

## Оценка состояния хроматина в бластомерах после криоконсервирования

М.П. ПЕТРУШКО, В.И. ПИНЯЕВ, Н.Н. ЕРОВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Общеизвестно, что состояние хроматина напрямую связано с процессами апоптоза, который представляет собой физиологический механизм устранения избыточных или функционально аномальных клеток, необходимых для нормального развития многоклеточного организма в эмбриональном периоде.

Методы количественного определения апоптотических клеток базируются на оценке явлений, вызванных изменениями в плазматической мембране клеток, избирательной фрагментацией ядерной ДНК, изменениями структуры клеточных компонентов, снижением РНК в цитоплазме.

Вследствие изменений проницаемости плазматической мембраны апоптотические клетки накапливают краситель Hoechst 33342 значительно быстрее, чем интактные, что позволяет выявлять ранние изменения проницаемости мембраны и хроматина, предшествующие межнуклеосомной фрагментации ДНК.

Целью работы явилось изучение состояния хроматина в бластомерах нативных и криоконсервированных эмбрионов человека.

Визуализированные хроматиновые субстанции разделяли на 2 вида: плотный, компактный хроматин, окружающий ядрышки в виде кольца и диффузный ядерный хроматин без хроматинового кольца вокруг ядрышка.

Каждый эмбрион помещали в 5 мл среды культивирования, содержащую Hoechst 33342 и инкубировали 10 минут при 37°C. Бластомеры классифицировали по характеру хроматина в бластомерах: плотный и диффузный, в соответствии с наличием либо отсутствием Hoechst-положительного сигнала.

Эмбрионы были разделены на две группы. В первой группе исследовали нативные эмбрионы. Эмбрионы второй группы криоконсервировали и через 1 час после деконсервации изучали состояние хроматина. В каждой группе было изучено по 20 эмбрионов. Среднее число бластомеров на эмбрион при морфологическом анализе методом световой микроскопии составило  $5,1 \pm 0,2$  для нативных эмбрионов и  $4,4 \pm 0,2$  для криоконсервированных. Среднее количество бластомеров с компактным хроматином составило  $4,0 \pm 0,1$  для

нативных и  $2,7 \pm 0,2$  для криоконсервированных. Отмечается факт увеличения бластомеров с диффузным хроматином после криоконсервирования –  $2,7 \pm 0,2$ , по сравнению с  $0,3 \pm 0,1$  для нативных эмбрионов.

Обнаруженная нами диффузная фрагментация ДНК может служить свидетельством апоптоза в эмбрионах человека после криоконсервирования.

*Адрес для корреспонденции:* Петрушко М.П., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 712-15-02, факс: +38 (057) 373-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua