

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ВЫСОКОДИСПЕРСНОГО КРЕМНЕЗЕМА НА АПОПТОЗ СПЕРМАТОЗОИДОВ *BOS TAURUS*

© Е. Н. Бойцева,^{1,*} Н. В. Бычкова,² Т. И. Кузьмина¹

¹ *Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных, Санкт-Петербург—Пушкин, 196601, и*

² *Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А. М. Никифорова МЧС России, Санкт-Петербург, 197374;*

* *электронный адрес: alena_boiceva@mail.ru*

С применением проточной цитофлуориметрии охарактеризованы эффекты высокодисперсного кремнезема (ВДК, Аэросил А-300) на уровень апоптоза сперматозоидов быков. Образцы спермы инкубировали в течение 2 ч при 38.5 °С, 95 % влажности и 5 % CO₂ в среде с ВДК в различных концентрациях (0.02, 0.01, 0.001, 0.0001 и 0.00001 %). Обработка проб аннексином с одновременным окрашиванием иодистым пропидием показала, что в присутствии ВДК в концентрации 0.001 % уровень апоптоза в сперме быков снижается. Процентное содержание живых и некротических клеток в присутствии ВДК изменялось незначительно, не отличаясь достоверно ни от контрольной, ни от других экспериментальных групп. При использовании для оценки уровня апоптоза иодида 3,3'-дигексилоксакарбоцианина (DiOC₆(3)) в паре с бромистым этидием были получены противоречивые результаты: во всех образцах, инкубированных с ВДК, имело место снижение мембранного потенциала митохондрий в сперматозоидах по сравнению с контролем. Процент содержания некротических клеток колебался незначительно; процент интактных клеток снижался пропорционально увеличению процента спермиев со сниженным митохондриальным потенциалом. Полученные данные расширяют представления о механизмах воздействия кремнийсодержащих наноматериалов на жизнеспособность мужских гамет и деструктивные процессы в хроматине сперматозоида. Результаты исследования следует принять во внимание для дальнейшей оптимизации методов криоконсервации спермы.

Ключевые слова: апоптоз, мембранный потенциал митохондрий, высокодисперсный кремнезем, быки, сперматозоиды.

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода, ВДК — высокодисперсный кремнезем, ЗФР — забуференный физиологический раствор, ЭТС — эмбриональная телячья сыворотка, ЭТЦ — электрон-транспортная цепь, DiOC₆(3) — иодид 3,3'-дигексилоксакарбоцианин, ЕВ — бромистый этидий, PI — иодистый пропидий.

В условиях широкого применения методик искусственного осеменения животных и экстракорпорального оплодотворения у человека проблемы, связанные с деструкцией хроматина гамет, становятся все более значимыми. Исследования последнего десятилетия показывают, что одним из основных механизмов нарушения целостности генетического материала зрелых сперматозоидов является генерация активных форм кислорода (АФК), сопровождающаяся индукцией апоптоза (Marchetti et al., 2002; Aitken et al., 2011). Зрелые сперматозоиды в норме подвергаются апоптозу и последующему фагоцитозу в женских половых путях во избежание воспалительных реакций в результате распада погибших гамет. Тем не менее было обнаружено, что повышенный уровень подвергшихся апоптозу клеток в эякуляте влияет на оплодотворяющую способность спермы, снижая жизнеспособность гамет (Martin et al., 2007). Апоптоз сперматозоидов на сегодняшний день — малоизученный процесс, однако известно, что есть существенные отличия апоптоза мужских гамет от апоптоза соматических клеток. Во-первых,

одними из наиболее ранних событий внешнего пути апоптоза спермиев являются гиперпродукция АФК митохондриями клетки и сопутствующая потеря подвижности (Koppers et al., 2011). В норме синтез АФК в спермиях стимулирует процессы постэякуляционного созревания: в низких концентрациях АФК подавляют активность тирозинфосфатазы сперматозоидов, что приводит к продуцированию в клетке цАМФ, а это в свою очередь индуцирует капацитацию (Aitken, Curry, 2011; O'Flaherty, 2015). При повышенном уровне АФК в результате внешнего воздействия или дефектов системы антиоксидантной защиты клетки происходит «атака» на полиненасыщенные жирные кислоты спермия, что приводит к образованию цитотоксичных альдегидов, таких как 4-гидроксиноненал, малондиальдегид и акролеин (Aitken et al., 2012). Эти пероксиды липидов являются сильными электрофилами, которые связываются с нуклеофильными центрами близкорасположенных белков (Aitken et al., 2012). Некоторые непосредственные мишени пероксидов — белки-участники электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий.

