

УДК 576.5

Характеристика фенотипа клеток из амниотической жидкости человека

Д.А. Давыдова^{1,*}, Е.А. Воротеляк¹, Ю.А. Смирнова¹, Р.Д. Зиновьева¹, Ю.А. Романов², Н.В. Кабаева², В.В. Терских¹, А.В. Васильев¹

¹ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 26

² ФГУ Российский Кардиологический Научно-производственный комплекс, 121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, 15а

*E-mail: davydovad@gmail.com

РЕФЕРАТ Стволовые клетки, обладающие высоким пролиферативным потенциалом и способные к дифференцировке в различных направлениях, являются важным источником клеток для регенеративной медицины. В последнее время большое внимание уделяется фетальным стволовым клеткам, к которым относятся и клетки из амниотической жидкости (АЖ). Мы получили культуры амниотических стволовых клеток от трех доноров. По результатам проточной цитофлуориметрии, иммуногистохимии и ОТ-ПЦР эти клетки экспрессируют маркеры мезенхимного (CD90, CD73, CD105, CD13, CD29, CD44, CD146), нейрального (β_3 -tubulin, Nestin, Pax6), а также эпителиального (кератин 19, p63) типов дифференцировки. Кроме того, показана экспрессия в этих клетках маркеров плюрипотентности – Oct4, Nanog, Rex-1. Трансплантация клеток иммунодефицитным животным не приводит к образованию тератом. Таким образом, стволовые/прогениторные клетки, выделенные из АЖ, способны к длительной пролиферации *in vitro*, и полученные данные по экспрессии маркеров позволяют предположить, что они обладают более широкими дифференцировочными потенциями, чем мезенхимные стволовые клетки, и могут быть перспективны для клеточной терапии.

Ключевые слова: амниотическая жидкость, культура клеток, маркеры эпителия, мезенхимные стволовые клетки, нейральные маркеры, стволовые клетки.

Список сокращений: АЖ – амниотическая жидкость; МСК – мезенхимные стволовые клетки; ЭСК – эмбриональные стволовые клетки.

Амниотическая жидкость уже более 70 лет используется в пренатальной диагностике различных генетических заболеваний (Баранов, Кузнецова, 2007). Она содержит гетерогенную популяцию клеток, в числе которых клетки кожи плода, его дыхательной, пищеварительной и выделительной систем, а также клетки амниотической мембраны. Большая часть этих клеток дифференцирована и обладает низким пролиферативным потенциалом (Siddiqyi, Atala, 2004; Tsai et al., 2006). В последнее время появились данные о присутствии в АЖ клеток, способных к длительной пролиферации и дифференцировке в различные типы клеток в условиях *in vitro*. На основании экспрессии в этих клетках таких маркеров, как CD73, CD90, CD105, CD44, CD29, некоторые исследо-

ватели относят их к МСК (Tsai et al., 2004; Sessarego et al., 2008). Вместе с тем в клетках из АЖ выявляются также нейральные маркеры, такие как Nestin, β_3 -tubulin, GFAP, NEFH и некоторые из маркеров ЭСК, например, SSEA-4, Oct4, Nanog (Prusa et al., 2003; Siddiqyi, Atala, 2004; Tsai et al., 2006). Показаны остеогенная, адипогенная, миогенная, нейральная дифференцировка этих клеток, а также дифференцировка в гепатоциты и эндотелиальные клетки (Tsai et al., 2004; Delo et al., 2006; Tsai et al., 2006; De Coppi et al., 2007; Perin et al., 2008; You et al., 2008; Zheng et al., 2008). Таким образом, имеющиеся данные, с одной стороны, позволяют предположить, что клетки из АЖ по своим способностям к дифференцировке занимают промежуточное положение между эмбриональными и постнатальными

стволовыми клетками, а с другой – оставляют открытым вопрос о возможности присутствия в культуре нескольких различных типов клеток, т.е. о гетерогенности популяции. Ответ на этот вопрос требует дальнейшей детализации структуры популяции, что предполагает расширение сведений о профиле экспрессии генов.

Простой и безопасный способ получения АЖ, сравнительная простота выделения и культивирования клеток, значительно более высокий, чем у постнатальных стволовых клеток, пролиферативный потенциал, низкая иммуногенность, возможность дифференцировать эти клетки в производные трех зародышевых листков, а также тот факт, что трансплантация этих клеток не приводит к образованию тератом – все это говорит о том, что АЖ может стать альтернативным источником клеток для клеточной терапии (Prusa et al., 2003; Delo et al., 2006; Trounson, 2007). Кроме того, возможность получения клеток, экспрессирующих ряд маркеров плюрипотентности, исключает этические проблемы, возникающие при исследованиях ЭСК человека.

Целью нашего исследования было изучение пролиферативного потенциала клеток из АЖ и изучение экспрессии ряда тканеспецифических генов и маркеров стволовых клеток.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Культивирование клеток из АЖ. Образцы АЖ (10 мл) от трех доноров были любезно предоставлены клиникой акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирёва, ММА им. И.М. Сеченова. Забор осуществляли в ходе амниоцентеза, проведенного на 16–20-й нед беременности для кариотипирования плода. Клетки выделяли центрифугированием (10 мин, 1100 об/мин) и культивировали в среде α -MEM (Gibco, США) с добавлением 15 % ES-FBS (HyClone, США), 1 % глутамина (Invitrogen, США), 18 % Chang В и 2 % Chang С (Irvine Scientific, США), 1 % пенициллина/стрептомицина (Sigma, США) при 37 °С в атмосфере, содержащей 5% CO₂. Пассирование проводили 1:3 на 2–3-й сут, когда клетки достигали монослоя.

Проточная цитофлуориметрия. Экспрессию поверхностных антигенов клеток АЖ (7-й пассаж) оценивали на проточном цитофлуориметре (Becton Dickinson FACS-Calibur, США). Клетки трипсинизировали и окрашивали связанными с флуоресцеин изотиоцианатом (FITC) или фикоэритрином (PE) антителами против CD13, CD29, CD44, CD106, CD73, CD54, CD45, CD117, CD34, CD146, CD90, CD105, CD71, HLA-A,B,C, HLA-DR,DP,DQ (BD Pharmingen, США). Контролем служили FITC- или PE-связанные иммуноглобулины тех же изотипов. Для изучения экспрессии клетками кератина использовали мышинные антитела против кератина 19 (Millipore, США) со вторыми антителами Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, США). В качестве контролей использовали окраску без первых антител и изотип-контроль.

ОТ – ПЦР. Выделение тотальной РНК производилось с помощью TRI[®] Reagent (Sigma, США) согласно протоколу производителя. мРНК получали с использованием магнитных частиц («Силекс», Россия). Первая цепь кДНК синтезировалась на мРНК с помощью фермента M-MLV обратной транскриптазы («Силекс», Россия). Библио-

теки кДНК нормировали по гену домашнего хозяйства, кодирующему рибосомальный белок RPL19. Праймеры для ПЦР были сконструированы в компьютерной программе DNASTar по нуклеотидной последовательности разных экзонов. Информация о структуре исследуемых генов получена из международной базы данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI, GeneBank, США). Последовательности праймеров представлены в табл. 1. ПЦР со специфическими праймерами проводили с использованием ColoredTaq-полимеразы («Силекс», Россия) на амплификаторе Mastercycler (Eppendorf, Германия). ПЦР-фрагменты разделяли электрофоретически в 1 %-ном агарозном геле и оценивали уровень экспрессии на УФ-анализаторе гелей (@BIO RAD, США).

Иммуногистохимия. Для иммуногистохимического анализа клетки 11-го пассажа фиксировали в 4 %-ном параформальдегиде и инкубировали в течение ночи при +4 °С с антителами против CD34 (мышинные, 1:200, Millipore, США), CD105 (мышинные, 1:50; Millipore, США), CD49d (мышинные, 1:50, Millipore, США), STRO-1 (кроличьи, 1:100, R&D Systems, США), кератин 14 (мышинные 1:20, Novocastra, Германия), кератин 19 (мышинные, 1:50; Millipore, США), p63 (мышинные, 1:50; BD Pharmingen, США), β_3 -tubulin (мышинные, 1:300, Millipore, США), NF (Neurofilament) (мышинные, 1:10, ICN, США), Pax6 (мышинные, 1:100, Millipore, США). После этого клетки отмывали PBS и инкубировали со вторыми антителами Alexa Fluor 488 или Alexa Fluor 546 (Molecular Probes, США) при комнатной температуре в течение 1 ч. Ядра клеток докрасивали DAPI (VECTASHIELD mounting medium for fluorescence with DAPI, Vector Laboratories, США).

Трансплантация иммунодефицитным животным. Для изучения способности клеток АЖ формировать тератомы использовали иммунодефицитных мышей линии Nude (Питомник лабораторных животных «Пушино»). Экспериментальным животным подкожно вводили по 3x10⁶ клеток 5-го пассажа в 100 мкл бессывороточной среды α -MEM (концентрация суспензии 30x10⁶ кл/мл). Контрольным животным вводили 100 мкл суспензии клеток стромы жировой ткани человека 2-го пассажа (45x10⁶ кл/мл) (отрицательный контроль) или 100 мкл суспензии ЭСК мыши 65-го пассажа (20x10⁶ кл/мл) (положительный контроль). В каждой группе было по 3 животных. Животных выводили из эксперимента по мере формирования опухолей (положительный контроль) или через 11 нед после инъекции (экспериментальная группа и отрицательный контроль). Опухоли и органы животных (печень, почка, селезенка, сердце, легкое, семенник) подвергали гистологическому исследованию.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Культура клеток АЖ. В работе были использовали три образца АЖ от трех доноров. Культивирование проводили в 24-луночных планшетах в среде Chang по ранее описанному методу (De Coppi et al., 2007) с модификациями.

В результате центрифугирования АЖ получали гетерогенную популяцию клеток, большую часть которой представляли клетки плоского эпителия. Мелкие округлые клетки были немногочисленны. Клетки плоского эпителия не прикреплялись к пластику и после первой смены сре-

ды на 5-7-е сут элиминировались из культуры. Напротив, округлые клетки прикреплялись и формировали небольшие колонии, различающиеся по размеру и морфологии клеток (рис. 1). В большинстве колоний клетки были фибробластоподобными, однако некоторые из них были образованы из эпителиоподобных клеток. После первой смены среды фибробластоподобные клетки в колониях начинали активно пролиферировать, в то время как колонии с эпителиоподобными клетками практически не изменялись. На 4-6-е сут после первой смены среды, когда клетки достигали субконфлюэнтного слоя, проводили пассирование, после которого образования колоний не происходило. Клетки равномерно распределялись по дну лунки и в течение 2-3 сут формировали монослой. После пассирования в культуре сохранялись только фибробластоподобные клетки, эпителиоподобные клетки более не наблюдались.

По морфологическим критериям клетки АЖ делятся на 3 типа: эпителиоподобные, специфические для амниотической жидкости клетки и фибробластоподобные (Prusa, Hengstschlager, 2002; Tsai et al., 2004). Первые и вторые появляются в начале культивирования, последние позже. При этом эпителиоподобные клетки быстро исчезают, в то время как два другие типа клеток сохраняются в культуре. Многие авторы предполагают, что именно фибробластоподобные клетки и являются стволовыми, и с учетом экспрессии мезенхимных маркеров, а также спектра возможных дифференцировок этих клеток относят их к МСК. В то же время, помимо фибробластоподобных клеток, в культуре могут сохраняться специфические для АЖ клетки, продуцирующие эстрогены, прогестерон и хорионический гонадотропин. По всей видимости, они являются производными трофобласта и амниотической мембраны. Таким образом, вопрос о происхождении амниотических стволовых клеток все еще остается открытым (Prusa, Hengstschlager, 2002; Tsai et al., 2004).

Следует отметить, что мы анализировали как быстро прикрепляющиеся к пластику клетки, так и клетки с отсроченным прикреплением, поскольку первая смена среды проводилась только через 5-7 сут после начала культивирования. В литературе имеются данные относительно медленно прикрепляющихся клеток (Tsai et al., 2004) и сме-

шанной популяции, которую впоследствии подвергали селекции по экспрессии c-kit (Delo et al., 2006; De Coppi et al., 2007; Perin et al., 2008). Некоторые авторы предполагают, что c-kit положительные клетки из АЖ являются плюрипотентными. В то же время и медленно прикрепляющиеся клетки характеризуются экспрессией широкого спектра маркеров и способны к дифференцировке в различных направлениях.

Показано, что стволовые клетки, выделенные из АЖ, способны претерпевать 350 удвоений популяции, сохраняя при этом недифференцированный статус, высокий пролиферативный потенциал, клоногенность и длину теломерных участков (Siddiqi, Atala, 2004; Delo et al., 2006; Perin et al., 2008). Максимальное число пассажей может достигать 42 (Wang et al., 2008). Мы получили 3 культуры клеток от 3 доноров. К настоящему времени они прошли 20, 18 и 15 пассажей. По данным кариологического исследования, проведенного в лаборатории пренатальной диагностики, аномалий кариотипа у плодов, от которых была взята АЖ, не обнаружено.

