

УДК 57.086.835+57.089.3+576.535

**ЕМБРІОНАЛЬНІ СТОВБУРОВІ КЛІТИНИ.  
ПЕРСПЕКТИВИ І ПРОБЛЕМИ ЇХ ВИКОРИСТАННЯ**

**Д. І. БІЛЬКО , С. В. МАЛИШЕВА, Г. В. БУДАШ, О. В. ЧАПЛЯ,  
Н. М. БІЛЬКО**

Центр молекулярних і клітинних досліджень Національного університету «Києво-  
Могилянська академія», м. Київ

*Використання унікальних властивостей ембріональних стовбурових клітин (ЕСК) лімітується етичними переконаннями стосовно способу їх класичного отримання. У даній статті розглянуті альтернативні способи отримання плюрипотентних стовбурових клітин, проаналізовано недоліки та переваги цих методів. Охарактеризовано плюрипотентний потенціал ЕСК та наведені основні способи їх диференціювання. У статті також висвітлені перспективи дослідження молекулярних та цитологічних змін, що характерні генетично аномальним лініям ЕСК, створеним завдяки застосуванню новітньої технології преімплантаційної генетичної діагностики.*

**Ключові слова:** *плюрипотентність, ембріональні стовбурові клітини, диференціювання, преімплантаційна генетична діагностика, молекулярна цитогенетика.*

У 1981 році двома незалежними групами дослідників було вперше виділено недиференційовані плюрипотентні лінії стовбурових клітин із бластоцисти миші; у цьому ж році вперше з'явився термін «ембріональні стовбурові клітини» [13]. Лінії ембріональних стовбурових клітин (ЕСК) людини вдалося отримати лише через 17 років, у 1998 році [23]. Рік поспіль відкриття ЕСК було визнано журналом

«Science» третьою за значимістю подією в біології після розшифрування будови молекули ДНК та програми «Геном людини».

Отримання плюрипотентних клітин людини стало новим підґрунтям експериментальної бази фундаментальних біологічних досліджень, джерелом отримання клітин і тканин для регенеративної медицини, інструментом для моделювання різноманітних патологічних станів та тестування новітніх лікарських препаратів і терапевтичних підходів у системі *in vitro*. Наукові дослідження в напрямку вдосконалення методів отримання і культивування ЕСК, розробка ефективних та безпечних протоколів спрямованого диференціювання плюрипотентних стовбурових клітин (ПСК) наближають еру терапевтичного застосування ЕСК у медичній практиці. Клінічне застосування ЕСК, як частина регенеративної медицини, дає надію на подолання багатьох невиліковних хвороб (в тому числі спадкових) та покращення якості і тривалості життя людини.

### **Альтернативні шляхи отримання ембріональних стовбурових клітин людини**

Існує кілька джерел отримання ПСК: природний – отримання із внутрішньоклітинної маси (ВКМ) бластоцисти чи окремих бластомерів, та штучний, що передбачає індукцію плюрипотентного стану за допомогою генно-інженерних маніпуляцій, наприклад, партеногенез, трансфер ядра соматичної клітини (SCNT), репрограмування диференційованих соматичних клітин в індуковані ПСК (іПСК). Потенціал ліній ЕСК, отриманих із ВКМ, відомий, адже ці клітинні лінії, їхні характеристики та диференційний потенціал інтенсивно вивчалися протягом останніх декількох десятиків років. Проте заборона використання ЕСК через етичні міркування дещо пригальмувала дослідження у даному напрямку та дала поштовх для розвитку альтернативних методів отримання ПСК.

