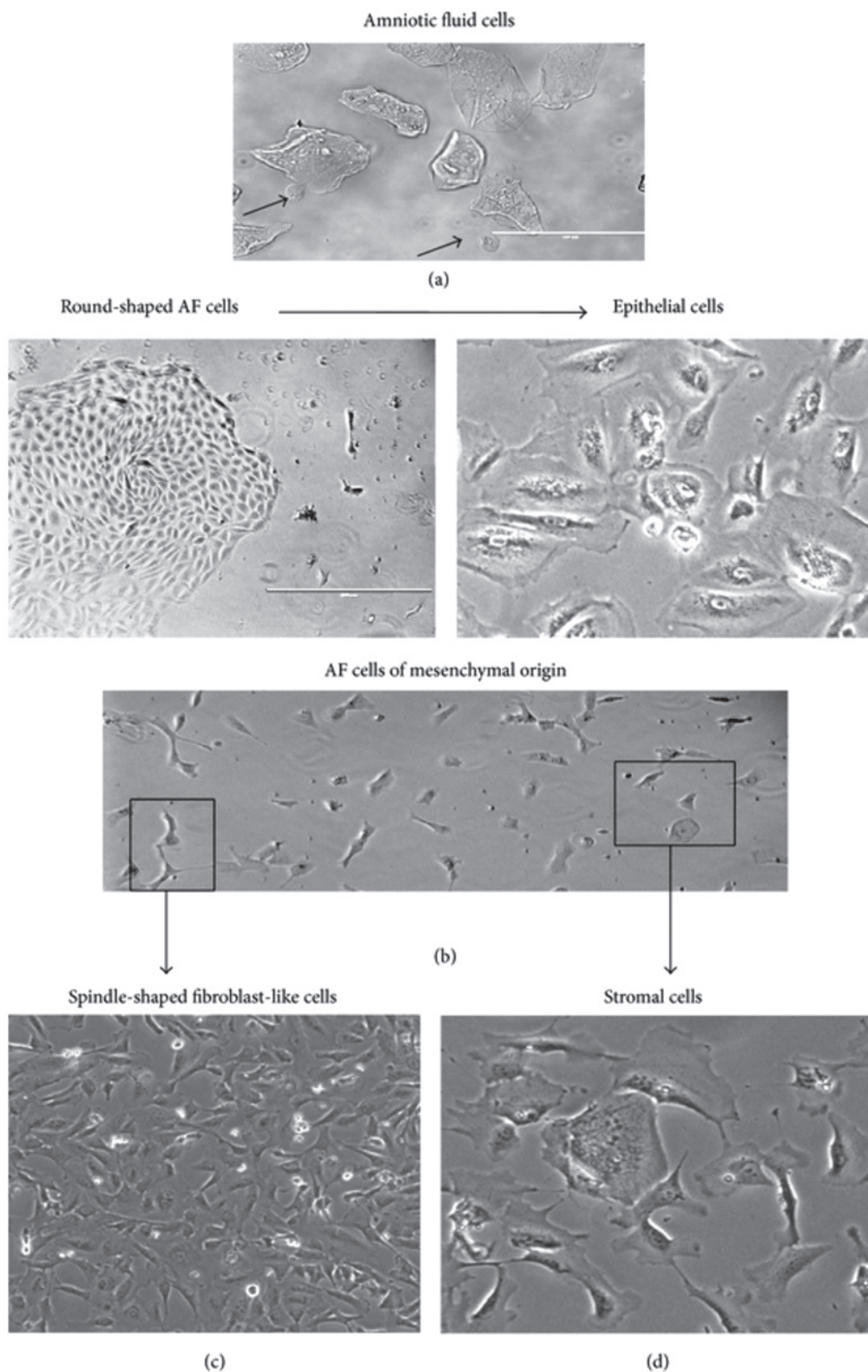


Figure 1. Morphological characteristics of AF cells. (a) Amniotic fluid cells from amniocentesis sample. (b) The colony appearance of epithelial type at 10–15 days after initiation of the primary culture and the expansion of epithelial cell population at passage 3. (c, d) Mesenchymal-type cells in the primary culture at 10–15 days and after culturing to elongated spindle-shaped or flat “stromal” cell populations at passage 3. (Copyright Jurate Savickiene et al55. Hindawi Publishing Corporation Stem Cells International Volume 2015, Article ID 319238, 15 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2015/319238>)

УОШ дэх үүдэл эсүүд

УОШ дотор байгаа эсүүд нь үржлийн хязгаарлагдмал чадвартай бөгөөд эцэслэн ялгарсан эсүүд байдаг.^{31,32}

Учир нь: Жирэмсний тээлтийн¹⁴ долоо хоногоос эхлэн УОШ-ний өсгөвөрлөсөн болон өсгөвөрлөөгүй эсүүдэд теломеразын фермент идэвхждэг.³³ Түүнээс гадна Oct4 плюрипотент маркер илэрдэг бөгөөд энэхүү эс нь олон эс болон хувирч чадах онцгой чадамжтай юм.