Характеристика фенотипа по экспрессии молекулярных маркеров. По результатам проточной цитофлуориметрии клетки АЖ экспрессируют мезенхимные маркеры CD90, CD73, CD105, CD13, CD29, CD44, CD146, CD54, CD71 (слабая экспрессия) и не экспрессируют CD106, CD34, CD45 (табл. 2, рис. 2). Эти данные позволяют предположить, что в полученных культурах присутствуют фетальные МСК. Отсутствие экспрессии CD34 и CD45 по данным цитофлуориметрии и иммуногистохимии указывает на то, что в культуре отсутствуют гематопоэтические стволовые/прогениторные клетки. Эти результаты согласуются с данными других авторов, согласно которым гематопоэтические стволовые клетки в большом количестве обнаруживаются в АЖ на ранних сроках беременности (7-12 нед), куда они, по всей видимости, попадают через тонкую стенку желточного мешка, где в это время идет активный гемопоэз (Torricelli et al., 1993). К классическим срокам амниоцентеза (16-20 нед) эти клетки в АЖ уже не обнаруживаются (Siddiqi, Atala, 2004; De Coppi et al., 2007; Perin et al., 2008; Sessarego et al., 2008). Из эпителиальных маркеров с помощью проточной цитофлуориметрии и иммуногистохимии

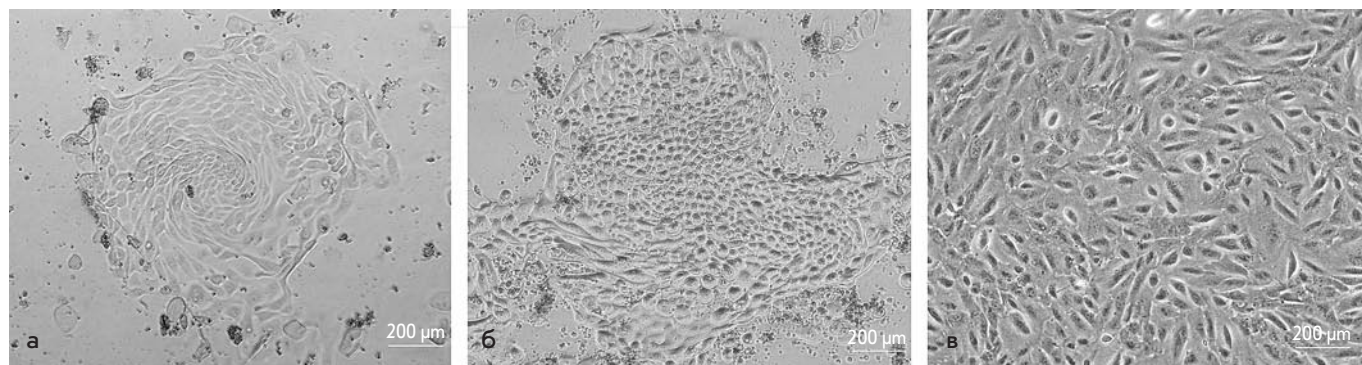


Рис. 1. Клетки АЖ в культуре: а) первичная колония фибробластоподобных клеток, появившаяся в культуре на 9-е сут; б) первичная колония эпителиоподобных клеток, появившаяся в культуре на 9-е сут; в) монослой клеток 8-го пассажа; а, б, в) светлое поле, прижизненное фото