У 2006 році іПСК було отримано вперше із диференційованих соматичних клітин внаслідок ектопічної експресії генів, асоційованих із плюрипотентністю [22]. Отримані лінії іПСК за ключовими характеристиками нагадували ЕСК. Даний підхід дає змогу накопичувати аутологічні ПСК, що вирішує питання імуносумісності клітинних трансплантатів. Незважаючи на перспективність цього відкриття, клінічне використання таких ліній пов'язане із певним ризиком. Адаже лінії іПСК генетично модифікуються векторами, що є онкогенами, і це несе за собою ризик утворення пухлин. Крім того, ефективність створення ліній іПСК із вихідних клітин є достатньо низькою – від  $10^{-8}$ – $10^{-6}$  [30] до  $10^{-4}$ – $10^{-5}$  [32]. Таким чином, клінічне використання іПСК не є перспективою найближчого часу.

На сьогодні розроблено методи отримання ПСК за допомогою трансферу ядра соматичної клітини (SCNT). Цей спосіб отримання є більш ефективним, ніж репрограмування. Із активованих у такий спосіб яйцеклітин можна отримати 7 % бластоцист, ВКМ яких є матеріалом для створення лінії ЕСК [27]. Однак даний метод має ряд недоліків. По-перше, він лімітується невеликою кількістю доступних незапліднених яйцеклітин. По-друге, існує цитоплазматична спадковість (ДНК мітохондрій, тощо), тому отримані лінії будуть генетичними химерами. Повідомлення щодо створення ЕСК людини за допомогою трансферу ядра соматичних клітин [9] піддають сумніву, а автора підозрюють у фальсифікації даних [11].

Крім того, існують методи отримання ПСК за допомогою партеногенезу. Перші такі клітинні лінії отримано із партенот ембріонів миші. Майже 9 % (8,7 %) активованих яйцеклітин утворювали бластоцисту [16]. Отримана із неї клітинна лінія за ключовими характеристиками відповідала параметрам ЕСК. Однак показано, що отримані із партеноти ЕСК мають нижчий диференційний потенціал *in vitro* та *in vivo*. Крім того, вони не здатні формувати цілий організм, що було підтверджено і для отриманих у такий спосіб ЕСК людини [3]. Показано, що ці клітинні лінії мають високий рівень хромосомних аномалій – 15–20 %, який може

зрости до 50 %, коли вік донора ядра становить більше 34 років [28]. Знову ж таки, цей метод, як і попередній, обмежений етичними питаннями та практичними можливостями отримання незапліднених яйцеклітин.

Зазначені вище проблеми отримання ПСК альтернативними способами свідчать про те, що дослідження ЕСК є необхідними, а їх клінічне застосування обґрунтоване. Ключем до подолання проблеми імуносумісності є створення банків ЕСК. Проте більш лімітуючим фактором є різноманітні заборони на отримання, дослідження та використання ЕСК з застосуванням ембріонів через етичні міркування. Вирішенням цього питання може стати використання матеріалу, що залишається після процедури IVF для пренатальної діагностики. Як клітини ВКМ (бластоцисти порівняно низької якості, що не застосовуються у лікуванні безпліддя), так і окремі виділені з них бластомери, є перспективним джерелом отримання ЕСК. І ті, й інші клітини мають неполяризований фенотип та значний плюрипотентний потенціал.

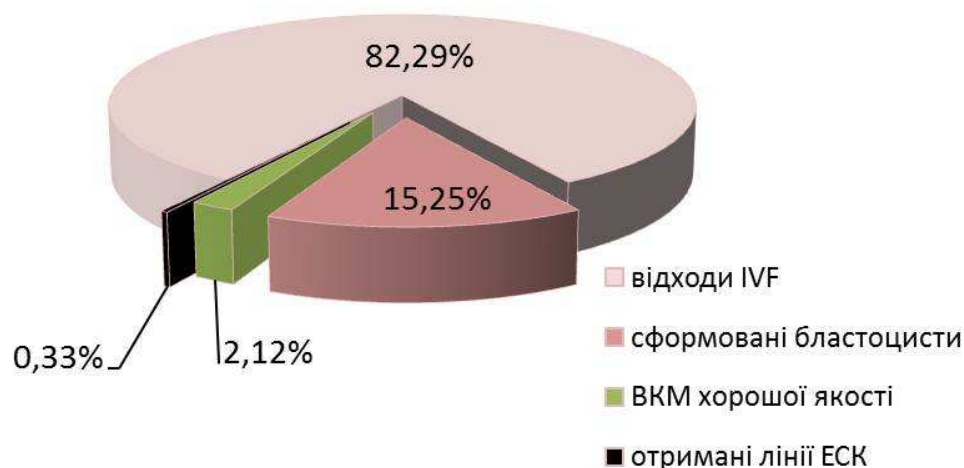
Незважаючи на деякі відмінності цих джерел ЕСК (табл. 1.), показано, що ЕСК, отримані із пізніх бластомерів та ВКМ бластоцисти, мають однаковий потенціал до генерування ліній [7].