В результате нарушения работы этих белков происходит «утечка» электронов из ЭТЦ, которые тут же взаимодействуют с кислородом, образуя АФК. Таким образом, оксидативный стресс, вызванный дисфункцией митохондрий, становится самоподдерживающимся процессом, который приводит к гибели клетки по сокращенной версии внутреннего пути апоптоза (Korpers et al., 2011). Следующими событиями являются активация каспазного каскада и экспрессия на поверхности клетки фосфатидилсерина (обнаруживаемого с помощью аннексина V), что является сигналом «тихого» поглощения погибающих спермиев макрофагами, без выброса провоспалительных цитокинов. Здесь также отмечаются различия между апоптозом в соматических клетках и в сперматозоидах: фагоциты поглощают гибнущие спермии задолго до повреждения ДНК нуклеазами, тогда как у соматических клеток на этом этапе происходит активация эндонуклеаз митохондрий и цитоплазмы и их транспорт в ядро для «разрезания» нитей ДНК. В сперматозоидах вышеуказанный процесс невозможен по двум причинам. Во-первых, ядро спермиев содержит очень мало нуклеосом: большинство из них удаляется из клетки в процессе сперматогенеза. Во-вторых, сперматозоиды отличаются от других типов клеток локализацией клеточных компарментов: ядра в мужских гаметах отделены от митохондрий и цитоплазмы средней части клетки, в силу чего активированные эндонуклеазы не способны проникнуть в ядро. Вполне возможно, что необходимость защиты хроматина спермия от эндонуклеаз и стала главным фактором, определившим строение сперматозоида, характерное для большинства видов (Aitken et al., 2015). В таких условиях возможно проникновение в ядро сперматозоида только пероксида водорода, поэтому повреждение ДНК при апоптозе сперматозоидов в большинстве являются окислительно-индуцированными.

Высокодисперсный кремнезем — соединение, которое в случае добавления к сперме быков при криоконсервации способно повышать выживаемость и подвижность сперматозоидов после оттаивания (Чуйко, 2003; Настасієнко и др., 2010). Исследования свойств пирогенных кремнезёмов, к которым относится ВДК, стартовали в 80-х годах прошлого века. В частности, были проведены эксперименты, где к лактозо-глицеринно-желточной среде, в которой в дальнейшем криоконсервировали сперму быков, добавляли ВДК (Аэросил А-300) (Чуйко, 2003). Оценка подвижности, времени выживаемости при 38 °С и способности к оплодотворению *in vivo* и *in vitro* показала, что ВДК в малых концентрациях (оптимально — 0.01 %) способен повышать качество криоконсервированной спермы быков по всем вышеуказанным показателям. Похожие свойства были обнаружены у метилаэросила и ВДК, модифицированного метилхлорсиланами, причем последние влияют на показатели подвижности и жизнеспособности криоконсервированной спермы после оттаивания (Чуйко, 2003; Настасієнко и др., 2010). Существует мнение о том, что такое действие аморфных кремнезёмов объясняется способностью ВДК замедлять потерю клетками некоторых ферментов, необходимых для оплодотворения, в том числе гиалуронидазы (Настасієнко и др., 2010). Также было выдвинуто предположение о том, что увеличение жизнеспособности клеток при добавлении ВДК и его модификаций связано с изменением вязкости среды (Галаган и др., 2005), однако такой механизм был оспорен в более поздней работе (Настасієнко и др., 2010). Ранее в нашей лаборатории были

получены данные, свидетельствующие о способности ВДК (А-300) в концентрации 0.001 % стимулировать капцитацию сперматозоидов быков (Бойцева и др., 2015). Цель настоящего исследования — изучение влияния ВДК в различных концентрациях на уровень апоптоза в нативной сперме быков. При выборе концентраций ВДК руководствовались представленными в литературе данными, в том числе полученными в наших предыдущих исследованиях (Чуйко, 2003; Настасієнко и др., 2010; Бойцева и др., 2015).

Материал и методика

Подготовка клеток ВДК, использованный в работе, был синтезирован в Институте химии поверхности им. А. А. Чуйко НАН Украины (Чуйко, 2003; Настасієнко и др., 2010). Все остальные использованные реагенты — продукты компании Sigma (Sigma-Aldrich, США).

