

Оценка показателей жизнеспособности сперматозоидов быков после воздействия диметилглицеролата кремния с использованием метода проточной цитофлуориметрии

А. Н. Накидкина¹✉, Т. И. Кузьмина¹

¹Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал Федерального исследовательского центра животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста, Пушкин, Россия

✉E-mail: alena_boiceva@mail.ru

Аннотация. В последние десятилетия активно ведется работа по разработке, изучению свойств и возможностей применения различных соединений кремния – второго по распространенности элемента на нашей планете. Данный неметалл и его диоксид (кремнезем) демонстрируют хорошую биологическую совместимость, безопасность для живых организмов, а также большое разнообразие физико-химических свойств в зависимости от способа получения и обработки. В частности, диметилглицеролат кремния (ДМГК) обладает трансмукозной и транскутанной проводимостью лекарственных средств, а гидрогели на его основе могут представлять интерес в качестве компонента, структурирующего среды для культивирования ооцитов и эмбрионов и/или криоконсервации/оттаивания гамет. **Цель** данного исследования – изучение влияния ДМГК в концентрациях 0,2 % и 0,02 % на мембранный потенциал митохондрий и показатели жизнеспособности сперматозоидов быков. Основным **методом** исследования стала проточная цитофлуориметрия с использованием двух наборов флуоресцентных зондов: йодид 3,3'-дигексилосакарбоцианин (DiOC₆(3))/этидиум бромид и Annexin V-FITC/пропидиум йодид. **Результаты** проведенной работы свидетельствуют, что ДМГК в концентрациях 0,2 % и 0,02 % не оказывает влияния на мембранный потенциал митохондрий, экстернализацию фосфатидилсерина и некротические процессы в популяции сперматозоидов быков. **Научная новизна** исследования заключается во впервые полученных данных об отсутствии цитотоксичности ДМГК для мужских гамет. Вкупе с данными о положительном влиянии данного соединения на морфологические показатели и состояние ядерного хроматина ооцитов свиней после интрафолликулярной витрификации следует заключить, что диметилглицеролат кремния представляет интерес при создании сред для криоконсервации/оттаивания сперматозоидов.

Ключевые слова: сперматозоиды, быки, диметилглицеролат кремния, митохондрии, апоптоз, некроз.

Для цитирования: Накидкина А. Н., Кузьмина Т. И. Оценка показателей жизнеспособности сперматозоидов быков после воздействия диметилглицеролата кремния с использованием метода проточной цитофлуориметрии // Аграрный вестник Урала. 2021. № 06 (209). С. 53–60. DOI: ...

Дата поступления статьи: 03.03.2021, **дата рецензирования:** 26.04.2021, **дата принятия:** 26.05.2021.

Постановка проблемы (Introduction)

Несмотря на то что биологическая роль кремния до конца не выяснена, на сегодняшний день этот полуметалл, а также его наиболее распространенное в природе соединение – кремнезем – признаются безопасными для организма млекопитающих [1, с. 3]. Именно в форме диоксида кремний поступает в организм с пищей, и известна роль данного элемента в формировании соединительной и минерализации костной ткани. Благодаря высокой биодоступности и большому объему исследований, подтверждающих безопасность, кремний и его соединения широко используются при производстве лекарственных и косметических средств. В частности, наночастицы пирогенных и мезопористых кремнеземов с различными размерами и свойствами нашли применение в самых

разных областях. Высокодисперсный кремнезем широко применяется в нашей стране и за рубежом в качестве энтеросорбента, а также проявил криопротекторные свойства и обладает большим потенциалом как матрица для создания материалов с заданными физико-химическими свойствами [2, с. 12, 15]. Не менее перспективен и мезопористый диоксид кремния, который обнаружил множество способов применения в биомедицине, возможности его использования в настоящее время активно исследуются [3, с. 4–7], [4]. В свою очередь, диметилглицеролат кремния (ДМГК) – водорастворимое кремнийорганическое производное глицерина, получаемое путем взаимодействия тетраэтоксисилана с глицерином, так же как и гидрогели на основе ДМГК, – продемонстрировал хорошую биосовместимость, трансмукозную и транскутанную