Oct4 маркер илэрсэн эсүүдээс олон эсийн дэд бүлэг эсүүд үүсч болно.³⁴ Цаашид УОШ-нд байгаа үүдэл эсийн бүлгүүд бол олон чадамжтай болохыг тогтоожээ.^{35,36,37} Үүнд:

1. Ураг орчмын шингэний c-Kit+ , Lin- эс (УОШКЛЭ)
2. Ураг орчмын шингэний мезенхимийн үүдэл эс (УОШМУЭ) хоёр хэвшинжийн плюрипотент эсийг судлан тогтоосон байна.

УОШКЛЭ нь олон шугамын үүдэл эсийг үүсгэх чадамжтай эсийн гадаргуу дээр CD45+ маркер илэрхийлдэг.³⁸ Харин УОШМУЭ нь мезенхимийн шугамын эс болон хөгждөг мультипотент эс юм.³⁶ УОШ-нд их хэмжээгээр агуулагдах өвөрмөц эс бөгөөд 100% өсгөвөрлөгдөх чадвартай. Жирэмсний дунд болон бүрэн хугацаат жирэмсний турш өсгөвөрлөж болно.^{39,40} Өсгөвөрлөхдөө ийлдсээр баялаг орчинд тарихаас гадна доошлуулах давхаргагүйгээр мөн түүнчлэн амьтны ийлдэсгүй орчинд ургуулж болно.⁴¹

УОШ-ний c-Kit+, Lin- эс нь фибробласт төст ээрүүл хэлбэрийн морфологи бүтэцтэй үржлийн өндөр чадамжтай.^{42,43} Нөгөө талаас ураг орчмын шингэний үүдэл эс (УОШУЭ)-үүдийн өвөрмөц бүлэг эсүүд нь УОШ-нд зөвхөн 1%-ийг эзлэх ба жирэмсний хоёрдахь 3 сард дархлаа сонголтын аргаар ялган авч болно. Дархлаа сонголтын арга c-kit илэрхийлэл нь үүдэл эсийн хүчин зүйлийн рецептор бөгөөд энэ нь эмбриогенез, карциногенез, гематогенезийн үед үүсдэг.^{13,35}

УОШМУЭ-ийн үүнтэй адилгүй нэг шинж нь жирэмсний 2 дахь 3 сард илэрч 19-20 долоо хоногт аажмаар багасдаг.^{15,30,38}

УОШУЭ-үүд нь фибробласт төст эсийн хольц бөгөөд зууван, бөөрөнхий морфологитой. УОШУЭ-үүд нь эхэн шатанд сул (аажим) үржиж байгаад өсгөвөр хийсэн талбайд 7 хоногийн дараа наалдаад 36 цагийн дараагаар хурдан үржиж эхэлнэ. УОШУЭ-үүд нь клон үүсгэх чадвар сайтай, өөрийгөө шинэчлэх, хромосомын теломерын уртыг алдахгүйгээр 250 дахин хуваагдах чадвартай.^{35,44}

УОШУЭ нь хавдрын эс болж хувирахгүй мөн дархлааны чадамжтай болохыг хулгана дээр хийсэн туршилт судалгаагаар. УОШУЭ-үүдийн өвөрмөц бүлэг эсүүд болох фибробласт эс (SSEA-4), мезенхимийн үүдэл эсийн гадаргуу дээр (CD90, CD73, CD105) маркерууд мөн адгезив молекулууд (CD29, CD44) болон антиген

илчлэгч МНС I (major histocompatibility complex I) ангийн молекул зэрэг генийн илтгэгч маркер уураг агуулдаг болохыг нотолжээ.^{35,51,54}

Үүнийг түлхүүр Oct4, Sox, Nanog молекулаар тодорхойлон УОШУЭ-үүд плюрипотент үүдэл эс болохыг баталжээ.^{15,34} УОШ дэхь Oct4 эерэг эсүүд нь клон үүсгэхдээ сайн, маш идэвхтэй хуваагддаг, эсийн үржлийн циклин А маркерыг илэрхийлдэг.⁴⁵

УОШУЭ нь хөврөлийн үүдэл эс (ХҮЭ)-ийн нэгэн адилаар хөврөлийн 3 хальсан дахь эд, эрхтэнг үүсгэх чадвартай. Гол ач холбогдол нь хавдрын эс болон хувирах чадваргүй учраас туршилт судалгаанд биоанагаахын ёс зүйн өндөр ач холбогдолтой болохыг тогтоожээ.^{35,36,37}

УОШ-ний эсүүдийн биологийн ач холбогдол

- УОШ-ний ялгарсан болон боловсорсон эсүүд нь эдийн инженерчлэлийн онцгой эх үүсвэр юм.⁴³
- Бөөр шилжүүлэн суулгахад ашиглаж болно.³⁰
- УОШУЭ-үүд нь хөврөлийн эсийн завсрын шинж чанарыг агуулсан байна.^{31,46} Өөрөөр хэлбэл УОШУЭ нь хөврөлийн эс (ХЭ)-ээс ялгаатай.
- Эмнэл зүйн практик, туршилтанд ашиглахад биоанагаахын ёс зүйн хувьд зөрчил гаргахгүй. Ураг болон эхэд сөрөг нөлөөгүй.^{35, 39,47}
- УОШУЭ-ийг цаашид эдийн нөхөн төлжилд ашиглах боломжтой.
- Генийн илтгэгч маркер уураг агуулдаг. Үүнийг дархан туяарлын аргаар илэрхийлдэг.^{13,48}
- УОШУЭ-үүд нь үр дүнтэй программчлагдах боломжтой. Өвчин, өвөрмөц үүдэл эсүүдийг буй болгоход ашиглаж болно.⁴⁹ УОШУЭ-үүд нь бөөр, мөгөөрс, уушги, ясны гэх мэт алга болсон эсүүдийг нөхөх боломжтой учраас нөхөн төлжих анагаах ухаанд ач холбогдолтой.^{48,50,51}
- УОШУЭ нь хурдан үржих чадвартай, сайн ялгараагүй эс учраас ген эмчилгээнд ашиглах боломжтой.^{52,53,54}

References

1. Beall MH, Van Den Wingaard JP, Van Gemert MJ Ross MG. Regulation of amniotic fluid volume. Placenta, 2007, 28: 824-832.
2. Defoort P. Amniotic fluid volume. Int Congr Ser, 2005, 1279: 290-294.
3. Bossolasco P., Montemurro T., Cova L., Zangrossi S, Calzarossa C, Buiatitot S, Soligo D, Bosari S, Silani V, Lambertenghi D, Rebulla P, Lazzari L. Molecular and phenotypic characterization of human amniotic fluid cells and their differentiation potential. Cell Res, 2006, 16:329-336.
4. Chitham RG, Quayle SJ, Hill L. The selection of a

- method for the culture of cells from amniotic fluid. *Tech Met*, 1973, 721-723.
5. Gosden CM. Amniotic fluid cell types and culture. *Br Med Bull*, 1983, 39(4), 348-354.
 6. Chadefaux-Vekemans B, Rabier D, Cadoudal N, Lescoat A, Chabli A, Aupetit J. Prenatal diagnosis of some metabolic diseases using early amniotic fluid samples: report of a 15 years' experience. *Prenatal Diagn*, 2006, 26:814-818.
 7. Henkel M. Akuttes hydramnion, leberkompression, enges becken, Punktion des hydramnion. *Zentralbl. Gynaekol*, 1919, 43:841
 8. Steele MW, Breg WR. Chromosome analysis of human amniotic fluid cells. *Lancet*, 1966, 1:83
 9. Alfirevic Z, Sundberg K, Brigham S. Amniocentesis and chorionic villus sampling for prenatal diagnosis, 2003, 3:CD003252
 10. Wapner RJ. Invasive prenatal diagnostic techniques. *Am J Obstet Gynecol*, 2005, 29:401-404.[Abstract/ Pubmed]
 11. Caughey AB, Hopkins LH, Norton ME. Chorion villus sampling compared with amniocentesis and the difference in the rate of pregnancy loss. *Obstet Gynecol*, 2006, 108:612-6
 12. Messeri G, Curiel P, Caldini AL. Lipid content of amniotic fluid cells. *Clin Chim Acta*, 1980, 100(3):201-207
 13. Perin L, Sedrakyan S, Da Sacco S, De Filippo R. Characterization of human amniotic fluid stem cells and their pluripotential capability. *Methods in Cell Biology*, Vol. 86, Stem Cell Culture. USA: Academic Press, 2008: 85-99
 14. Hengstschlager M. Stem cells in amniotic fluid – what are the next step to do? *J Reproduktions Med Endokrinol*, 2005; 2(4):233-238
 15. Bai J, Wang Y, Liu L, Chen J, Yang W, Gao L, Wang Y. Human amniotic fluid derived c-kit+ and c-kit- stem cells: growth characteristics and some differentiation potential capacities comparison. *Cytotech*, 2012
 16. Lam YH, Tang MHY, Sin SY, Ghosh A. Clinical significance of amniotic fluid cell culture failure. *Prenat Diagn*. 1998; 18:343-347
 17. Reid R, Sepulveda W, Kyle PM, Davies G. Amniotic fluid culture failure: clinical significance and association with aneuploidy. *Obstet Gynecol*, 1996; 87:588-592.
 18. Hoehn H, Bryant EM, Karp LE. Cultivated cells from diagnostic amniocentesis in second trimester pregnancies II. Cytogenetic parameters as functions of clonal type and preparative technique. *Clin Genet*, 1975; 7:29-36
 19. Porreco RP, Bradshaw C, Sarkar S, Jones W. Enhanced growth of amniotic fluid cells in presence of fibroblast growth factor. *Obstet Gynecol*, 1980, 55(1):55-59.
 20. 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
 21. Chen WW. Studies on the origin of human amniotic fluid cells by immunofluorescent staining of keratin filaments. *J Med Genet*, 1982, 19:433-436.
 22. Virtanen I, Von Koskull H, Lehto V-P, Vartio T, Aula P. Cultured human amniotic fluid cells characterized with antibodies against intermediate filaments in indirect immunofluorescence microscopy. *J Clin Invest*, 1981, 68:1348-1355
 23. Sutherland GR, Bauld R, Bain AD. Observations on human amniotic fluid cell strains in serial culture. *J Med Genet*, 1974, 11:190-195
 24. Nelson MM. Amniotic fluid cell culture and chromosome studies. *Antenatal Diagnosis of Genetic Disease*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1973, 69-81
 25. Prusa AR, Hengstschlager M. Amniotic fluid cells and human stem cell research: a new connection. *Med SciMonit*, 2002, 8:253-257
 26. Hoehn H, Salk D. Morphological and biochemical heterogeneity of amniotic fluid cells in culture. *Methods Cell Biol*, 1982, 26:11-34
 27. Okawa H, Okuda O, Arai H, Sakuragawa N, Sato K. Amniotic epithelial cells transform into neuron-like cells in the ischemic brain. *Neuro report*. 2001; 12:4003-4007
 28. Ishii T, Ohsugi K, Nakamura S. Gene expression of oligodendrocyte markers in human amniotic epithelial cells using neural cell-type-specific expression system. *NeurosciLett*. 1999; 268:131-134
 29. Sakuragawa N, Thangavel R, Mizuguchi M, Hirasawa M, Kamo I. Expression of markers for both neuronal and glial cells in human amniotic epithelial cells. *Neurosci Lett*. 1996; 209:9-12
 30. Da Sacco S, Sedrakyan S, Boldrin F, Giuliani S, Parnigotto P, Habibian R, Warburton D, De Filippo RE, Perin L. Human amniotic fluid as a potential new source of organ specific precursor cells for future regenerative medicine applications. *J Urol*, 2010, 183:1193–1200
 31. Siegel N, Rosner M, Hanneder M. Stem cells in