Надзвичайно перспективним є отримання ліній ЕСК із відбракованих [12], завмерлих [6] та анеуплоїдних ембріонів [4]. За деякими даними, якість отриманої лінії ЕСК не залежить від морфології ембріонів [19] та характеристики донорів.

Оскільки відбір ембріонів для IVF є дуже прискіпливим, більше половини відсіюються вже на стадії бластули. Тому після відбору залишається велика кількість ембріонів у вигляді «відходів IVF». Із таких «відходів» можна генерувати лінії ЕСК із високими плюрипотентними характеристиками (рис. 1).

**Порівняння бластомерів та клітин ВКМ бластоцисти  
як джерела отримання ЕСК**

| <b>№</b> | <b>Показник</b>                        | <b>Бластомери</b>   | <b>Клітини ВКМ<br/>бластоцисти</b>  | <b>Посилання</b> |
|----------|--|---|---|------------------|
| 1.       | <b>Потентність</b>                     | Тотипотентність   | Плюрипотентність  |                  |
| 2.       | <b>Профіль<br/>експресії<br/>генів</b> | Основна частина<br>активованих генів<br>пов'язана із<br>метаболізмом<br>ліпідів та жирних<br>кислот | Зниження рівня<br>експресії регуляторів<br>транскрипційних<br>факторів та метаболізму<br>нуклеїнових кислот | [31]             |
| 3.       | <b>Метилування<br/>промоторів</b>      | Повністю<br>деметильовані   | З'являються мітки<br>метилування  | [5]              |
| 4.       | <b>Теломераза</b>                      | Низька теломеразна<br>активність та<br>коротша середня<br>довжина теломери                          | Вища теломеразна<br>активність  | [24]             |
| 5.       | <b>ЕСК, що від<br/>них походять</b>    | Більш примітивний<br>фенотип  | Морфологічні<br>характеристики типові<br>для більш пізньої стадії<br>розвитку                               |                  |



**Рис. 1. Джерела отримання ліній ЕСК**

Із третини відбракованого матеріалу можна отримати бластоцисти, 13,9 % із них дадуть ВКМ, із яких кожна 7-а дасть клітинну лінію ЕСК, що відповідатиме необхідним вимогам. При зведенні цих даних та розрахунку на відсотки видно, що 0,33 % кожної процедури штучного запліднення може стати лінією ЕСК без шкоди для виробництва та без руйнування нормальних ембріонів людини. Таким чином, із 1000 ембріонів низької якості, що не будуть задіяні, можна отримати 3 лінії ЕСК. Наведені дані розраховано за емпіричними результатами роботи лише однієї групи дослідників [15]. За іншими даними, ефективність отримання ЕСК із ембріонів низької якості становить від 4,1 до 25 % [8]. Однак розвиток та удосконалення таких методів забезпечить значно вищий рівень виходу нових ліній ЕСК.