Работу проводили на свежей сперме, получаемой в день эксперимента от быков голштинской породы. Все манипуляции осуществляли с использованием термостолка во избежание холодового шока сперматозоидов. Клетки отмывали от семенной плазмы двукратным центрифугированием при 300 *g* в течение 10 мин в среде Sp-TALP (pH 7.4), состоящей из 100 мМ NaCl, 3.1 мМ KCl, 25 мМ NaHCO₃, 0.3 мМ NaH₂PO₄, 21.6 мМ лактата натрия, 0.5 мМ CaCl₂, 0.4 мМ MgCl₂, 10 мМ HEPES, 1 мМ пирувата и 0.1 % поливинилалкоголя (мол. масса 30—70 кДа). Осадок ресуспендировали в растворе, содержащем 140 мМ NaCl, 4.7 мМ KCl, 1.1 мМ CaCl₂, 10 мМ глюкозы и 10 мМ HEPES, pH среды 7.4 (далее раствор Na-HEPES) (Lozano et al., 2009). Далее сперматозоиды в концентрации 50 млн/мл инкубировали в течение 2 ч при 38.5 °С, 95 % влажности и 5 % CO₂ в присутствии ВДК (в концентрациях 0.02, 0.01, 0.001, 0.0001 и 0.00001 %).

Проточная цитофлуориметрия. Для оценки мембранного потенциала митохондрий к 100 мкл клеточной суспензии (2 · 10⁶—3 · 10⁶ кл./мл) добавляли 20-кратный рабочий раствор иодида 3,3'-дигексилосакарбонина (DiOC₆(3), Invitrogen, США), получая конечную концентрацию DiOC₆(3) 20 нМ (Цуркан и др., 2013). Рабочий раствор готовили *ex tempore*, добавляя к 10 мкл стокового раствора (1 мг/мл DiOC₆(3) в ДМСО) 4900 мкл забуференного физиологического раствора (ЗФР). После внесения красителя образцы тщательно перемешивали и инкубировали в течение 20 мин при 37 °С, 95 % влажности и 5 % CO₂ в защищенном от света месте. По завершении инкубации образцы отмывали избытком ЗФР, содержащего 2 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС; 8 мин при 300 *g*). После этого надосадок удаляли, а клеточный осадок переводили в 100 мкл свежего ЗФР. В полученную клеточную суспензию вносили 10 мкл раствора бромистого этидия (EB; Sigma-Aldrich, США), получая конечную концентрацию EB 1 мкг/мл. Далее образцы инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте. По завершении инкубации в образцы вносили по 200 мкл ЗФР и затем анализировали на проточном цитометре Cytomics FC 500 (BECKMAN-COULTER, США). На основании параметров прямого и бокового светорассеяния был выбран регион для анализа клеток, включающий в себя 5000 событий в каждой пробе. Регистрацию флуоресценции сперматозоидов, окрашенных DiOC₆(3), проводили на первом канале (FL1) проточного анализатора. Регистрацию флуоресценции

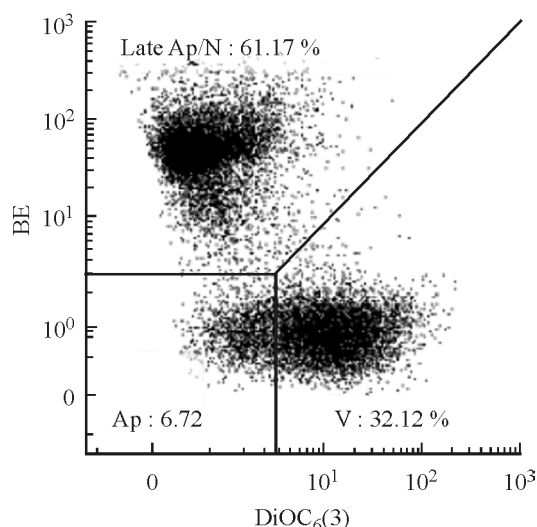


Рис. 1. Распределение сперматозоидов быков по флуоресценции DiOC₆(3) (по горизонтали) и бромистого этидия (BE, по вертикали) после инкубации в среде с 0.001 % ВДК.

Late Ap/N — клетки в состоянии позднего апоптоза и (или) некроза, Ap — клетки в состоянии раннего апоптоза, V — живые клетки.

некротических клеток, окрашенных EB, проводили на третьем канале (FL3) проточного анализатора (рис. 1). Напряжение на фотоэлектронных умножителях цитометра выставляли по негативному контролю, которым являлись неокрашенные клетки. Результаты выражали в процентах от общего количества проанализированных событий.

