

На правах рукописи

Миронова Анна Геннадьевна

**ВЛИЯНИЕ ХОЛЕСТЕРИНА НА КРИОТОЛЕРАНТНОСТЬ
СПЕРМАТОЗОИДОВ ЧЕЛОВЕКА**

1.5.2. Биофизика

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор физико-математических
наук, профессор
Тихонов Александр Николаевич

Москва – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1. Двухфакторная гипотеза в криобиологии.....	10
1.2. Особенности сперматозоида как объекта криобиологии	11
1.3. Структура липидного бислоя биологических мембран.....	14
1.4. Роль холестерина в латеральной организации липидного бислоя и определении физико-химических свойств мембраны.....	20
1.5. Структурные («фазовые») переходы в мембранах	26
1.6. Фазовые переходы в модельных системах	28
1.7. Особенности липидного состава мембраны сперматозоидов.....	30
1.8. Функции холестерина в сперматозоидах	32
1.9. Способы модификации липидного состава мембраны.....	35
1.9.1. Модификация криопротекторной среды яичным желтком.....	35
1.9.2. Модификация мембран сперматозоидов соевым лецитином	36
1.9.3. Модификация мембран сперматозоидов холестерином с помощью липосом с холестерином или комплексов циклодекстрины – холестерин	37
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	39
2.1. Оценка концентрации, подвижности и жизнеспособности сперматозоидов.....	39
2.2. Криоконсервация сперматозоидов	40
2.3. Оценка фрагментации ДНК сперматозоидов в нативном и.....	41
криоконсервированных – размороженных образцах.....	41
2.4. Модификация криопротекторной среды яичным желтком	43
2.5. Определение концентрации холестерина в мембранах сперматозоидов человека	43
2.5.1. Определение концентрации холестерина в мембранах сперматозоидов ферментативно-колориметрическим методом	44
2.5.2. Определение концентрации холестерина в мембранах сперматозоидов методом Либермана-Бурхарда	44
2.5.3. Определение концентрации холестерина в мембранах сперматозоидов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии	45
2.5.4. Определение концентрации холестерина в мембранах сперматозоидов методом инфракрасной спектроскопии	45
2.6. Оценка цитотоксичности метилированных β -циклодекстринов и их комплексов с холестерином по отношению к сперматозоидам человека	46
2.7. Оценка способности метилированных β -циклодекстринов к экстракции холестерина из мембран сперматозоидов.....	47
2.8. ЭПР-исследование.....	47
2.8.1. ЭПР-исследование липосом с различным содержанием холестерина.....	47
2.8.2. Влияние метилированных β -циклодекстринов на спектр ЭПР зонда 5-доксил стеарата в сперматозоидах.....	47

2.9. Оценка способности комплексов метилированных β -циклодекстринов с холестерином к насыщению мембраны сперматозоидов холестерином.....	48
2.10. Определение оптимальной концентрации комплексов метилированных β -циклодекстринов с холестерином для повышения криотолерантности сперматозоидов	49
2.11. Рентгеноструктурный анализ	49
2.12. Статистическая обработка.....	49
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ.....	51
3.1. Фрагментация ДНК сперматозоидов до и после криоконсервации	51
3.2. Эффективность модификации криопротекторной среды яичным желтком	55
3.3. Концентрация холестерина в мембранах сперматозоидов человека	58
3.4. Цитотоксичность метилированных β -циклодекстринов и их комплексов с холестерином по отношению к сперматозоидам человека	62
3.5. Исследование мембраны сперматозоидов с помощью метода спиновых зондов: взаимодействие с метилированными β -циклодекстринами.....	68
3.6. Влияние содержания холестерина на спектр ЭПР зонда 5-доксил стеарата в липосомах	69
3.7. Влияние метилированных β -циклодекстринов на спектр ЭПР зонда 5-доксил стеарата в мембранах сперматозоидов	72
3.8. Насыщение мембраны сперматозоидов холестерином с помощью комплексов метилированных β -циклодекстринов с холестерином	77
3.10. Определение оптимальной концентрации комплексов метилированных β -циклодекстринов с холестерином для повышения криотолерантности сперматозоидов человека.....	80
3.11. Анализ кристаллообразования в криопротекторной среде Sperm Freeze после добавления метилированных β -циклодекстринов и их комплексов с холестерином методом рентгеноструктурного анализа	85
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	86
ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ	90
БЛАГОДАРНОСТИ	91
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	92
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	94