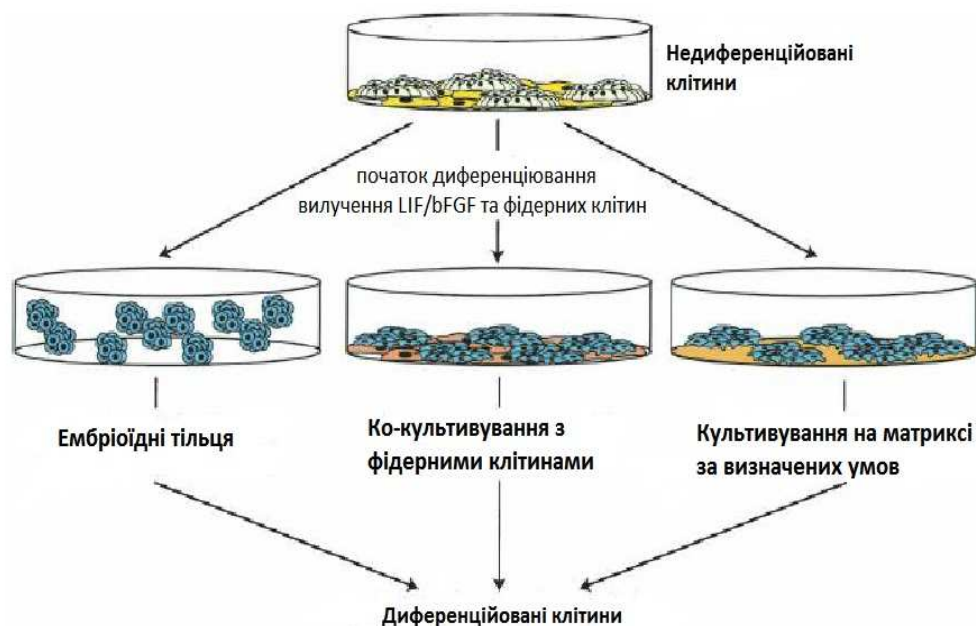
### **Методи диференціювання ембріональних стовбурових клітин**

Теоретично ЕСК мають властивість диференціюватись у будь-який тип клітин. Саме тому вони можуть стати основою клітинної терапії. Один із важливих етапів застосування ЕСК для лікування – отримання бажаного типу клітин шляхом їх диференціювання. І хоча вже описані численні ключові фактори та етапи спрямованого диференціювання, природа складної культуральної системи

повністю ще не досліджена. Тому визначальним фактором для широкого застосування ЕСК у клінічній практиці є оптимізація існуючих протоколів та/або розробка нових методів контрольованого диференціювання [10].

Якщо ЕСК вилучити із середовища, яке забезпечує підтримку недиференційованого стану, клітини починають диференціюватись і за відповідних умов можуть розвиватись у будь-які клітини зародкових шарів: ектодерми, мезодерми та ентодерми [17]. Однак, за умови додавання в середовище диференціювання транскрипційного фактора BMP4, ЕСК людини, на відміну від мишиних, можуть розвиватись також і в клітини, які мають властивості клітин трофобластного походження [10, 29]. Причини такої різниці диференційних потенціалів ЕСК людини та миші невідомі, однак вона може свідчити про більш раннє походження ЕСК людини у процесі ембріогенезу.

Існують три основні підходи для диференціювання ЕСК, які схематично зображені на рис. 2.



**Рис 2. Основні методи диференціювання ЕСК [10]**

Перший метод – це формування ембріодних тілець (ЕТ). Другий метод – це ко-культивування з фідерними клітинами, в залежності від того, у якому напрямку планується диференціювання ЕСК. Диференціювання проходить у постійному контакті з цими клітинами [10, 14]. Третій метод – це диференціювання в моношаровій культурі у визначених культуральних умовах.