Для оценки экстернализации фосфатидилсерина клетки в концентрации $2 \cdot 10^6$ — $3 \cdot 10^6$ были ресуспендированы в 500 мкл ЗФР, содержащего 2 % ЭТС, и окрашены 5 мкл аннексина V, конъюгированного с FITC, и 5 мкл иодистого пропидия (PI) из набора Annexin V-FITC Apoptosis detection kit (Sigma-Aldrich, США). Клетки инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 5 мин согласно инструкции к набору. По окончании инкубации пробы анализировали на проточном цитометре

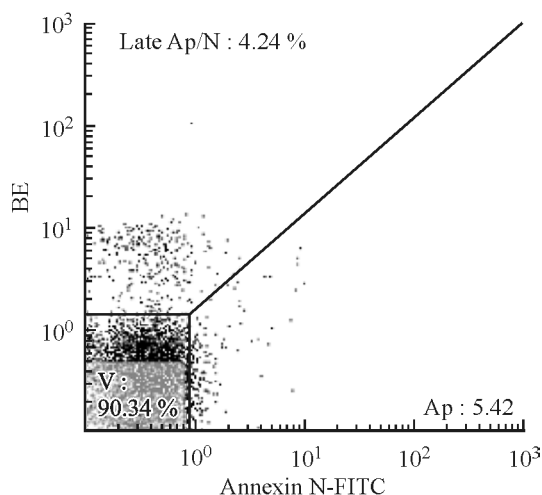


Рис. 2. Распределение сперматозоидов быков по флуоресценции Annexin V-FITC (по горизонтали) и йодистого пропидия (PI, по вертикали) после инкубации в среде с 0.001 % ВДК.

Late Ap/N — клетки в состоянии позднего апоптоза и (или) некроза, Ap — клетки в состоянии раннего апоптоза, V — живые клетки.

Cytomics FC 500 (BECKMAN-COULTER, США). На основании параметров прямого и бокового светорассеяния был выбран регион для анализа клеток, включающий в себя 5000 событий в каждой пробе. Регистрацию флуоресценции сперматозоидов, 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. 2). Напряжение на фотоэлектронных умножителях цитометра выставляли по негативному контролю, которым являлись неокрашенные клетки. Результаты выражали в процентах от общего количества проанализированных событий.

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

Результаты

Использование набора Annexin V-FITC Apoptosis detection kit для оценки соотношения количества живых клеток и клеток в состоянии апоптоза и некроза обусловлено особенностями входящих в него красителей. Аннексин V-FITC обладает высоким сродством к фосфатидилсерину, экстернализация которого служит индикатором инициации апоптоза. Иодистый пропидий же способен проникать только в клетки с поврежденной мембраной и, таким образом, идентифицирует некротические клетки (так как для апоптоза характерно сохранение целостности мембраны вплоть до последних этапов программированной клеточной гибели). Таким образом, живые клетки не будут окрашиваться ни одним красителем (Annexin V⁻/PI⁻), свечение апоптотических сперматозоидов будет регистрироваться исключительно по каналу, предназначенному для детекции аннексина (Annexin V⁺/PI⁻), а некротические клетки и клетки на поздних стадиях апоптоза будут окрашиваться иодистым пропидием или обоими красителями сразу (Annexin V⁺/PI⁺). Оценку экстернализации фосфатидилсерина проводили для четырех концентраций ВДК — 0.02, 0.01, 0.001 и 0.0001 %, и ее результаты отражены в табл. 1.

Контролем служил образец, к которому вместо ВДК добавляли равное количество раствора Na-HEPES. В большинстве случаев инкубация в присутствии ВДК приводила к снижению средних значений процентного содержания Annexin V⁺/PI⁻ клеток по сравнению с контролем, а для концентрации 0.001 % это снижение было статистически значимым ($p < 0.03$).