проводимость лекарственных веществ¹ [5]. Соединение разработано в Институте органического синтеза им. И. Я. Постовского Уральского отделения Российской академии наук (г. Екатеринбург). В своих исследованиях А. А. Бойко и соавторы продемонстрировали, что и диметилглицеролат кремния, и гидрогели на его основе могут быть дополнены различными биологически активными соединениями, при этом ДМГК как основа композиции обеспечивает максимально эффективное взаимодействие действующих веществ с мембранами клеток и транспорт через них. Известно, что гидрогели проявляют свойства, похожие на таковые у внеклеточного матрикса, и могут быть легко модифицированы нужными соединениями в зависимости от конкретной задачи [6, с. 2], [7, с. 15–16]. Таким образом, диметилглицеролат кремния и гидрогели на его основе могут представлять интерес в качестве компонента, структурирующего среды для культивирования ооцитов и эмбрионов и/или витрификации/криоконсервации мужских и женских гамет млекопитающих. Однако чтобы подходить для работы с половыми клетками, соединение должно удовлетворять определенным условиям. Одно из главных требований – отсутствие цитотоксического эффекта и влияния на ключевые процессы в гамете. Для сперматозоидов главным событием, предшествующим оплодотворению, является капацитация – сложный комплекс биохимических преобразований, в результате которого мужская гамета приобретает способность осуществить гиперактивацию, акросомную реакцию и в итоге оплодотворить яйцеклетку. На начальных этапах капацитации необходима генерация активных форм кислорода (АФК), однако чрезмерные уровни АФК могут привести к индукции внутреннего пути апоптоза в сперматозоиде. Таким образом, после эякуляции в гамете существует баланс – тонкая грань между физиологическим повышением уровня АФК с последующей капацитацией и чрезмерным оксидативным стрессом и, как следствие, апоптозом. Данный баланс – одно из самых слабых мест в постэякуляционном периоде мужской гаметы, и любое неблагоприятное воздействие может привести к потере способности к оплодотворению и гибели сперматозоида. При этом одной из главных мишеней АФК является электрон-транспортная цепь митохондрий, сбой в работе которой становится причиной не только нарушения энергетического обмена в клетке, но и всевозрастающего оксидативного стресса. Именно поэтому целью данного исследования стало изучение влияния ДМГК в концентрациях 0,2 % и 0,02 % на мембранный потенциал митохондрий, отражающий эффективность работы электрон-транспортной цепи, а также на показатели жизнеспособности сперматозоидов быков, связанные с апоптозом и некрозом. Нами ранее была проведена работа по изучению влияния ДМГК в различных концентрациях на показатели жизнеспособности ооцитов и клеток гранулы и

кумуляуса свиней, а также ооцитов и доимплантационных эмбрионов коров [8–11]. Было показано отсутствие цитотоксического эффекта данного соединения на клетки ооцит-кумуляусного комплекса и гранулы. Помимо этого, был выявлен положительный эффект ДМГК на морфологические показатели и состояние ядерного хроматина ооцитов свиней после интрафолликулярной витрификации [12]. Представляется интересным выявить эффекты диметилглицеролата кремния и на мужские половые клетки, с перспективой его применения в качестве компонента сред для криоконсервации.

Методология и методы исследования (Methods)

ДМГК, использованный в работе, был синтезирован в Институте органического синтеза им. И. Я. Постовского Уральского отделения РАН (Екатеринбург); йодид 3,3'-дигексилоксакарбоцианин (DiOC₆(3)) произведен компанией Invitrogen (США). Все остальные использованные реагенты – продукты компании Sigma-Aldrich (США).

Подготовка клеток. Объектом исследования являлись нативные сперматозоиды быков голштинской породы. После забора семени проводилась оценка гамет по параметрам концентрации, подвижности и количества аномальных форм. При проведении экспериментов использовались только образцы семени с подвижностью сперматозоидов более 7 баллов и минимальным количеством аномальных форм клеток. Сперматозоиды подвергали отмывке от семенной плазмы, дважды центрифугируя при 300 g в течение 10 мин. в среде Sp-TALP (pH 7,4), состоящей из 100 mM NaCl, 3.1 mM KCl, 25 mM NaHCO₃, 0,3 mM NaH₂PO₄, 21,6 mM лактата натрия, 0,5 mM CaCl₂, 0,4 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 1 mM пирувата и 0,1 % поливинилалкоголя (30–70 кДа). Осадок ресуспендировали в растворе, содержащем 140 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,1 mM CaCl₂, 10 mM глюкозы и 10 mM HEPES, pH среды 7,4 (далее раствор Na-HEPES) [13, с. 376]. Все манипуляции осуществлялись с использованием термостоллика во избежание холодового шока. Затем клетки в концентрации 50 млн/мл инкубировали в течение 2 ч при 38,5 °C, 95 % влажности и 5 % CO₂ в присутствии ДМГК в концентрациях 0,2 % и 0,02 %.

Оценка мембранного потенциала митохондрий. Для проведения измерений к 100 мкл клеточной суспензии (2–3 × 10⁶ клеток/мл) добавляли 20-кратный рабочий раствор йодида 3,3'-дигексилоксакарбоцианина (DiOC₆(3)), получая конечную концентрацию DiOC₆(3) 20 нМ [13, с. 376]. Рабочий раствор готовили *ex tempore*, добавляя к 10 мкл стокового раствора (1 мг/мл DiOC₆(3) в ДМСО) 4900 мкл забуференного физиологического раствора. После внесения зонда образцы тщательно перемешивали и оставляли на 20 мин. в CO₂-инкубаторе при 37 °C, 95 % влажности и 5 % CO₂. По завершении инкубации образцы отмывали центрифугированием в избытке забуференного физиологического раствора,

¹ Патент на изобретение RU 2382046 C1, 20.02.2010; патент на изобретение RU 2589902 C1, 10.07.2016.