Існують три загальні критерії, про які необхідно пам'ятати під час спрямованого диференціювання ЕСК. По-перше, протокол має бути добре дослідженим і забезпечувати ефективний та відтворювальний процес диференціювання клітин заданого напрямку. Якщо це можливо, варто поєднувати оптимальні схеми диференціювання та методи селекції клітин для того, щоб забезпечити виділення високоспецифічних збагачених клітинних популяцій. По-друге, отримання спеціалізованих клітин *in vitro* з ЕСК має повторювати програму розвитку клітин на ранніх стадіях ембріона. По-третє, дозрілі клітинні популяції повинні мати відповідні фізіологічні та функціональні властивості, як в культурі, так і під час трансплантації до відповідної модельної тварини [10].

### **Ембріональні стовбурові клітини та генетична діагностика ембріонів**

Унікальні властивості ЕСК стали основою для створення методики преімплантаційної генетичної діагностики (ПГД), що має на меті оцінку генетичного статусу ембріона ще до моменту його імплантації у порожнині матки. Проведення подібного аналізу вимагає доступу до ядерного матеріалу ембріона, а відтак може бути здійснене лише за умови вилучення клітин ембріонів, культивованих *in vitro* у циклах допоміжних репродуктивних технологій. Першопочатково процедура ПГД була розроблена у якості альтернативи пренатальному дослідженню для пар із доведеним репродуктивним ризиком, зумовленим вірогідним успадкуванням нащадками моногенних захворювань чи незбалансованого каріотипу, що формується в результаті процесів рекомбінації та сегрегації хромосом у статевих клітинах носіїв збалансованих хромосомних



перебудов. Окрім цього специфічного і вкрай обмеженого застосування, аналогічна технологія використовується також з метою підвищення ефективності циклів екстракорпорального запліднення завдяки скринінгу поширених анеуплоїдій [2].

При цьому біопсію матеріалу для дослідження проводять на різних етапах преімплантаційного розвитку [1], а саме:

А) на етапі дроблення, коли ембріон містить 6–10 тотипотентних клітин. У такому разі «втрата» одного чи двох бластомерів буде компенсована активним поділом інших клітин і не вплине на наступний розвиток ембріона;

Б) на етапі бластуляції. При цьому для аналізу вилучаються 5–10 трофктодермальних клітин, запрограмованих на формування екстраембріональних тканин. Оскільки в такому разі для вивчення доступна більша кількість клітин, аналіз є інформативнішим, однак пошкоджені бластоцисти менш стійкі до стресу, і для їх подальшого культивування та кріоконсервації необхідно модифікувати протоколи.

Генетичний матеріал ембріона може бути проаналізований за допомогою методів молекулярної генетики (полімеразно-ланцюгова реакція, порівняльна геномна гібридизація) та цитогенетики (флуоресцентна *in situ* гібридизація). На сьогоднішній день, використання полімеразно-ланцюгової реакції у ПГД обмежене випадками моногенних захворювань у зв'язку з її технічними обмеженнями та відносно високою частотою хибних результатів [2]. Тому більш перспективним є метод порівняльної геномної гібридизації. Відхилення у співвідношенні кількості генетичного матеріалу фіксуються та оцінюються чисельно за допомогою спеціального програмного забезпечення, що дозволяє виявити кількісні аномалії окремих хромосом або їх певних ділянок. Слід зазначити, що даний метод не дозволяє виявити порушення рівня плоідності ембріона та збалансовані структурні перебудови, які не призводять до відхилень кількості генетичного матеріалу [25].

Методи молекулярної цитогенетики дозволяють виявити анеуплоїдні ембріони завдяки використанню маркованих різними барвниками зондів, специфічних до певних регіонів хромосом. Преімплантаційний генетичний скринінг проводиться із використанням зондів до хромосом, аномалії яких найчастіше виступають причиною самовільного переривання вагітності (15-а, 16-а, 17-а, 22-а пари) чи розвитку хромосомних синдромів (13-я, 18-а, 21-а та статеві хромосоми). Водночас, застосування специфічного набору зондів до різних ділянок хромосом, задіяних у збалансованих перебудовах, забезпечує виявлення більшості теоретично очікуваних варіантів рекомбінації та сегрегації аберантних хромосом при проведенні молекулярно-цитогенетичної діагностики ембріонів – носіїв транслокацій [2]. Однак, у зв'язку з технічними особливостями методу, в одному діагностичному циклі аналізують лише кількісні характеристики 9–12-ї хромосом, що унеможлиблює виявлення анеуплоїдій інших хромосом та генетичних перебудов, що виникли *de novo* [25].