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Криоконсервация сперматозоидов является важной составляющей современной репродуктивной медицины, широко применяемой в программах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) при необходимости долгосрочного хранения гамет, а также для создания банков донорской спермы [1–4]. Несмотря на значительный прогресс в области криобиологии в целом, эффективность криоконсервации сперматозоидов остаётся довольно низкой. После размораживания 40–60 % сперматозоидов от изначального количества подвижных клеток в нативном образце утрачивают свою подвижность, что является особенно критичным при заморозке малого числа клеток [4; 5].

Классическая двухфакторная гипотеза, сформулированная П. Мазуром [6], предполагает, что гибель клеток при замораживании обусловлена двумя альтернативными механизмами: образованием внутриклеточного льда при высокой скорости охлаждения и дегидратацией – при низкой. Однако для сперматозоидов данная модель требует уточнения. С использованием криосканирующей электронной микроскопии Д. Моррис и соавторы [7] показали, что независимо от скорости заморозки в сперматозоидах не образуется внутриклеточный лед. Фактическое отсутствие внутриклеточного льда делает преимущественным механизм повреждения, связанный с деструктивными осмотическими и структурными («фазовыми») эффектами в мембранах.

При понижении температуры структура липидов мембраны изменяется преимущественно в результате переходов, имеющих характер «фазовых» перестроек [8]. В условиях, когда в липидном бислое могут происходить такие изменения, могут сосуществовать области жидкокристаллической и гелевой фаз, что способствует возникновению микродефектов в структуре мембраны [9]. Связанное с этим перераспределение мембранных белков в мембране, в свою очередь, может способствовать образованию белковых агрегатов, что в конечном итоге будет приводить к необратимой утрате некоторых функций мембраны [10]. Осмотические процессы, возникающие при добавлении и удалении криопротекторной среды и в результате кристаллизации воды, также могут вызывать повреждения мембран клеток [11]. Степень таких повреждений зависит от многих факторов: скорости замораживания – оттаивания, типа и концентрации криопротекторов, состава фосфолипидов, степени гидратации, а также от содержания холестерина в мембране [12–15].

Липидный состав мембраны играет важную роль в поддержании её структуры при экстремально низких температурах [16–18]. Поэтому модификация состава мембранных липидов считается перспективным способом повышения криотолерантности сперматозоидов.

Криопротекторные среды, используемые для криоконсервации сперматозоидов человека, как правило, не содержат компонентов, направленных на стабилизацию клеточных мембран. Между тем в ветеринарной практике накоплен значительный опыт использования яичного желтка, богатого фосфолипидами, холестерином и липопротеинами, в составе криопротекторных сред [19–21]. Его криозащитный эффект традиционно связывают с наличием в его составе липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), обладающих способностью взаимодействовать с плазматической мембраной сперматозоида и предотвращать повреждения, вызванные воздействием низких температур [21–23]. Однако как биологический материал животного происхождения яичный желток (ЯЖ) имеет ряд недостатков. Он характеризуется высокой вариабельностью состава, риском микробиологической контаминации, сложностью стандартизации и, как следствие, ограниченной применимостью в клинических протоколах. В этой связи существенный научно-практический интерес представляют альтернативные подходы криоконсервации клеток, основанные на использовании растительных аналогов желтка (например, соевого лецитина (СЛ)) или целенаправленной модификации липидного состава мембран сперматозоидов посредством включения экзогенных липидов, таких как холестерин, ненасыщенные фосфолипиды, а также антиоксидантные молекулы липофильной природы.

Увеличение содержания холестерина в мембране сперматозоидов до этапа замораживания рассматривается как один из эффективных способов повышения их криотолерантности [13]. Известно, что холестерин, локализованный в составе липидов мембраны, регулирует упаковку и контролирует динамичность липидных молекул (подвижность, вращение, латеральную диффузию), что приводит к модулированию ряда свойств и функций мембраны, таких как толщина мембраны, её микровязкость («текучесть»), проницаемость для воды и других молекул, а также температура и степень кооперативности фазового перехода [24; 25].

Степень разработанности темы исследования

В ряде исследований, проведённых на сперматозоидах разных видов млекопитающих [26–31], было установлено, что предварительная инкубация сперматозоидов с холестерин-циклодекстриновыми комплексами способствует увеличению доли жизнеспособных и доли прогрессивно подвижных сперматозоидов после криоконсервации. Однако в отношении сперматозоидов человека проблема модификации липидного состава мембран изучена менее полно, что препятствует широкому внедрению данных технологий в клиническую практику. Для повышения эффективности криоконсервации сперматозоидов человека необходимо было детальнее изучить возможность использования ЯЖ и комплексов циклодекстрины–холестерин в качестве модификаторов липидного состава мембран сперматозоидов, а также оценить структурные изменения мембран сперматозоидов при варьировании содержания в них

холестерина. Эти данные необходимы для создания нового поколения криопротекторных сред, обладающих направленным мембранопротекторным действием и обеспечивающих более высокие показатели выживаемости сперматозоидов человека после криоконсервации.

Целью исследования является разработка методов оптимизации технологии криоконсервации сперматозоидов человека, основанная на изучении механизмов криоповреждений, и создание подходов к повышению криотолерантности сперматозоидов человека с использованием мембраностабилизирующих компонент.

Задачи исследования:

1. Разработать методику оптимизации криопротекторной среды на основании сравнения выживаемости сперматозоидов при их инкубации в присутствии а) яичного желтка или б) холестерина.
2. Провести сравнительный анализ методов определения концентрации холестерина в мембранах сперматозоидов, имеющий целью выбор оптимальных способов криоконсервации сперматозоидов в лабораторных условиях в клинической практике.
3. Изучить, как удаление холестерина из мембран сперматозоидов с помощью метил- β -циклодекстринов влияет на микровязкость липидного бислоя мембраны.
4. Выяснить, как инкубация сперматозоидов человека с комплексами метил- β -циклодекстринов с холестерином перед криоконсервацией влияет на индексы подвижности и жизнеспособности сперматозоидов после размораживания.

Научная гипотеза

Сделано предположение о различии в механизмах повреждения ДНК сперматозоидов при криоконсервации с использованием и без использования криопротекторной среды.

Научная новизна работы

Показано, что метил- β -циклодекстрины обладают выраженной цитотоксичностью в отношении сперматозоидов человека, связанной с экстракцией мембранного холестерина. Установлено, что комплексы метил- β -циклодекстринов с холестерином характеризуется существенно меньшей цитотоксичностью. Показано, что инкубация сперматозоидов с комплексами метил- β -циклодекстринов с холестерином вызывает дозозависимое повышение содержания холестерина в мембранах сперматозоидов с последующим выходом на плато. Продemonстрировано дозозависимое улучшение криотолерантности сперматозоидов человека при обработке комплексами метил- β -циклодекстринов с холестерином, определена оптимальная концентрация комплексов для повышения доли прогрессивно подвижных и жизнеспособных

сперматозоидов. Исследование, выполненное на сперматозоидах человека, показало, что экстракция из них холестерина с помощью метил- β -циклодекстринов сопровождается увеличением подвижности спинного зонда 5-ДС, свидетельствующим, что удаление холестерина способствует уменьшению микровязкости липидного бислоя мембран сперматозоидов. Интерпретация полученных данных подтверждается опытами с использованием модельной системы (липосомы с различным содержанием холестерина).

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные результаты имеют теоретическую ценность для более глубокого понимания того, как криоконсервация влияет на функциональную активность сперматозоидов человека, они могут быть использованы при разработке и оптимизации протоколов криоконсервации сперматозоидов в клинической практике ВРТ. Результаты работы создают основу для разработки новых криопротекторных сред и методов, направленных на стабилизацию мембран клеток и снижение уровня посткриогенных повреждений. Продемонстрированная возможность управляемого изменения содержания холестерина в мембранах сперматозоидов с использованием метил- β -циклодекстринов открывает перспективы для повышения криотолерантности клеток, а также для экспериментального изменения липидного состава мембраны с целью последующего изучения роли холестерина в функциональной активности сперматозоидов.

Методология и методы исследования

Для определения содержания холестерина в мембранах сперматозоидов в работе были использованы четыре метода количественного определения холестерина (реакция Либермана-Бурхарда, высокоэффективная жидкостная хроматография, ИК-спектроскопия и ферментативно-колориметрический анализ).

Для модификации содержания холестерина в мембране сперматозоиды инкубировали с метилированными β -циклодекстринами и их комплексами с холестерином. Структурные изменения мембран сперматозоидов человека изучали с помощью липидорастворимого спинного зонда 5-ДС. Липосомы с различным содержанием холестерина были использованы в качестве модельной системы, на примере которой было показано, как извлечение холестерина из липидных мембран влияет на их структурные свойства.

Для оптимизации криопротекторной среды проводилось сравнение выживаемости сперматозоидов при добавлении в криопротекторную среду яичного желтка и инкубации сперматозоидов с комплексами метилированных β -циклодекстринов с холестерином перед

криоконсервацией. Жизнеспособность клеток оценивали с применением набора Vital Screen, процент сперматозоидов с фрагментированной ДНК – с использованием набора TUNEL.

Личный вклад автора

Все изложенные в диссертации результаты получены соискателем самостоятельно или при его непосредственном участии. Личный вклад соискателя состоял в участии в биохимических и биофизических экспериментах, а также в обработке и анализе полученных данных, формулировании положений и выводов, подготовке статей к печати и участии в конференциях. Постановка задач, интерпретация полученных результатов и формулировка выводов исследования осуществлялись совместно с научным руководителем и другими соавторами публикаций.

Положения, выносимые на защиту:

1. Включение яичного желтка в криопротекторную среду обеспечивает сохранение более высокого (статистически значимого) индекса подвижности криоконсервированных сперматозоидов по сравнению с контрольными образцами (в отсутствие яичного желтка).
2. Случайно метилированные β -циклодекстрины обладают дозозависимой цитотоксичностью по отношению к сперматозоидам человека, что обусловлено экстракцией мембранного холестерина.
3. С увеличением концентрации случайно метилированных β -циклодекстринов в среде, содержащей сперматозоиды, подвижность молекул спинного зонда 5-доксил стеарата в мембране увеличивается. Этот результат подтверждает гипотезу о том, что удаление холестерина из мембран сперматозоидов приводит к уменьшению «жесткости» цитоплазматической мембраны.
4. Инкубация сперматозоидов человека с комплексами случайно метилированных β -циклодекстринов с холестерином (2 мг/мл) перед криоконсервацией приводит к статистически значимому повышению индекса подвижности и индекса жизнеспособности сперматозоидов после размораживания.

Степень достоверности результатов

Достоверность полученных результатов и обоснованность выводов обеспечивалась использованием общепринятых физико-химических методов исследования. При проведении данной работы были использованы стандартные методы определения концентрации холестерина, классический метод изучения физических свойств липидных мембран – метод спинных зондов, а также рутинные, широко внедрённые в клиническую практику ВРТ методы:

обработка эякулята в градиенте плотности, криоконсервация эякулята, оценка концентрации, подвижности, жизнеспособности и фрагментации ДНК сперматозоидов. Достоверность результатов обеспечивалась статистической оценкой погрешности измерений, а также согласованием полученных результатов с данными, изложенными в литературе по теме.

Апробация результатов работы

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на следующих научных конференциях: V Съезд биофизиков России (Ростов-на-Дону, 2015); XV Ежегодная международная молодёжная конференция ИБХФ РАН-ВУЗы (Москва, 2016); конференция «Новейшие достижения и успехи развития естественных и математических наук» (Краснодар, 2016); The 10th Leiden International (Bio)Medical Student Conference (Leiden, 2017); VI Съезд биофизиков России (Сочи, 2019).

Публикации

По материалам диссертации опубликованы 9 печатных работ, из них 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК, 2 статьи в сборниках трудов научных конференций, 3 работы в сборниках тезисов научных конференций.