содержащем 2 % эмбриональной телячьей сыворотки (8 мин. при 300 g), после чего надосады удаляли, а осадок переводили в 100 мкл свежего забуференного физиологического раствора. В полученную клеточную суспензию добавляли 10 мкл раствора бромистого этидия (EB), получая конечную концентрацию EB 1 мкг/мл. Затем клетки инкубировали в течение 10 мин. при комнатной температуре в защищенном от света месте, после чего в образцы вносили по 200 мкл забуференного физиологического раствора и анализировали флуоресценцию на проточном цитометре Cytomics FC 500 (BECKMAN-COULTER, США). На основании параметров прямого и бокового светорассеяния был выбран регион для анализа клеток, включающий 5000 событий в каждой пробе. Регистрацию флуоресценции спермиев, окрашенных DiOC₆(3), проводили на первом канале (FL1) проточного анализатора. Регистрацию флуоресценции некротических клеток, окрашенных EB, проводили на третьем канале (FL3) проточного анализатора. Напряжение на фотоэлектронных умножителях цитометра выставляли по негативному контролю, которым служили неокрашенные клетки. Результаты выражали в процентах от общего числа проанализированных событий.

Оценка экстернализации фосфатидилсерина. Для проведения измерений клетки в концентрации

2–3 × 10⁶ ресуспендировали в 500 мкл забуференного физиологического раствора, содержащем 2 % эмбриональной телячьей сыворотки, и окрашивали 5 мкл аннексина V, конъюгированного с FITC, и 5 мкл йодистого пропидия (PI) из набора Annexin V-FITC Apoptosis detection kit [13, с. 377]. Сперматозоиды инкубировали при комнатной температуре в защищенном от света месте в течение 5 мин. в соответствии с инструкцией к набору. После инкубации анализировали флуоресценцию зондов на проточном цитометре Cytomics FC 500. На основании параметров прямого и бокового светорассеяния был выбран регион для анализа клеток, включающий 5000 событий в каждой пробе. Регистрацию флуоресценции спермиев, окрашенных аннексином V-FITC, проводили на первом канале (FL1) проточного анализатора. Регистрацию флуоресценции некротических клеток, окрашенных PI, проводили на четвертом канале (FL4) проточного анализатора (рис. 1). Напряжение на фотоэлектронных умножителях цитометра выставляли по негативному контролю, которым служили неокрашенные клетки. Результаты выражали в процентах от общего числа проанализированных событий.

Достоверность различия сравниваемых средних значений для 9–12 независимых экспериментов оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента.

Таблица 1
Оценка влияния диметилглицеролата кремния (ДМГК) на мембранный потенциал митохондрий в сперматозоидах быков с использованием зонда йодида 3,3'-дигексилоксакарбоцианина (DiOC₆(3))

Показатели жизнеспособности сперматозоидов	Доля сперматозоидов (% ± σ) при воздействии ДМГК в концентрации:		
	0 % (контроль)	0,2%	0,02%
DiOC ₆ (3) ⁺ /EB ⁻ – живые	34,20 ± 3,46	35,03 ± 5,08	33,09 ± 4,50
DiOC ₆ (3) ⁻ /EB ⁻ – сниженный МПМ	6,07 ± 1,96	6,10 ± 2,63	6,57 ± 1,95
DiOC ₆ (3) ⁻ /EB ⁺ – некроз	59,73 ± 4,43	58,87 ± 5,80	60,34 ± 5,41

Примечание. В первом столбце надстрочным знаком «-» обозначено отсутствие флуоресценции указанного зонда, «+» – наличие флуоресценции; МПМ – мембранный потенциал митохондрий; σ – среднеквадратическое отклонение. Статистически значимых различий между группами нет. Было проведено 7 повторностей. Концентрация клеток в суспензии при проведении измерений – ~1 млн/мл.

Table 1
Evaluation of the effect of silicon dimethylglycerolate (SDMG) on the mitochondrial membrane potential in bovine spermatozoa using the 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide (DiOC₆(3))

Viability markers of spermatozoa	The proportion of spermatozoa (% ± σ) after exposure to SDMG at a concentration of:		
	0 % (control)	0.2 %	0.02 %
DiOC ₆ (3) ⁺ /EB ⁻ – viable	34,20 ± 3,46	35,03 ± 5,08	33,09 ± 4,50
DiOC ₆ (3) ⁻ /EB ⁻ – reduced MMP	6,07 ± 1,96	6,10 ± 2,63	6,57 ± 1,95
DiOC ₆ (3) ⁻ /EB ⁺ – necrosis	59,73 ± 4,43	58,87 ± 5,80	60,34 ± 5,41

Note. In the first column, the superscript “-” indicates the absence of the indicated probe fluorescence, “+” – the presence of fluorescence; MMP – mitochondrial membrane potential; σ – standard deviation. There are no statistically significant differences between the groups. 7 replicates were carried out. The concentration of cells in suspension during measurements was ~1 million/ml

Таблица 2

Воздействие диметилглицеролата кремния (ДМГК) на показатели жизнеспособности сперматозоидов быков с использованием флуоресцентного зонда к аннексину V

Показатели жизнеспособности сперматозоидов	Доля сперматозоидов (% ± σ) при воздействии ДМГК в концентрации:		
	0 % (контроль)	0,2 %	0,02 %
Annexin V ⁻ /PI ⁻ – живые	88,80 ± 2,40	88,23 ± 3,38	88,43 ± 4,11
Annexin V ⁺ /PI ⁻ – апоптоз	8,57 ± 1,84	8,67 ± 2,49	8,17 ± 4,02
Annexin V ^{+/-} /PI ⁺ – некроз	2,63 ± 0,91	3,10 ± 1,93	3,40 ± 2,60

Примечание. В первом столбце надстрочным знаком «-» обозначено отсутствие флуоресценции указанного зонда, «+» – наличие флуоресценции. σ – среднеквадратическое отклонение. Статистически значимых различий между группами нет. Было проведено 5 повторностей. Концентрация клеток в суспензии при проведении измерений – ~1 млн/мл.

Table 2

The effect of silicon dimethylglycerolate (SDMG) on the viability markers of bovine spermatozoa using a fluorescent probe to Annexin V

Viability markers of spermatozoa	The proportion of spermatozoa (% ± σ) after exposure to SDMG at a concentration of:		
	0 % (control)	0.2 %	0.02 %
Annexin V ⁻ /PI ⁻ – viable	88.80 ± 2.40	88.23 ± 3.38	88.43 ± 4.11
Annexin V ⁺ /PI ⁻ – apoptosis	8.57 ± 1.84	8.67 ± 2.49	8.17 ± 4.02
Annexin V ^{+/-} /PI ⁺ – necrosis	2.63 ± 0.91	3.10 ± 1.93	3.40 ± 2.60

Note. In the first column, the superscript “-” indicates the absence of the indicated probe fluorescence, “+” – the presence of fluorescence. σ – standard deviation. There are no statistically significant differences between the groups. 5 replicates were carried out. The concentration of cells in suspension during measurements was ~1 million/ml

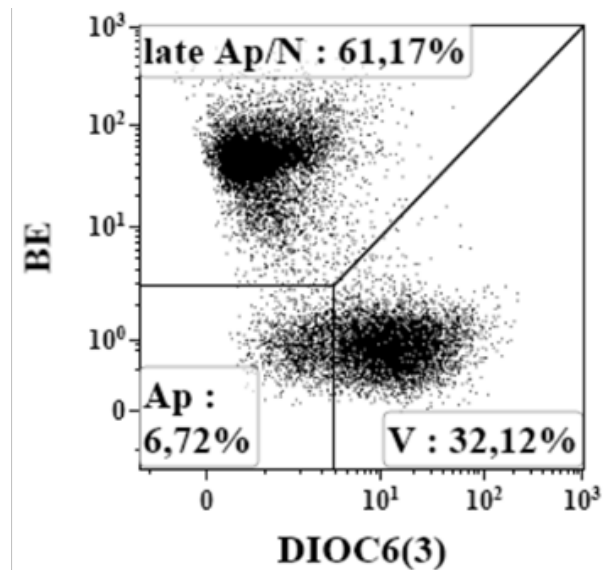


Рис. 1. Пример распределения сперматозоидов быков по флуоресценции DiOC₆(3) (по горизонтали) и бромистого этидия (BE, по вертикали): Late Ap/N – клетки в состоянии позднего апоптоза и (или) некроза, Ap – клетки со сниженным мембранным потенциалом митохондрий, V – живые клетки

Fig. 1. An example of the bovine spermatozoa distribution by fluorescence of DiOC₆(3) (horizontal) and ethidium bromide (BE, vertical): Late Ap/N – cells in a state of late apoptosis and (or) necrosis, Ap – cells with reduced mitochondrial membrane potential, V – viable cells

Результаты (Results)

Йодида 3,3'-дигексилосакарбацианин способен свободно проникать через биологические мембраны, в том числе и через внешнюю и внутреннюю мембраны митохондрий, и накапливаться в областях с высокой концентрацией протонов [13, с. 377]. Сни-

жение концентрации протонов и, соответственно, мембранного потенциала, говорит о нарушении работы электрон-транспортной цепи митохондрий и впоследствии приводит к индукции апоптоза [14, с. 11]. Бромистый этидий (BE) окрашивает некротические клетки, проникая через поврежденную цитоплазматическую мембрану и связываясь с ДНК. Таким образом, живые интактные гаметы обладают яркой флуоресценцией DiOC₆(3) и не накапливают бромистый этидий (DiOC₆(3)⁺/EB⁻). Сперматозоиды со сниженным мембранным потенциалом митохондрий, однако без признаков некроза, не окрашиваются ни одним зондом (DiOC₆(3)⁻/EB⁻), наконец, некротические клетки либо находящиеся на поздней стадии апоптоза не демонстрируют флуоресценцию DiOC₆(3), но окрашиваются бромистым этидием (DiOC₆(3)⁻/EB⁺). В таблице 1 приведены результаты экспериментов по изучению способности ДМГК влиять на мембранный потенциал митохондрий. Полученные данные свидетельствуют, что в концентрациях 0,2 % и 0,02 % диметилглицеролат кремния не оказывает воздействия на исследуемые показатели.