Таблица 1. Таблица праймеров

Ген	Нуклеотидная последовательность праймера
Rpl19	5' aggtacagccaatgccca 3' 5' ccttgataaagtctgatgatc 3'
CD90	5' acctggccatcagcatcgct3' 5' gaatccgtggcctggagga 3'
β_3 -tubulin	5' cagtgccgcaaccagatcgg 3' 5' caggtcagcgttgagctggc 3'
Nestin	5' aggaggatgtaccaccagtgc 3' 5' caccaatgatgtctgccct 3'
Nucleostemin	5' gcatgacctgccataagcgg3' 5' ctgtccactctggacaatggc3'
Rax6	5' gtcataataaacagagttctc 3' 5' cgattagaaaaccatactgtat 3'
Кератин 19	5' gatcgaaggcctgaaggaag3' 5' atgctcagctgtgactgcag3'
p63	5' gagccgtgaattcaacgagg3' 5' tcgaaactgtgctttctg3'
CD117 (c-kit)	5' gtggggcagcagattaggctg3' 5' cgctttcacacttttgatcatg3'
Oct4	5' cgaccatctgccgctttgag3' 5' cccctgtccccattccta3'
Nanog	5' gtgtggatccagctgtccc 3' 5' ctgctcacaccattgctattc 3'
Rex1	5' gctggagcctgtgtgaacag3' 5' atacataaggccccacccg3'
Stella	5' gctagtgtgtgtcaagac3' 5' ggtgcaagaataagattatggc3'
Sox2	5' acagcccggaccgcgtcaag 3' 5' tctcgagctgtgatggag 3'

Таблица 2. Экспрессия маркеров в клетках из АЖ по данным проточной цитофлуориметрии

Маркер	Проточная цитофлуориметрия ^a
CD 90 (Thy-1)	83 % - 58 % - 70 %
CD 73 (SH3,SH4)	99 % - 99 % - 96 %
CD 105	85 % - 89 % - н/о
CD 13	99 % - 98 % - 87 %
CD 29 (integrin β_1)	99 % - 99 % - 99 %
CD 44	99 % - 99 % - 98 %
CD 106 (VCAM-1)	---
CD 54 (ICAM-1)	43 % - 60 % - н/о
CD 146	99 % - 98 % - 90 %
CD 71	36 % - 32 % - н/о
CD 34	---
CD 45	---
Кератин 19	92 % - 70 % - 88 %
HLA-A,B,C	95 % - 87 % - 65 %
HLA- DR,DP,DQ	---

^a – указан % положительных по исследуемому маркеру клеток для трех культур, соответственно; "----" - экспрессии маркера нет; н/о – не определяли.

был выявлен кератин 19. Из антигенов главного комплекса гистосовместимости присутствовали HLA-A,B,C и отсутствовали HLA-DR,DP,DQ, что совпадает с имеющимися данными по экспрессии этих антигенов в МСК и клетках АЖ (In 't Anker et al., 2004; Tsai et al., 2004; Sessarego et al., 2008; Zheng et al., 2008).

Иммуногистохимический анализ показал, что клетки АЖ экспрессируют не только мезенхимные маркеры, такие как CD105, STRO-1, CD49d, но и нейральные (β_3 -tubulin (нейрональный цитоскелет), NF (нейрофиламент в цитоплазме зрелых нейронов), Rax6 (транскрипционный фактор) и эпителиальные (кератин 19, транскрипционный фактор p63) маркеры (табл. 3, рис. 3). Кератин 14, являющийся маркером ороговевающего эпидермиса, в амниотических клетках не обнаружен. Следует отметить, что более 70 % клеток экспрессируют кератин 19 и одновременно с этим более 80 % экспрессируют мезенхимный маркер CD105

и более 95 % клеток – CD73. Это свидетельствует о том, что значительная часть популяции может одновременно экспрессировать два маркера – мезенхимный и эпителиальный. В дальнейшем эти данные требуют подтверждения другими методами. Ранее было показано, что клоны клеток АЖ способны к одновременной экспрессии нейральных и мезенхимных маркеров (Tsai et al., 2006). С другой стороны, имеются данные об экспрессии нейральных маркеров в МСК (Corti et al., 2003; Wislet-Gendebien et al., 2004; Bertani et al., 2005). В то же время экспрессия кератина 19 не характерна для мезенхимных клеток. Таким образом, полученные нами данные не согласуются с предположением о том, что клетки АЖ являются фетальными МСК.

Данные ОТ-ПЦР также подтвердили экспрессию клетками АЖ маркеров мезенхимного (CD90), нейрального (β_3 -tubulin, Nestin, Nucleostemin, Rax6) и эпителиального (кератин 19, p63) типов дифференцировки (рис. 4). Кроме