Объём и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 115 страницах, содержит 7 таблиц и 14 иллюстраций. Работа состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждения, заключение, основные результаты и выводы, благодарности, список сокращений и условных обозначений и список литературы (339 источников).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Двухфакторная гипотеза в криобиологии

Одним из ключевых положений современной криобиологии является двухфакторная гипотеза повреждения клеток при замораживании, сформулированная П. Мазуром в 1970-х годах [6]. Эта гипотеза объясняет природу повреждений, возникающих при криоконсервации, как результат действия двух конкурирующих факторов: образования внутриклеточных кристаллов льда и осмотического (дегидратационного) стресса. Механизм действия первого фактора – образование внутриклеточных кристаллов льда. При высокой скорости замораживания вода внутри клетки не успевает диффундировать наружу до того, как температура опускается ниже точки гомогенного нуклеационного замораживания. Это приводит к образованию внутриклеточных кристаллов льда, которые нарушают целостность мембран, повреждают органеллы и приводят к механическим повреждениям клеточных структур. Такие повреждения считаются летальными и являются одной из основных причин гибели клеток при использовании неоптимальных скоростей охлаждения.

Механизм действия второго фактора – дегидратация и осмотический стресс. При медленной скорости замораживания во внеклеточном пространстве происходит кристаллизация воды с образованием чистого льда, что ведёт к росту концентрации оставшихся в растворе солей и других растворённых веществ. Согласно законам осмоса, вода из клетки выходит наружу, что вызывает сильную дегидратацию и гиперосмотический стресс. Это, в свою очередь, может приводить к денатурации белков, нарушению мембранного потенциала, ингибированию метаболических процессов и в конечном итоге – к гибели клетки.

Согласно двухфакторной модели, оптимальная скорость замораживания находится в интервале между двумя зонами максимального риска: слишком медленного и слишком быстрого охлаждения [6]. В практической криобиологии данная гипотеза нашла применение при разработке протоколов замораживания сперматозоидов, эмбрионов, ооцитов, стволовых клеток, различных типов тканей и органов [11; 32]. В частности, она обосновывает необходимость использования криопротекторов (например, диметилсульфоксида, глицерина), которые снижают вероятность образования внутриклеточного льда и уменьшают осмотический стресс за счёт модификации водно-солевого баланса и понижения температуры замерзания раствора [15; 33; 34]. Данная гипотеза легла в основу методов витрификации – сверхбыстрого охлаждения без образования кристаллов льда, при котором водная фаза переходит в стеклоподобное состояние [35; 36].

Хотя двухфакторная гипотеза является основополагающим принципом теоретической криобиологии, более поздние исследования показали, что молекулярные механизмы

криоповреждений гораздо сложнее, чем предполагалось ранее [37]. Современные подходы включают в рассмотрение дополнительные факторы: фазовые переходы липидных мембран, структурные изменения цитоскелета, активность аквапоринов, а также роль окислительного стресса [37; 38]. Тем не менее двухфакторная модель сохраняет свою эвристическую ценность, позволяя формализовать и прогнозировать оптимальные режимы замораживания и размораживания для широкого спектра биологических объектов.

1.2. Особенности сперматозоида как объекта криобиологии

Для большинства типов клеток существует оптимальная скорость охлаждения, которой соответствует максимальная выживаемость клеток после разморозки. Особенностью сперматозоидов является нехарактерная для других типов клеток устойчивость к изменению скорости охлаждения: у сперматозоидов человека наблюдается лишь незначительная разница в выживаемости при охлаждении со скоростью 1 °C или 100 °C в минуту [39].

Выживаемость клеток различных типов в зависимости от скорости охлаждения можно предсказать с помощью моделирования, основываясь на их осмотическом поведении в процессе замораживания [40]. В частности, вероятность образования внутриклеточного льда может быть определена для различных линейных скоростей охлаждения. Однако результаты моделирования для сперматозоидов человека не согласуются с экспериментальными данными [41; 42]. Так, согласно традиционным моделям, человеческие сперматозоиды должны выдерживать охлаждение со скоростью до 10 000 °C в минуту [42], в то время как в экспериментах было отмечено снижение выживаемости уже при скорости охлаждения более 100 °C в минуту [43].

Несмотря на широкий диапазон допустимых скоростей охлаждения, выживаемость сперматозоидов после криоконсервации остаётся невысокой: лишь 40–60 % от исходного количества прогрессивно подвижных клеток сохраняют свою подвижность после размораживания [4; 5]. В то же время для других типов клеток млекопитающих, например эмбрионов и яйцеклеток, при использовании оптимальных скоростей охлаждения и оттаивания можно достичь практически 100 %-х показателей выживаемости [35; 36]. Дополнительным отягощающим фактором является широкая вариабельность криотолерантности сперматозоидов в популяции.