Оценку экстернализации фосфатидилсерина проводили для двух концентраций ДМГК: 0,2 % и 0,02 %, и ее результаты отражены в таблице 2. Контролем служил образец, к которому перед инкубацией вместо диметилглицеролата кремния добавляли равное количество раствора Na-HEPES. Аннексин V-FITC способен связываться с фосфатидилсеринем, который появляется на поверхности цитоплазматической мембраны клеток при индукции апоптоза как сигнал для поглощения гибнущей гаметы макрофагами. Йодистый пропилий (PI) же в своем действии аналогич-

чен бромистому этидию и детектирует некротические клетки. Таким образом, по аналогии с $\text{DiOC}_6(3)$ живые интактные клетки не демонстрируют флуоресценцию ни одного зонда (Annexin V⁻/PI⁻), свечение сперматозоидов с индуцированным апоптозом регистрируется только по каналу аннексина V-FITC (Annexin V⁺/PI⁻), а некротические клетки и гаметы на поздних стадиях апоптоза окрашиваются йодистым пропидием или обоими зондами сразу (Annexin V⁺/PI⁺). Полученные результаты демонстрируют отсутствие изменения относительно контроля доли как апоптотических, так и некротических клеток в образцах, инкубированных в присутствии ДМГК в концентрациях 0,2 % и 0,02 %.

Обсуждение и выводы (Discussion and Conclusion)

Согласно полученным результатам, диметилглицеролат кремния в исследованных концентрациях не оказывает влияния ни на мембранный потенциал митохондрий, ни на экстернализацию фосфатидилсерина, ни на некротические процессы в популяции сперматозоидов быков. Митохондриальный мембранный потенциал – один из наиболее чувствительных к внешним воздействиям показатель жизнеспособности мужских гамет, и его снижение ведет к серьезным нарушениям функционирования клетки. Высокая концентрация протонов в межмембранном пространстве митохондрий говорит об эффективности работы электрон-транспортной цепи митохондрий, что свидетельствует о физиологических уровнях активных форм кислорода в гамете. В этом аспекте отсутствие влияния ДМГК на митохондриальный мембранный потенциал положительно характеризует потенциал данного соединения как компонента сред для работы с половыми клетками. Такой результат свидетельствует о том, что ДМГК не дает значительного эффекта на генерацию АФК в сперматозоиде, а вкуче с отсутствием повышения уровня экстернализации фосфатидилсерина после инкубации с данным соединением можно заключить, что баланс между апоптозом и капациацией не нарушен. Интересно было бы выявить возможные эффекты ДМГК непосредственно на капациацию и другие постэякуляционные процессы в гамете, что может стать целью дальнейших исследований. В свою очередь, отсутствие влияния диметилглицеролата кремния на процент в популяции сперматозоидов с поврежденной мембраной, ДНК которых окрашена йодистым пропидием / бромистым этидием (идентифицируемыми как некротические), не оставляет места для сомнений в безопасности для мужских гамет исследованных концентра-

ций данного соединения. Вкуче с полученными ранее данными о положительном эффекте диметилглицеролата кремния на морфологические показатели и состояние ядерного хроматина ооцитов свиней после интрафолликулярной витрификации [12] следует заключить, что данное соединение обладает большим потенциалом в качестве компонента при разработке сред для криоконсервации гамет и эмбрионов – матрицы, способной обеспечивать более эффективное взаимодействие криопротекторных компонентов с плазмалеммой клеток, а также безопасной для гамет при экстракорпоральном оплодотворении. Показано, что при модификации диметилглицеролата кремния различными соединениями, ДМГК потенцирует их эффекты и обеспечивает лучшую биодоступность активных компонентов. В последнее время при криоконсервации спермы все реже используются разбавители на основе яичного желтка и молока в связи со сложностью стандартизации состава и высоким риском микробного обсеменения. Возможными альтернативами является применение готовых коммерческих сред со стерилизованным желтком [15, с. 2] или же экзогенного холестерина в паре с глицерином [16, с. 7–9]. Использование глицерина обладает рядом преимуществ: легкость и полноценность отмывки от разбавителя, достоверность последующей оценки с помощью CASA [16, с. 14], а также отсутствие встраивания протеинов желтка в мембрану сперматозоидов [16, с. 15]. Диметилглицеролат кремния, являясь производным глицерина, обладает многими его свойствами, при этом собственные уникальные характеристики ДМГК, а также безопасность, показанная в том числе в данном исследовании, позволяют говорить о перспективности диметилглицеролата кремния для совершенствования протоколов долгосрочного хранения мужских гамет. Исследуемое соединение может оказаться достойной альтернативой глицерину, который, несмотря на все преимущества, обладает некоторой токсичностью для гамет. Ввиду всего вышеизложенного будущие исследования следует направить на модификацию ДМГК соединениями, способствующими улучшению показателей качества криоконсервируемой спермы, в частности, антиоксидантами, а также оценку эффектов полученной композиции на замораживаемые мужские гаметы.