Метод оценки мембранного потенциала митохондрий с помощью DiOC₆(3) основан на способности этого красителя свободно проникать через билипидный слой (через клеточную мембрану, а также через внешнюю и внутреннюю мембраны митохондрий) и накапливаться в областях с высокой концентрацией протонов (Цуркан и др., 2013). Концентрация протонов снижается при нарушении работы митохондрий, что может привести к запуску физиологической гибели клетки. Бромистый этидий имеет свойства, сходные с таковыми иодистого пропидия (см. выше), т. е. проникает в клетки с нарушенной целостностью мембраны и флуоресцентно окрашивает нуклеиновые кислоты. Таким образом, живые клетки будут обладать яркой флуоресценцией DiOC₆(3), но не будут накапливать бромистый этидий (DiOC₆(3)⁺/EB⁻). Клетки, находящиеся на ранних стадиях апоптоза, не будут окра-

Т а б л и ц а 1

Влияние наночастиц высокодисперсного кремнезема на жизнеспособность нативной спермы быков по результатам теста с аннексином

Концентрация ВДК, %	Доля клеток, %		
	живые клетки Annexin V ⁻ /PI ⁻	апоптоз Annexin V ⁺ /PI ⁻	некроз Annexin V ⁺ /PI ⁺
0 (контроль)	90.86 ± 3.09	6.90 ^a ± 2.44	2.24 ± 0.73
0.02	88.28 ± 2.14	7.02 ± 1.82	4.70 ± 2.52
0.01	91.70 ± 1.96	4.94 ± 0.91	3.36 ± 1.70
0.001	91.18 ± 2.82	5.96 ^b ± 1.55	2.86 ± 1.58
0.0001	91.2 ± 2.52	6.56 ± 1.81	2.24 ± 0.71

Примечание. ^{a, б} Различия между отмеченные группы достоверны для $p < 0.03$. Достоверность различия сравниваемых средних значений для 9 независимых экспериментов оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Концентрация клеток в суспензии при проведении измерений ~1 млн/мл.

шиваться ни одним зондом (DiOC₆(3)⁻/EB⁻), тогда как спермии, находящиеся на поздней стадии апоптоза, и некротические спермии, не будут накапливать DiOC₆(3), но будут окрашиваться бромистым этидием (DiOC₆(3)⁻/BE⁺). В наших исследованиях проведена оценка митохондриального потенциала для тех же образцов, что и при использовании набора Annexin V-FITC, и дополнительно для образца, инкубированного в присутствии 0.00001 % ВДК. При анализе процентного содержания клеток в состоянии апоптоза и некроза с помощью метода оценки мембранного потенциала мы получили данные с более значительным разбросом, чем в случае детекции экстернализации фосфатидилсерина. Для всех образцов, инкубированных с ВДК, было зарегистрировано достоверное увеличение количества DiOC₆(3)⁻/BE⁻ клеток по сравнению с контролем (табл. 2). Содержание клеток с проницаемой мембраной менялось незначительно, но было выше, чем в экспериментах с использованием на-

Т а б л и ц а 2

Влияние наночастиц высокодисперсного кремнезема на жизнеспособность нативной спермы быков по результатам теста с DiOC₆(3)

Концентрация ВДК, %	Доля клеток, %		
	живые клетки DiOC ₆ (3) ⁺ /EB ⁻	сниженный МПМ DiOC ₆ (3) ⁻ /PI ⁻	некроз DiOC ₆ (3) ⁻ /PI ⁺
0 (контроль)	35.33 ^a ± 4.08	3.46 ^b ± 1.73	61.21 ± 4.56
0.02	32.61 ± 6.57	6.71 ^г ± 3.21	60.67 ± 8.58
0.01	32.54 ± 7.39	6.79 ^а ± 2.66	60.67 ± 9.93
0.001	31.66 ± 4.92	8.63 ^с ± 2.82	59.71 ± 7.37
0.0001	30.66 ± 6.70	9.10 ^ж ± 3.65	60.24 ± 9.55
0.00001	30.70 ^б ± 4.83	8.36 ^з ± 3.11	60.94 ± 7.77

Примечание. МПМ — мембранный потенциал митохондрий. Буквенными коэффициентами обозначены достоверные различия между группами: ^{a, б} — $p < 0.03$; ^{в, г} — $p < 0.05$; ^{д, л} — $p < 0.04$; ^{в, с} — $p < 0.002$; ^{в, ж} — $p < 0.003$; ^{в, з} — $p < 0.006$. Достоверность различий сравниваемых средних значений для 12 независимых экспериментов оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Концентрация клеток в суспензии при проведении измерений ~1 млн/мл.

бора Annexin V-FITC Apoptosis detection kit, что мы связываем с более длительной подготовкой проб в случае окрашивания DiOC₆(3). Среднее значение процентного содержания интактных клеток снижалось пропорционально повышению содержания спермиев со сниженным митохондриальным потенциалом, в случае концентрации ВДК 0.00001 % это снижение было статистически достоверным ($p < 0.03$).

Обсуждение

Данные об уровне апоптоза в популяции сперматозоидов быков, полученные при использовании различных маркеров, позволяют сделать определенные предположения как о механизме воздействия ВДК, так и о роли апоптоза в отборе пригодных для оплодотворения сперматозоидов. Снижение митохондриального потенциала не всегда ведет к гибели клетки, тогда как экстернализация фосфатидилсерина является сигналом к действию для макрофагов и приводит к поглощению гибнущего спермия фагоцитами. В этом плане представляют интерес данные, полученные при одновременном окрашивании аннексином и DiOC₆(3) лейкозных клеток и Т-лимфоцитов (Ozgen et al., 2000). Несмотря на наличие корреляции между уровнем апоптоза по результатам использования аннексина и DiOC₆(3), при несколько большем количестве апоптотических клеток в случае использования DiOC₆(3) (что отражает более ранние изменения, детектируемые этим красителем) возможна и иная ситуация. Понижение по сравнению с контролем доли апоптотических клеток, выявляемых с помощью аннексина V, при одновременном повышении (также по сравнению с контролем) доли клеток со сниженным митохондриальным потенциалом по результатам окраски того же образца DiOC₆(3) можно объяснить работой системы антиоксидантной защиты клетки (Ozgen, 2000). В нашем исследовании показано, что ВДК стимулирует снижение митохондриального потенциала, но при этом гибель сперматозоидов по механизму апоптоза в популяции уменьшается, также не происходит увеличения количества спермиев, гибнущих путем некроза. Известно, что АФК играют важную роль не только в индукции апоптоза, но и в процессе капацитации сперматозоидов (Aitken et al., 2015). Мы предполагаем, что одним из эффектов ВДК является стимуляция образования АФК, которые окисляют холестерол плазматической мембраны, в результате чего повышаются текучесть мембраны и ее проницаемость для кальция. Возможно, для части популяции сперматозоидов концентрация АФК, генерируемых под воздействием ВДК, становится чрезмерной, происходит описанная выше цепь событий, ведущая к нарушению работы электрон-транспортной цепи митохондрий и снижению митохондриального потенциала (Aitken et al., 2015). Однако существует критическая точка (критическое значение концентрации АФК), разделяющая апоптоз и капацитацию, и если она не пройдена, потеря работоспособности митохондрий обратима. Мы полагаем, полученные данные свидетельствуют о том, что ВДК способен удерживать равновесие на стороне капацитации, не позволяя окислительным повреждениям принять необратимый характер, что, возможно, объясняется его адсорбционными свойствами. Известно, что пирогенные кремнеземы имеют тропность к биополимерам (на чем основан бактериостатический эффект аэросилов, описанный во многих научных трудах) (Нико-

лаев и др., 2005). Также показано, что в месте контакта частиц пирогенных кремнезёмов и клеток образуются слои воды с измененными свойствами, что приводит к ускорению массообмена в зоне рецепторов и систем, ответственных за поступление питательных веществ и удаление метаболитов у растений (Юхименко и др., 2008). Мы предполагаем, что ВДК, взаимодействуя с плазматической мембраной спермиев, благодаря своим вышеуказанным свойствам ускоряет процессы, связанные с АФК (окисление стеролов мембраны, работу NADPH-оксидазы), что ведет к стимуляции капацитации (Бойцева и др., 2015). С другой стороны, такое действие ВДК стимулирует и дополнительное образование АФК, что ведет к оксидативному стрессу и снижению мембранного потенциала митохондрий. Однако, как мы полагаем, ВДК способен нейтрализовать «лишние» АФК путем косвенной стимуляции системы антиоксидантной защиты клетки, взаимодействуя с рецепторами на поверхности клетки.

Описанный «двойной эффект» ВДК хорошо согласуется с предложенной недавно моделью (Aitken et al., 2015), согласно которой апоптоз и капацитация являются «двумя сторонами одной медали», и в основе этого эффекта находится зависимость от уровня АФК. Сперматозоидам необходима продукция АФК для осуществления капацитации, без которой оплодотворение невозможно; в то же время такой АФК-зависимый механизм постэякуляционного созревания опасен для этих клеток, потому что продукция АФК является и индуктором апоптоза мужских гамет. Только популяция сперматозоидов, достаточный процент клеток в которой способен «балансируют» на тонкой грани между апоптозом и капацитацией, сможет успешно оплодотворить яйцеклетку. При этом задачей исследователей, стремящихся повысить качество криоконсервированной спермы, является создание методов, способствующих поддержанию этого баланса. В данном аспекте модернизация отдельных этапов технологии замораживания мужских гамет млекопитающих путем введения в состав криопротекторных сред кремнийсодержащих соединений, в частности наночастиц высокодисперсного кремнезема, или их добавление в среды для размораживания является перспективным подходом в решении проблемы криорезистентности сперматозоидов. Проведенная работа является фрагментом исследований, направленных на модернизацию технологии криоконсервации сперматозоидов, в частности моделирование состава криопротекторов. Полученные данные и выдвинутые на основе их анализа предположения о возможных механизмах влияния наночастиц ВДК на показатели жизнеспособности мужских гамет и деструктивные процессы в хроматине сперматозоида позволяют углубить имеющиеся знания о механизмах функционирования мужских гамет и сформировать концептуальное понимание биологических эффектов наночастиц ВДК на биологические объекты.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан (регистрационный номер 0115РК00728).

Список литературы

Бойцева Е. Н., Денисенко В. Ю., Кузьмина Т. И. 2015. Оценка показателей постэякуляционного созревания сперматозоидов *Bos taurus* хлортетрациклиновым тестом. Онтогенез. 46 (6) : 362—367. (Boitseva E. N., Denisenko V. Yu., Kuz'mi-

na T. I. 2015. Evaluation of indicators of postejaculation maturation of spermatozoa of *Bos taurus* using a chlortetracycline test. Russ. J. Develop. Biol. 46 (6) : 362—367.)

Николаев В. Г., Михаловский С. В., Гурина Н. М. 2005. Современные энтеросорбенты и механизмы их действия. Эфферентная терапия. 11 (4) : 3—17. (Nikolayev V. G., Mikhailovskiy S. V., Gurina N. M. 2005. Modern enterosorbents and mechanisms of their action. Efferent Therapy. 11 (4) : 3—17.)

Цуркан М. В., Кудрявцев И. В., Серебрякова М. К., Негворова Ю. С., Трулев А. С., Назарова И. В., Смолянская А. А., Назаров П. Г., Полевщиков А. В. 2013. Воздействие излучения диапазона 0.05—1.2 ТГц на мембранный потенциал митохондрий. Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики. 4 (86) : 56—61. (Tsurkan M. V., Kudryavtsev I. V., Serebryakova M. K., Negovorova Yu. S., Trulyov A. S., Nazarova I. V., Smolyanskaya O. A., Nazarov P. G., Polevshchikov A. V. 2013. Radiation influence in the range of 0.05 ÷ 2 THz on mitochondrial membrane potential. Scientific and Technical Journal of Information Technologies, Mechanics and Optics. 4 (86) : 56—61.)

Чуйко А. А. (Ред.). 2003. Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния. Киев: Наукова думка. 417 с. (Chuyko A. A. 2003. Medicinal chemistry and clinical use of silicon dioxide. Kiev: Naukova Dumka. 417 p.)

Юхименко Е. В., Гунько В. М., Туров А. В., Горбык П. П., Туров В. В. 2008. Гидратные структуры в наноструктурных системах на основе высокодисперсного кремнезема и влияние их на биомолекулы растительного происхождения. Наносистемы, нанотехнологии, нанотехнології. 6 (1) : 303—313. (Yukhymenko E. V., Gun'ko V. M., Turov A. V., Gorbyk P. P., Turov V. V. 2008. Hydrate structures in nanostructured systems based on highly refined silica and their impact on biomolecules of vegetable origin. Nanosystems, Nanomaterials, Nanotechnologies. 6 (1) : 303—313.)

Галаган Н. П., Власенко В. В., Настасієнко Н. С., Чуйко О. О. 2005. Дослідження впливу високодисперсного кремнезему, модифікованого поліолами, на життєдіяльність репродуктивних клітин методом фотон-кореляційної спектроскопії. Вісн. Харк. ун-ту; Біофізичний вісн. 1 (15) : 94—99. (Galagan N. P., Vlasenko V. V., Nastasienko N. S., Chuyko O. O. 2005. Effects of highly dispersed silica modified by polyols on reproductive cells life-sustaining activities by means of photon-correlation spectroscopy. Kharkiv Univ. J.; Biophys. J. 1 (15) : 94—99.)