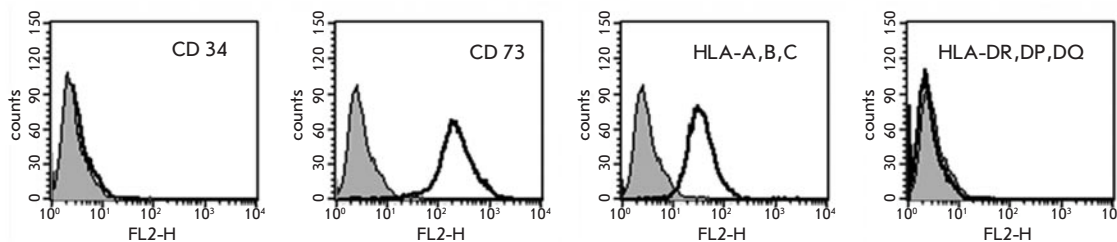


Рис. 2. Результаты анализа экспрессии CD34, CD73, HLA-A,B,C и HLA-DR,DP,DQ по данным проточной цитофлуориметрии

того, с помощью ОТ-ПЦР в этих клетках выявлены поверхностный маркер *c-kit*, гомеобоксный ген *Pitx2* и некоторые маркеры ЭСК – *Oct4*, *Nanog*, *Rex-1*. Эти результаты, а также имеющиеся в литературе данные (Siddiqi, Atala, 2004; Tsai et al., 2006; De Coppi et al., 2007), говорят о более примитивном статусе амниотических стволовых клеток в сравнении с постнатальными и широким спектре их возможных дифференцировок. В то же время экспрессии таких маркеров плюрипотентности, как *Sox2* и *Stella*, в клетках из АЖ не наблюдалось. Скорее всего, этот факт свидетельствует о более ограниченных потенциях изучаемых нами клеток в сравнении с ЭСК, и, возможно, именно это является причиной того, что при трансплантации клеток АЖ *in vivo* не происходит образования тератом.

Трансплантация клеток иммунодефицитным животным. При трансплантации культивированных клеток из АЖ человека иммунодефицитным мышам тератомы не были обнаружены даже через 11 нед, в то время как при введении ЭСК они образовывались уже через 3–4 нед. Эти результаты согласуются с имеющимися в литературе данными, согласно которым и при трансплантации *in vivo* большего числа клеток АЖ (до 8×10^6 клеток) тератомы не формируются (De Coppi et al., 2007; Trounson, 2007). Кроме того, показано, что даже через 7 мес. после внутривенного введения этих клеток у экспериментальных животных не появляются неопластические образования (Carrago et al., 2008).

При гистологическом исследовании аномалий органов у животных опытной группы выявлено не было.

Таким образом, нами были получены культуры клеток из АЖ трех доноров. Эти клетки характеризуются экспрессией широкого спектра маркеров, среди которых мезенхимные, нейральные, эпителиальные, а также маркеры плюрипотентности.

По морфологии, поведению в культуре и экспрессии большого числа маркеров мезенхимных клеток можно предположить, что АЖ является источником МСК, которые в настоящее время обнаружены во многих тканях

Таблица 3. Экспрессия маркеров в клетках из АЖ по данным иммуногистохимии

Маркер	Иммуногистохимия
CD 49d (integrin α_4)	+
CD 105	+
STRO-1	+
CD 34	-
Рах6	+
NF	+
β_3 -tubulin	+
Кератин 19	+
Кератин 14	-
p63	+

«+» – имеется экспрессия маркера;
«-» – экспрессии маркера нет.

(Campagnoli et al., 2001; Hu et al., 2003; Romanov et al., 2003). Есть сведения о том, что МСК также могут экспрессировать нейральные маркеры. С другой стороны, полученные результаты относительно экспрессии эпителиальных маркеров указывают на возможную гетерогенность полученных культур или на особый статус клеток из АЖ, о чем может свидетельствовать и экспрессия маркеров плюрипотентности. В дальнейшем мы планируем проверить эти предположения.

Имеющиеся данные об экспрессии маркеров, а также о возможных направлениях дифференцировки клеток из АЖ и отсутствие формирования тератом при трансплантации их *in vivo*, дают возможность предположить, что полученные клетки могут быть перспективны в плане