Лінії ЕСК, отриманих із бластоцист, генетичний статус яких був встановлений завдяки проведенню преімплантаційної генетичної діагностики, становлять особливу цінність. Їх використання дозволить моделювати розвиток хвороби *in vitro*, досліджувати молекулярні механізми, відповідальні за патогенез захворювання у певних типах клітин, та створити ефективну тестову систему для оцінки ефективності та токсичності ліків [18]. При цьому основні біологічні характеристики, а саме, рівні експресії ембріональних антигенів, патерни ДНК-метилування та інактивації Х-хромосоми генетично аномальних СК не відрізняються від показників нормальних ліній [20]. На сьогоднішній день отримано спектр ліній ЕСК із певними генними аномаліями, у тому числі адренолейкодистрофією, синдромами Мартіна-Белла та Марфана, анемією Фанконі, таласемією, хворобою Хантігтона та ін. [26]. В свою чергу, культури клітин із встановленими патологіями хромосомного набору виступають моделями

хромосомних синдромів, що дозволяє вивчати клітинні та молекулярні зміни, характерні для даних патологій [21].

Загалом, з огляду на добре вивчений потужний потенціал ЕСК та нові етичні методи їх отримання, виведення нових ліній ЕСК, їх характеристика та створення банків клітинних ліній є надзвичайно актуальним.

### **СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ**

1. Biancotti J.-C. Human embryonic stem cells as models for aneuploid chromosomal syndromes. / J.-C. Biancotti, K. Narwani, N. Buehler [et al.] // *Stem cells*. – 2010. – Vol.28. – P.1530–1540.

2. Braude P. Preimplantation genetic diagnosis. / P. Braude, S. Pickering, F. Flinter, C. M. Ogilvie // *Nat. Rev. Genet.* – 2002. – Vol.3, №12. – P.941–53.

3. Brevini T. A. Cell lines derived from human parthenogenetic embryos can display aberrant centriole distribution and altered expression levels of mitotic spindle check-point transcripts. / T. A. Brevini, G. Pennarossa, S. Antonini, A. Paffoni, G. Tettamanti [et al.] // *Stem Cell Rev.* – 2009. – Vol. 5. – P. 340–52.

4. Frydman N. Characterization of human PGD blastocysts with unbalanced chromosomal translocations and human embryonic stem cell line derivation / N. Frydman, O. Féraud, C. Bas, M. Amit, R. Frydman, A. Bennaceur-Griscelli // *Reprod Biomed Online*. – 2009. – V. 19. – Suppl. 4. – P. 4199.

5. Fulka H. DNA methylation pattern in human zygotes and developing embryos / H. Fulka, M. Mrazek, O. Tepla, J. Fulka // *J. Reproduction*. – 2004. – Vol. 128. – P. 703–708.

6. Gavrillov S. Alternative strategies for the derivation of human embryonic stem cell lines and the role of dead embryos / S. Gavrillov, V. E. Papaioannou, D. W. Landry // *Curr Stem Cell Res Ther.* – 2009. – Vol. 4(1). – P. 81–86.

7. Giritharan G. Human embryonic stem cells derived from embryos at different stages of development share similar transcription profiles / G. Giritharan, D. Ilic, M. Gormley, A. Krtolica // PLoS One. – 2011. – Vol. 6(10). – e26570.

8. Hovatta O. Donation of embryos for stem cell research—how many couples consent? / O. Hovatta // Hum Reprod . – 2003. – Vol. 18. – P. 1353–1355.