Настасієнко Н. С., Кузема П. О., Галаган Н. П., Покровський В. А. 2010. Дослідження біологічної активності кремнеземів, модифікованих ді- та триметилсілілними групами і сорбітом, по відношенню до сперматозоїдів кібів методом фотон-кореляційної спектроскопії. Фізика живого. 18 (3) : 99—106. (Nastasienko N. S., Kuzema P. O., Galagan N. P., Pokrovskiy V. A. 2010. Study of biological activity of silica, modified by di- and trimethylsilyl groups and sorbitol, with respect to bovine spermatozoa by means of photon-correlation spectroscopy. Physics of the Alive. 18 (3) : 99—106.)

Aitken R. J., Baker M. A., Nixon B. 2015. Are sperm capacitation and apoptosis the opposite ends of a continuum driven by oxidative stress? Asian J. Androl. 17 : 633—639.

Aitken R. J., Curry B. J. 2011. Redox regulation of human sperm function: from the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line. Antioxid. Redox Signal. 14 : 367—381.

Aitken R. J., Findlay J. K., Hutt K. J., Kerr J. B. 2011. Apoptosis in the germ line. Reproduction. 141 : 139—150.

Aitken R. J., Whiting S., De Iulius G. N., McClymont S., Mitchell L. A., Baker M. A. 2012. Electrophilic aldehydes generated by sperm metabolism activate mitochondrial reactive oxygen species generation and apoptosis by targeting succinate dehydrogenase. J. Biol. Chem. 287 : 33 048—33 060.

Koppers A. J., Wang P., Lin M., Aitken R. J. 2011. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathway involvement in a truncated apoptotic cascade associated with motility loss and oxidative DNA damage in human spermatozoa. Biochem. J. 436 : 687—698.

Lozano G. M., Bejarano I., Espino J., Gonzalez D., Ortiz A., Garcia J. F., Rodriguez A. B., Pariente J. A. 2009. Relationship between caspase activity and apoptotic markers in human sperm in response to hydrogen peroxide and progesterone. *J. Reprod. Develop.* 55 : 615—621.

Marchetti C., Obert G., Deffosez A., Formstecher P., Marchetti P. 2002. Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. *Hum. Reprod.* 17 : 1257—1265.

Martin G., Cagnon N., Sabido O., Sion B., Grizard G., Durand P., Levy R. 2007. Kinetics of occurrence of some features of apoptosis during the cryopreservation process of bovine spermatozoa. *Hum. Reprod.* 22 : 380—388.

O'Flaherty C. 2015. Redox regulation of mammalian sperm capacitation. *Asian J. Androl.* 17 : 583—590.

Ozgen U., Savasan S., Buck S., and Ravindranath Y. 2000. Comparison of DiOC₆(3) uptake and Annexin V labeling for quantification of apoptosis in leukemia cells and non-malignant T lymphocytes from children. *Cytometry.* 42 : 74—78.

Поступила 25 I 2017

EFFECTS OF HIGHLY DISPERSED SILICA NANOPARTICLES ON THE APOPTOSIS OF *BOS TAURUS* SPERMATOZOA

E. N. Boytseva,¹* N. V. Bychkova,² T. I. Kuzmina¹

¹ Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding, St. Petersburg—Pushkin, 196601, and

² The Federal State Institute of Public Health «The A. M. Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine» NRCERM, EMERCOM of Russia, St. Petersburg, 197374;

* e-mail: alena_boiceva@mail.ru

Effects of highly dispersed silica (HDS, Aerosil A-300) on the level of apoptosis in bull sperm were characterized using flow cytometry. Sperm samples were incubated for 2 hours at 38.5 °C, 95 % humidity and 5 % CO₂ in the medium with various HDS concentrations (0.02, 0.01, 0.001, 0.0001 and 0.00001 %). Annexin V-FITC propidium iodide staining revealed reduced apoptosis level in bull sperm incubated in the presence of 0.001 % FDS. The percentage of intact and necrotic cells fluctuated slightly, and these ranges did not show any statistically significant differences with the control and between any groups of experiment. Evaluation of apoptosis level in bull sperm using 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide (DiOC₆(3)) ethidium bromide staining showed contradictory results: all samples incubated with the HDS showed a decreased mitochondrial membrane potential in sperm cells compared to control. The level of necrotic cells fluctuated slightly; percentage of intact cells decreased in accordance with the increase in the level of spermatozoa with decreased mitochondrial potential. The data obtained and their analysis complement current knowledge concerning mechanisms of silicon nanomaterials impact on the male gametes viability and destructive processes in sperm chromatin. Such an observation should be taken in consideration for further optimization of sperm cryopreservation techniques.

Key words: apoptosis, highly dispersed silica, bull spermatozoa, mitochondrial membrane potential.