- amniotic fluid as new tools to study human genetic diseases. *Stem Cell Rev*, 2007, 3:256-264.
32. Gosden C, Brock DJ. Combined use of alpha-fetoprotein and amniotic fluid cell morphology in early prenatal diagnosis of fetal abnormalities. *J Med Genet*, 1978, 15:262-270
 33. Mosquera A, Fernandez JL, Campos A, Goyanes VJ, Ramiro-Diaz JR, Gosalvez J. Simultaneous decrease of telomere length and telomerase activity with ageing of human amniotic fluid cells. *J Med Genet*, 1999, 36:494-496
 34. Prusa AR, Marton E, Rosner M. Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research? *Hum Reprod*, 2003, 18: 1489-1493
 35. De Coppi P, Bartsch G Jr, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, Mostoslavsky G, Serre AC, Snyder EY, Yoo JJ, Furth ME, Sooker S, Atala A. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol*, 2007, 25:100-106
 36. 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(6):1450-1456
 37. In't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood*, 2003, 102:1548-1549
 38. Ditadi A, De Coppi P, Picone O, Gautreau L, Smati R, Six E, Bonhome D, Ezine S, Frydman R, Cavazzana-Calvo M, Andre-Schmutz I. Human and murine amniotic fluid c-Kit⁺ Lin⁻ cells display hematopoietic activity. *Blood*, 2009, 113(17):3953-3960
 39. Cananzi M, Atala A, De Coppi P. Stem cells derived from amniotic fluid: new potentials in regenerative medicine. *RBM Online*, 2009, 18(1):17-27
 40. Nadri S, Soleimani M. Comparative analysis of mesenchymal stromal cells from murine bone marrow and amniotic fluid. *Cytotherapy*, 2008, 9:729-737
 41. Kunisaki SM, Armant M, Kao GS. Tissue engineering from human mesenchymal amniocytes: a prelude to clinical trials. *J Pediatr Surg*, 2007, 42:974-979
 42. Sessarego N, Parodi A, Podesta M, Benvenuto F, Moggi M, Raviolo V, Lituania M, Kunkl A, Feriasso G, Bricarelli FD, Uccelli A, Frassoni F. Multipotent mesenchymal stromal cells from amniotic fluid: solid perspectives for clinical application. *Haematologica*, 2008, 93(3):339-346
 43. Kaviani A, Perry TE, Dzakovic A. The AF as a source of cells for fetal tissue engineering. *J Pediatr Surg*, 2001, 36:1662-1665
 44. 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
 45. Hengstschlager M, Braun K, Soucek T, Miloloza, Hengstschlager-Ottner E. Cyclin-dependent kinases at the G1- S transition of the mammalian cell cycle. *Mutat Res*, 1999, 436:1-9
 46. Bajada S, Mazakova I, Richardson JB. Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med*, 2008, 2:169-183
 47. Valli A, Rosner M, Fuchs C, Siegel N, Bishop CE, Dolznig H, Madel U, Feichtinger W, Atala A, Hengstschlager M. Embryoid body formation of human amniotic fluid stem cells depends on mTOR. *Oncogene*, 2009, 29(7):966-977
 48. Siddiqui MM, Atala A. Amniotic fluid-derived pluripotent cells. *Handbook of stem cells*. USA: Elsevier Academic Press, 2004, 175-179
 49. Li Y, Lin CS, Wang L, Liu Y, Mu XN, Ma Y, Li LS. Maintenance of human embryonic stem cells on gelatin. *Chinese Sci Bull*, 2009, 54:4214-4220
 50. Trounson A. A fluid means of stem cell generation. *Nature*, 2007, 25(1): 62-63
 51. Carraro G, Perin L, Sedrakyan S, Giuliani S, Tiozzo C, Lee J, Turcatel G, De Langhe SP, Driscoll B, Bellusci S, Minoo P, Atala A, De Filippo RE, Warburton D. Human amniotic fluid stem cells can integrate and differentiate into epithelial lung lineages. *Stem Cells*, 2008, 26 (11):2902-2911
 52. Perin L, Giuliani S, Jin D. Renal differentiation of AF stem cells. *Cell Prolif*, 2007, 40:936-948.
 53. Fauza D. Amniotic fluid and placental stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2004, 18(6):877-891
 54. Peister A, Porter BD, Kolambkar YM, Huttmacher DW, Guldberg RE. Osteogenic differentiation of amniotic fluid stem cells. *Biomed Mater Eng*, 2008, 18(4-5):241-246
 55. Jurate Savickiene, Grazina Treigyte, Sandra Baronaite, Giedre Valiulienė, Algirdas Kaupinis, Mindaugas Valius, Audrone Arlauskienė, Ruta Navakauskienė. Human Amniotic Fluid Mesenchymal Stem Cells from Second and Third-Trimester Amniocentesis: Differentiation Potential, Molecular Signature, and Proteome Analysis *Stem Cells International* Volume 2015, Article ID 319238, 15 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2015/319238>