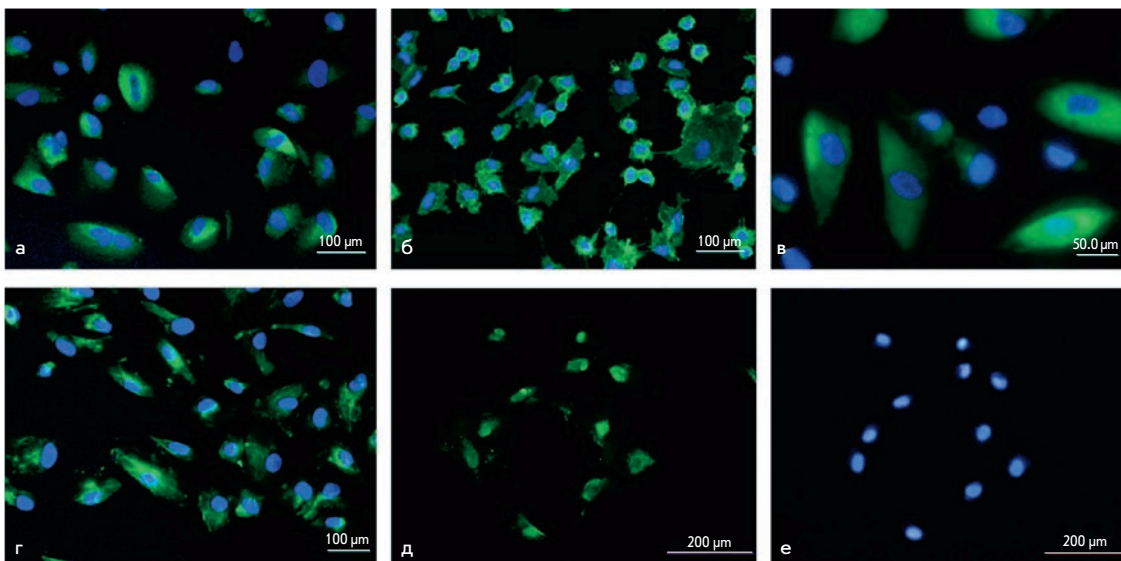


Рис. 3. Иммуногистохимический анализ экспрессии маркеров дифференцировки. Клетки АЖ окрашивали антителами против мезенхимных (а, б), нейральных (в) и эпителиальных (г, д) маркеров. Для визуализации использовали вторые антитела Alexa Fluor 488: зеленая флуоресценция свидетельствует об экспрессии (а) CD105; (б) CD49d; (в) β_3 -tubulin; (г) кератина 19; (д) p63; (е) то же, что д, ядра окрашены DAPI (голубой). а, б, в, г) совмещенные фото, ядра окрашены DAPI (голубой).



Рис. 4. Экспрессия маркеров дифференцировки и маркеров стволовых клеток по данным ОТ-ПЦР

клеточной терапии. Предполагается, что клетки АЖ могут быть полезны для восстановлений повреждений спинного мозга, лечения сахарного диабета, болезни Альцгеймера, инфаркта миокарда и др. (Hampton, 2007) При этом они могут быть использованы не только для аутологичных трансплантаций, но и из-за низкой иммуногенности этих клеток могут быть эффективно подобраны пары донор-реципиент. Кроме того, в отличие от других клеток из экстраэмбриональных тканей (клеток плаценты, амниотической мембраны, пуповинной крови), которые становятся доступны