9. Hwang W. Patient-specific embryonic stem cells derived from human SCNT blastocysts / W. S. Hwang, S. I. Roh, B. C. Lee [et al.] // Science. – 2005. – Vol. 308 (5729). – P. 1777–1783.

10. Keller G. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine /Keller G.//Genes and development. – 2005. – Vol. 19. – P. 1129–1155.

11. Kennedy D. Editorial retraction. / D. Kennedy // Science. – 2006. – Vol. 311 (5759). – P. 335.

12. Liu Y. Comparison of three embryo culture methods for derivation of human embryonic stem cells from discarded embryos / Y. Liu , Y. Li, A. Hwang, S. Y. Wang, C. W. Jia // Cell Reprogram. – 2011. – Vol. 13(3). – P. 233–239.

13. Martin G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells / G. R. Martin // Proc Natl Acad Sci USA. – 1981. – Vol. 78 (12). – P. 7634–7638.

14. Nakano T. Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture / T. Nakano, H. Kodama, T. Honjk // Science. – 1994. – Vol. 265. – P. 1098–1101.

15. O'Leary T. The influence of patient and cohort parameters on the incidence and developmental potential of embryos with poor quality traits for use in human embryonic stem cell derivation / T. O'Leary, G. Duggal, S. Lierman, E. Van den Abbeel, B. Heindryckx [et al.] // Hum. Reprod. – 2012. – [Epub ahead of print].

16. Paffoni A. In vitro development of human oocytes after parthenogenetic activation or intracytoplasmic sperm injection / A. Paffoni, T. A. Brevini, E. Somigliana, L. Restelli, F. Gandolfi, G. F. Ragni // *Fertil Steril.* – 2007. – Vol. 87(1). – P. 77–82.

17. Smith A.G. Embryo-derived cells: of mice and men / A. G. Smith // *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* – 2001 – Vol. 17. – P. 435–462.

18. Stephenson E. L. Preimplantation genetic diagnosis as a source of human embryonic stem cells for disease research and drug discovery. / E. L. Stephenson, C. Mason, P. R. Braude // *Int. J. Obst. Gyn.* – 2009. – Vol. 116, №2. – P.158–65.

19. Strom S. No relationship between embryo morphology and successful derivation of human embryonic stem cell lines / S. Strom, K. Rodriguez-Wallberg, F. Holm, R. Bergstrom, L. Eklund // *PLoS ONE.* – 2010. – Vol. 5. – e15329.

20. Sun X. Similar biological characteristics of human embryonic stem cell lines with normal and abnormal karyotypes. / X. Sun, X. Long, Y. Yin [et al.] // *Hum Reprod.* – 2008. – Vol.23, №10. – P. 2185–2193.

21. Taei A. Derivation of new human embryonic stem cell lines from preimplantation genetic screening and diagnosis-analyzed embryos. / A. Taei, H. Gourabi, A. Seifinejad [et al.] // *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* – 2010. – Vol.46, №3–4. – P.395–402.

22. Takahashi K. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors / K. Takahashi, S. Yamanaka // *Cell.* – 2006. – Vol. 126 (4). – P. 663–676.

23. Thomson J. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts / J. Thomson, J. Itskovitz-Eldor, S. Shapiro, M. Waknitz, J. Swiergiel [et al.] // *Science.* – 1998. – Vol. 282(5391). – P. 1145–1147.

24. Turner S. Telomere lengths in human oocytes, cleavage stage embryos and blastocysts / S. Turner, H. P. Wong, J. Rai, G. M. Hartshorne // *Mol Hum Reprod.* – 2010. – Vol. 16 (9). – P. 685–694.

25. Vanneste E. PGD for a complex chromosomal rearrangement by array comparative genomic hybridization. / E. Vanneste, C. Melotte, T. Voet [et al.] // Hum. Reprod. – 2011. – Vol. 26, №4. – P. 941–949.

26. Verlinsky Y. Human embryonic stem cell lines with genetic disorders. / Y. Verlinsky, N. Strelchenko, V. Kukhareno [et al.] // Reproductive BioMedicine Online. – 2005. – Vol. 10, № 1. – P. 105–110.

27. Wakayama T. Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer / T. Wakayama, V. Tabar, I. Rodriguez, C. F. Perry, L. Studer, P. Mombaerts // Science. – 2001. – V. 292(5517). – P. 740–743.

28. Wang Y. Efficient generation of human embryonic stem cell lines from discarded embryos through increases in the concentration of basic fibroblast growth factor. / Y. Wang, Ch. Xu, H. Wang, J. Liu, Sh. Hui [et al.] // Human cell. – 2012. – Vol. 25. – P. 16–23.

29. Xu R. H. BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast / R. H. Xu, X. Chen, D. S. Li [et al.] // Nat. Biotechnol. – 2002. – Vol. 20. – P. 1261–1264.

30. Yu J. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells / J. Yu, M. A. Vodyanik, K. Smuga-Otto, J. Antosiewicz-Bourget, J. L. Frane [et al.] // Science. – 2007. – Vol. 318 (5858). – P. 1917–1920.

31. Zhang P. Transcriptome profiling of human pre-implantation development / P. Zhang, M. Zucchelli, S. Bruce, F. Hambiliki, A. Stavreus-Evers [et al.] // PLoS One. – 2009. – Vol. 4. – e7844.

32. Zhang Z. Efficient generation of fully reprogrammed human iPS cells via polycistronic retroviral vector and a new cocktail of chemical compounds / Z. Zhang, Y. Gao, A. Gordon, Z. Z. Wang, Z. Qian // PLoS One. – 2011. – Vol. 6(10). – e26592.

**ЭМБРИОНАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ.  
ПЕРСПЕКТИВЫ И ПРОБЛЕМЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ**

*Д. И. БИЛЬКО, С. В. МАЛЫШЕВА, Г. В. БУДАШ, О. В. ЧАПЛЯ, Н. М. БИЛЬКО*  
*Центр молекулярных и клинических исследований Национального университета*  
*«Киево-Могилянская академия», г. Киев*

*Использование уникальных свойств эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) лимитируется в основном этическими убеждениями относительно классических способов их получения. В данной статье рассмотрены альтернативные способы получения плюрипотентных стволовых клеток, проанализированы их недостатки и преимущества. Охарактеризован плюрипотентный потенциал ЭСК и приведены основные способы их дифференцировки. Также в статье рассмотрены перспективы исследования молекулярных и клеточных изменений, характерных генетически аномальным линиям ЭСК, созданным с использованием технологии преимплантационной генетической диагностики.*

**Ключевые слова:** *плюрипотентность, эмбриональные стволовые клетки, дифференцировка, преимплантационная генетическая диагностика, молекулярная цитогенетика.*

**EMBRYONIC STEM CELLS.  
PERSPECTIVES AND PROBLEMS OF THEIR APPLICATION**

*D.I. BILKO, S.V. MALYSHEVA, G.V. BUDASH, O.V. CHAPLIA, N.M. BILKO*  
*Centre for Molecular and Cell Research of National University of «Kyiv-Mohyla*  
*Academy»*

*The application of embryonic stem cells (ESC) is limited by ethic issues concerning the classic method of their derivation. Alternative methods of pluripotent stem cells generation are described; their advantages and disadvantages are evaluated. Pluripotent potential of ESCs is characterized and basic differentiation methods are described. The article also introduces the perspectives of researches focused on multilevel changes typical for genetically abnormal lines of hESC, created with the use of preimplantation genetic diagnosis technique.*

**Key words:** *pluripotency, embryonic stem cells, differentiation, preimplantation genetic diagnosis, molecular cytogenetics.*