Благодарности (Acknowledgments)

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Госзадание № 121052600350-9).

Библиографический список

1. Croissant J. G., Fatieiev Y., Khashab N. M. Degradability and Clearance of Silicon, Organosilica, Silsesquioxane, Silica Mixed Oxide, and Mesoporous Silica Nanoparticles // *Advanced Materials*. 2017. Vol. 29. No. 9. Pp. 1–51. DOI: 10.1002/adma.201604634.
2. Ковтун С. І., Галаган Н. П., Щербак О. В., Троцький П. А. Методичні рекомендації з криоконсервації сперматозоїдів та ооцитів сільськогосподарських тварин і формування ембріонів in vitro. Чубинське: Інститут розведення і генетики тварин імені М. В. Зубця НААН, 2015. 17 с.
3. Manavitehrani I., Schindeler A., Parviz M. Mesoporous Silica Nanoparticles: Synthesis, Modification and Applications // *Nanomedicine, Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2018. Vol. 3. No. 2. P. 0001369.

4. Huang R., Shen Y. W., Guan Y. Y., Jiang Y. X., Wu Y., Rahman K., Zhang L. J., Liu H. J., Luan X. Mesoporous silica nanoparticles: facile surface functionalization and versatile biomedical applications in oncology // *Acta Biomaterialia*. 2020. Vol. 116. Pp. 1–15.
5. Бойко А. А., Ларченко Е. Ю., Хонина Т. Г., Чупахин О. Н. Исследования по стандартизации фармацевтической субстанции диметилглицеролата кремния // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2017. Т. 20. № 8. С. 13–17.
6. Van der Valk D. C., van der Ven C. F. T., Blaser M. C., Grolman J. M., Wu P. J., Fenton O. S., Lee L. H., Tibbitt M. W., Andresen J. L., Wen J. R., Ha A. H., Buffolo F., van Mil A., Bouten C. V. C., Body S. C., Mooney D. J., Sluijter J. P. G., Aikawa M., Hjortnaes J., Langer R., Aikawa E. Engineering a 3D-Bioprinted Model of Human Heart Valve Disease Using Nanoindentation-Based Biomechanics // *Nanomaterials* (Basel). 2018. Vol. 8. No. 5. P. 296.
7. Волкова И. М., Коровина Д. Г. Трехмерные матрицы природного и синтетического происхождения для клеточной биотехнологии // *Биотехнология*. 2015. № 2. С. 8–26. DOI: 10.1134/S0003683815090082.
8. Новичкова Д. А., Кузьмина Т. И. Влияние диметилглицеролата кремния и глицерина на экспансию кумулюсных клеток ооцитов *Sus scrofa domestica* // *Сборник тезисов VI Молодежной конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН*. Санкт-Петербург, 2018. С. 78–79.
9. Алимова А. Д., Кундик Ю. В., Станиславович Т. И., Кузьмина Т. И. Влияние диметилглицеролата кремния на жизнеспособность клеток гранулезы из овариальных фолликулов *Sus Scrofa Domestica* // *Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии*. 2019. № 2. С. 61–63. DOI: 10.17238/issn2072-6023.2019.
10. Алимова А. Д., Кузьмина Т. И. Влияние диметилглицеролата кремния на ооцит-кумуляные комплексы свиней при культивировании *in vitro* // *Ветеринария*. 2020. № 9. С. 46–49. DOI: 10.30896/0042-4846.2020.23.9.46-49.
11. Чистякова И. В., Кузьмина Т. И., Станиславович Т. И., Хонина Т. Г. Воздействие кремнийсодержащих соединений на развитие доимплантационных эмбрионов *Bos taurus* // *Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии*. 2018. № 3. С. 105–108.
12. Станиславович Т. И., Кузьмина Т. И., Молчанов А. В. Влияние интраовариальной витрификации на показатели криорезистентности ооцит-кумуляных комплексов свиней // *Вопросы ветеринарно-правового регулирования в ветеринарии*. 2019. № 4. С. 65–70. DOI: 10.17238/issn2072-6023.2019.4.65
13. Бойцева Е. Н., Бычкова Н. В., Кузьмина Т. И. Влияние наночастиц высокодисперсного кремнезема на апоптоз сперматозоидов *Bos Taurus* // *Цитология*. 2017. Т. 59. № 5. С. 375–380.
14. Aitken R. J. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage // *Molecular Reproduction and Development*. 2017. Vol. 84. No. 10. Pp. 1039–1052.
15. Nikitkina E., Musidray A., Krutikova A., Anipchenko P., Plemyashov K., Shiryayev G. Efficiency of Tris-Based Extender Steridyl for Semen Cryopreservation in Stallions // *Animals* (Basel). 2020. Vol. 10. No. 10. P. 1801.
16. Anzar M., Rajapaksha K., Boswall L. Egg yolk-free cryopreservation of bull semen [Электронный ресурс] // *PLoS One*. 2019. Vol. 14. No. 10. P. e0223977. URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0223977> (дата обращения: 10.11.2020).

Об авторах:

Алена Николаевна Накидкина¹, младший научный сотрудник лаборатории биологии развития, ORCID 0000-0002-3917-5065, AuthorID 695994; +7 904 646 88 59, alena_boiceva@mail.ru

Татьяна Ивановна Кузьмина¹, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник, заведующая лабораторией биологии развития, ORCID 0000-0002-2246-5277, AuthorID 78163; +7 921 392-19-47

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал Федерального исследовательского центра животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста, Пушкин, Россия

Evaluation of viability indicators of bovine spermatozoa after exposure to silicon dimethylglycerolate using flow cytofluorimetry

A. N. Nakidkina¹✉, T. I. Kuzmina¹

¹ Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding – Branch of the L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, Pushkin, Russia

✉E-mail: alena_boiceva@mail.ru

Abstract. Silicon and its dioxide (silica) demonstrate good biological compatibility and a wide range of physical and chemical properties, depending on the production and processing method. In particular, silicon dimethylglycerolate

(SDMG) has transmucous and transcutaneous drug conductivity, and, as a hydrogel, may be of interest for the oocytes and embryos cultivation medium structuring and/or media for cryopreservation/thawing of gametes. **The aim** of this study was to examine the effect of SDMG at concentrations of 0.2 % and 0.02 % on the transmembrane potential of mitochondria and cell viability of bovine spermatozoa. **Methods.** Sperm subpopulations were assessed for (non)viability indicators (disrupted transmembrane potential of mitochondria, externalization of phosphatidylserine and plasma membrane integrity loss) by flow cytometry with two sets of fluorescent probes. Mitochondrial transmembrane potential was measured using 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide (DiOC₆(3))/ethidium bromide, and externalization of phosphatidylserine – using Annexin V-FITC/propidium iodide pair. **The results** of this work indicate that SDMG in concentrations of 0.2 % and 0.02 % does not affect the transmembrane mitochondrial potential, externalization of phosphatidylserine or necrotic processes in the population of bovine spermatozoa. **The scientific novelty.** The data is obtained for the first time on the absence of cytotoxicity of SDMG for male gametes. Together with the shown positive effect of this compound on the morphological parameters and the state of nuclear chromatin of porcine oocytes after intrafollicular vitrification, it should be concluded that silicon-containing glycerohydrogels are of interest as a component of sperm cryopreservation/thawing media.

Keywords: spermatozoa, bulls, silicon dimethylglycerolate, mitochondria, apoptosis, necrosis.

For citation: Nakidkina A. N., Kuzmina T. I. Otsenka pokazateley zhiznesposobnosti spermatozoidov bykov posle vozdeystviya dimetilglitserolata kremniya s ispol'zovaniem metoda protochnoy tsitofluorimetrii [Evaluation of viability indicators of bovine spermatozoa after exposure to silicon dimethylglycerolate using flow cytofluorimetry] // Agrarian Bulletin of the Urals. 2021. No. 06 (209). Pp. 53–60. DOI: ... (In Russian.)

Date of paper submission: 03.03.2021, **date of review:** 26.04.2021, **date of acceptance:** 26.05.2021.

References

1. Croissant J. G., Fatieiev Y., Khashab N. M. Degradability and Clearance of Silicon, Organosilica, Silsesquioxane, Silica Mixed Oxide, and Mesoporous Silica Nanoparticles // *Advanced Materials*. 2017. Vol. 29. No. 9. Pp. 1–51. DOI: 10.1002/adma.201604634.
2. Kovtun S. I., Galagan N. P., Shcherbak O. V., Trots'kiy P. A. Metodichni rekomendatsii z kriokonservatsii spermatozoidiv ta ootsitiv sil's'kogospodars'kikh tvarin i formuvannya embrioniv in vitro [Guidelines for cryopreservation of spermatozoa and oocytes of farm animals and embryo formation in vitro] // Chubins'ke: Institut rozvedennya i genetiki tvarin imeni M. V. Zubtysya NAAN, 2015. 17 p. (In Ukrainian.)
3. Manavitehrani I., Schindeler A., Parviz M. Mesoporous Silica Nanoparticles: Synthesis, Modification and Applications // *Nanomedicine, Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2018. Vol. 3. No. 2. P. 0001369.
4. Huang R., Shen Y. W., Guan Y. Y., Jiang Y. X., Wu Y., Rahman K., Zhang L. J., Liu H. J., Luan X. Mesoporous silica nanoparticles: facile surface functionalization and versatile biomedical applications in oncology // *Acta Biomaterialia*. 2020. Vol. 116. Pp. 1–15.
5. Boyko A. A., Larchenko E. Yu., Khonina T. G., Chupakhin O. N. Issledovaniya po standartizatsii farmatsevticheskoy substantsii dimetilglitserolatov kremniya [The studies of the standardization of silicon derivatives of polyols substances] // *Problems of biological, chemical and pharmaceutical chemistry*. 2017. Vol. 20. No. 8. Pp. 13–17. (In Russian.)
6. Van der Valk D. C., van der Ven C. F. T., Blaser M. C., Grolman J. M., Wu P. J., Fenton O. S., Lee L. H., Tibbitt M. W., Andresen J. L., Wen J. R., Ha A. H., Buffolo F., van Mil A., Bouten C. V. C, Body S. C., Mooney D. J., Sluijter J. P. G., Aikawa M., Hjortnaes J., Langer R., Aikawa E. Engineering a 3D-Bioprinted Model of Human Heart Valve Disease Using Nanoindentation-Based Biomechanics // *Nanomaterials (Basel)*. 2018. Vol. 8. No. 5. P. 296.
7. Volkova I. M., Korovina D. G. Trekhmernye matriksy prirodnoho i sinteticheskogo proiskhozhdeniya dlya kletochnoy biotekhnologii [Three-dimensional matrixes of natural and synthetic origin for cell biotechnology] // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2015. Vol. 51. Pp. 841–856. DOI: 10.1134/S0003683815090082. (In Russian.)
8. Novichkova D. A., Kuz'mina T. I. Vliyanie dimetilglitserolata kremniya i glitserina na ekspansiyu kumulyusnykh kletok ootsitov *Sus scrofa domesticus* [Effect of silicon dimethylglycerolate and glycerol on the expansion of cumulus cells of *Sus scrofa domesticus* oocytes] // *Sbornik tezisev VI Molodezhnoy konferentsii po molekulyarnoy i kletochnoy biologii Instituta tsitologii RAN. Saint-Petersburg*, 2018. Pp. 78–79. (In Russian.)
9. Alimova A. D., Kundik Yu. V., Stanislavovich T. I., Kuz'mina T. I. Vliyanie dimetilglitserolata kremniya na zhiznesposobnost' kletok granulezy iz ovarial'nykh follikulov *Sus Scrofa Domesticus* [Effect of silicon dimethylglycerolate on the viability of granulosa cells from ovarian follicles of *Sus Scrofa Domesticus*] // *Voprosy normativno-pravovogo regulirovaniya v veterinarii*. 2019. No. 2. Pp. 61–63. DOI: 10.17238/issn2072-6023.2019. (In Russian.)
10. Alimova A. D., Kuz'mina T. I. Vliyanie dimetilglitserolata kremniya na ootsit-kumulyusnye komplekсы sviney pri kul'tivirovanii in vitro [Effect of silicon dimethylglycerolate on porcine oocyte-cumulus complexes at in vitro culture] // *Veterinariya*. 2020. No. 9. Pp. 46–49. DOI: 10.30896/0042-4846.2020.23.9.46-49. (In Russian.)
11. Chistyakova I. V., Kuz'mina T. I., Stanislavovich T. I., Khonina T. G. Vozdeystvie kremniysoderzhashchikh soedineniy na razvitie doimplantatsionnykh embrionov *Bos taurus* [The effect of silicon-containing compounds on

development of *Bos taurus* preimplantation embryos] // Voprosy normativno-pravovogo regulirovaniya v veterinarii. 2018. No. 3. Pp. 105–108. (In Russian.)

12. Stanislavovich T. I., Kuz'mina T. I., Molchanov A. V. Vliyanie intraovarial'noy vitrifikatsii na pokazateli kriorezistentnosti ootsit-kumulyusnykh kompleksov sviney [Effect of intraovarian vitrification on the indicators of cryoresistance in porcine cumulus-oocyte complexes] // Voprosy veterinarno-pravovogo regulirovaniya v veterinarii. 2019. No. 4. Pp. 65–70. DOI: 10.17238/issn2072-6023.2019.4.65. (In Russian.)

13. Boytseva E. N., Bychkova N. V., Kuz'mina T. I. Vliyanie nanochastits vysokodispersnogo kremnezema na apoptoz spermatozoidov Bos Taurus [Effects of highly dispersed silica nanoparticles on the apoptosis of *Bos taurus* spermatozoa] // Tsitologiya. 2017. Vol. 59. No. 5. Pp. 375–380.

14. Aitken R. J. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage // Molecular Reproduction and Development. 2017. Vol. 84. No. 10. Pp. 1039–1052.

15. Nikitkina E., Musidray A., Krutikova A., Anipchenko P., Plemyashov K., Shiryaev G. Efficiency of Tris-Based Extender Steridyl for Semen Cryopreservation in Stallions // Animals (Basel). 2020. Vol. 10. No. 10. P. 1801.

16. Anzar M., Rajapaksha K., Boswall L. Egg yolk-free cryopreservation of bull semen [e-resource] // PLoS One. 2019. Vol. 14. No. 10. P. e0223977. URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0223977> (date of reference: 10.11.2020).

Authors' information:

Alena N. Nakidkina¹, junior researcher of the laboratory of developmental biology, ORCID 0000-0002-3917-5065, AuthorID 695994; +7 904 646-88-59, alena_boiceva@mail.ru

Tatyana I. Kuzmina¹, doctor of biological sciences, professor, chief researcher, head of the laboratory of developmental biology, ORCID 0000-0002-2246-5277, AuthorID 78163; +7 921 392-19-47

¹ Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding – Branch of the L. K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, Pushkin, Russia