только после родов, клетки из АЖ могут быть получены на 16–20-й нед беременности. Это открывает перспективы для лечения выявленных дефектов развития *in utero* или сразу после рождения (Marcus, Woodbury, 2008; Ye et al., 2009). ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке
Российского фонда фундаментальных исследований
(проект 09-04-12132-офи-м).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баранов В.С., Кузнецова Т.В. Цитогенетика эмбрионального развития человека. 2007. С.-Петербург, Н.-Л., 639 с.
2. Bertani N., Matatesta P., Volpi G., Sonogo P., Ferris R. Neurogenic potential of human mesenchymal stem cells revisited: analysis by immunostaining, timelapse video and microarray. 2005. Journal of Cell Science. 118: 3925-3936.
3. Campagnoli C., Roberts I.A., Kumar S., Bennett P.R., Bellantuono I., Fisk N.M. 2001. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver and bone marrow. Blood. 98: 2396-2402.
4. Carraro G., Perin L., Sedrakyan S., Giuliani S., Tiozzo C., Lee J., Turcatel G., De Langhe S.P., Driscoll B., Bellusci S., Minoo P., Atala A., De Filippo R.E., Warburton D. 2008. Human amniotic fluid stem cells can integrate and differentiate into epithelial lung lineages. Stem Cells. 26 (11): 2902-2911.
5. Corti S., Locatelli F., Strazzer S., Guglieri M., Corni G.P. 2003. Neuronal generation from somatic stem cells: current knowledge and perspectives on the treatment of acquired and degenerative central nervous system disorders. Curr. Gene Ther. 3: 247-272.
6. 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 cells with potential for therapy. Nature Biotechnology. 25 (1): 100-106.
7. Delo D.M., De Coppi P., Bartsch G., Jr, Atala A. 2006. Amniotic fluid and placental stem cells. Methods in Enzymology. 419: 426-438.
8. Hampton T. 2007. Stem cells obtained from amniotic fluid. JAMA. 297 (8): 795.
9. Hu Y., Liao L., Wang Q., Ma L., Ma G., Jiang X., Zhao R.C. 2003. Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas. J. Lab. Clin. Med. 141: 342-349.
10. In 't Anker P.S., Scherjon S.A., Kleijburg-van der Keur C., de Groot-Swings G.M.J.S., Claas F.H.J., Fibbe W.E., Kanhai H.H.H. 2004. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. Stem Cells. 22: 1338-1345.
11. Marcus A.J., Woodbury D. 2008. Fetal stem cells from extra-embryonic tissues: do not discard. J. Cell. Mol. Med. 12 (3): 730-742.
12. Perin L., Sedrakyan S., Da Sacco S., De Filippo R. 2008. Characterization of human amniotic fluid stem cells and their pluripotential capability. In: Methods in Cell Biology. Burlington, Elsevier Academic Press, 86: 85-99.
13. Prusa A-R., Hengstschlager M. 2002. Amniotic fluid cells and human stem cell research – a new connection. Med. Sci. Monit. 8 (11): 253-257.
14. Prusa A-R., Marton E., Rosner M., Bernaschek G., Hengstschlager M. 2003. Oct4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research? Human Reproduction. 18 (7): 1489-1493.
15. Romanov Y.A., Svintsitskaya V.A., Smirnov V.N. 2003. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. Stem Cells. 21: 105-110.
16. Sessarego N., Parodi A., Podestà 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 (3): 339-346.
17. Siddiqui M.M., Atala A. 2004. Amniotic fluid-derived pluripotential cells. In: Handbook of Stem Cells. Burlington, Elsevier Academic press, 2: 175-179.
18. Torricelli F., Brizzi L., Bernabei P.A., Gheri G., Di Lollo S., Nutini L., Lisi E., Di Tommaso M., Cariati E. 1993. Identification of hematopoietic progenitor cells in human amniotic fluid before the 12th week of gestation. Ital. J. Anat. Embryol. 98 (2): 119-126.
19. Trounson A. 2007. A fluid means of stem cell generation. Nature Biotechnology. 25 (1): 62-63.
20. Tsai M-S., Lee J-L., Chang Y-J., Hwang S-M. 2004. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. Human Reproduction. 19 (6): 1450-1456.
21. Tsai M-S., Hwang S-M., Tsai Y-L., Cheng F-C., Lee J-L., Chang Y-J. 2006. Clonal amniotic fluid-derived stem cells express characteristics of both mesenchymal and neural stem cells. Biology of Reproduction. 74: 545-551.
22. Wang H., Chen S., Cheng X., Dou Z., Wang H. 2008. Differentiation of human amniotic fluid stem cells into cardiomyocytes through embryonic body formation. Chinese journal of biotechnology. 24 (9): 1582-1587.
23. Wislet-Gendebien S., Bruyère F., Hans G., LePrince P., Moonen G., Rogister B. 2004. Nestin-positive mesenchymal stem cells favour the astroglial lineage in neural progenitors and stem cells by releasing active BMP4. BMC Neuroscience. 5: 33.
24. Ye L., Chang J.C., Lin C., Sun X., Yu J., Kan Y.W. 2009. Induced pluripotent stem cells offer new approach to therapy in thalassemia and sickle cell anemia and option in prenatal diagnosis in genetic diseases. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 106 (24): 9826-9830.
25. You Q., Cai L., Zheng J., Tong X., Zhang D., Zhang Y. 2008. Isolation of human mesenchymal stem cells from third-trimester amniotic fluid. Int. J. Gynecol. Obstet. 103 (2): 149-152.
26. Zheng Y.B., Gao Z.L., Xie C., Zhu H.P., Peng L., Chen J.H., Chong Y.T. 2008. Characterization of hepatogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human amniotic fluid and human bone marrow: a comparative study. Cell Biology International. 32 (11): 1439-1448.