По сравнению со многими другими типами клеток ответ сперматозоидов на стресс, вызываемый криоконсервацией, является нетипичным, что обусловлено уникальной структурой сперматозоидов [7; 43; 44]. Одной из особенностей сперматозоидов является то, что соотношение площади поверхности и объёма очень велико (площадь поверхности – $106,5 \pm 6,2$ мкм², объём клетки – $22,2 \pm 1,2$ мкм³) [45]. Цитоплазматический объём невелик, он отличается высоким содержанием белка и относительно низким содержанием воды. Лишь небольшая часть

внутриклеточной воды (примерно 13 %) осмотически активна, и примерно 50 % объёма клетки осмотически неактивны [46]. Для сперматозоидов характерна высокая проницаемость мембраны для молекул воды и криопротекторов. Проницаемость мембраны сперматозоидов человека для молекул воды (L_p) составляет $2,4 \pm 0,2$ мкм/мин $\times$ атм (при 22 °C) [41]; $2,89$ мкм/мин $\times$ атм (при 30 °C) [42], что ниже, чем у сперматозоидов некоторых других видов млекопитающих (например, быков [47] и баранов [42]), но значительно выше, чем у большинства других типов клеток млекопитающих (например, это значение в шесть раз больше, чем у яйцеклетки [48]).

Структурные особенности сперматозоидов, рассмотренные выше, обуславливают их специфическую биофизическую реакцию на гиперосмотический стресс, возникающий, в частности, в процессе охлаждения. Благодаря высокой проницаемости мембран для воды, а также высокому соотношению площади поверхности к объёму клетки, сперматозоиды реагируют на изменения осмотических условий очень быстрым выходом воды из цитоплазмы. Однако ввиду небольшого общего объёма внутриклеточной воды, абсолютное количество теряемой жидкости невелико, что делает усадку клеточного объёма минимальной. При высоких скоростях охлаждения образование внутриклеточного льда крайне маловероятно и, согласно теоретически рассчитанным значениям, должно происходить только при скоростях охлаждения выше 10 000 °C в минуту [42]. В противоположность этому большинство соматических клеток человека, ооциты и эмбрионы демонстрируют заметно более низкую водопроницаемость, а также меньшее отношение площади поверхности к объёму, что приводит к замедленной потере воды при тех же условиях гиперосмотического стресса [48]. Кроме того, такие клетки содержат большой объём осмотически активной воды и, соответственно, меньший объём осмотически неактивного компонента, что делает их более чувствительными к дегидратации. В результате при замораживании этих клеток наблюдается существенная усадка, а при высоких скоростях охлаждения – интенсивное образование внутриклеточного льда, что значительно повышает риск криоиндуцированных повреждений [49].

Отсутствие внутриклеточного льда в сперматозоидах. Существенный вклад в изучение криоструктурных изменений сперматозоидов в процессе замораживания был внесён Мориссом и соавторами [43], применившими криосканирующую электронную микроскопию (КСЭМ) для визуализации ультраструктурных особенностей клеток в замороженном состоянии. Преимущества данного метода заключаются в возможности исследования образцов при криогенных температурах без необходимости предварительной дегидратации, фиксации и окрашивания.

Согласно данным криосканирующей электронной микроскопии, в сперматозоидах отсутствуют морфологические признаки внутриклеточного льда при различных режимах криоконсервации. При замораживании в присутствии глицерина в головках сперматозоидов

выявляются изолированные просветления диаметром менее 1 мкм, наблюдаемые как при низкой (1 °C в минуту), так и при высокой (3000 °C в минуту) скорости охлаждения. Данные структуры, сохраняющиеся вне зависимости от скорости охлаждения, вероятно, представляют собой вакуоли осмотического происхождения либо остаточные области дегидратации, а не участки внутриклеточного кристаллообразования. При скорости охлаждения 1 °C в минуту крайне маловероятно, что в сперматозоидах человека будет присутствовать внутриклеточный лёд. Отсутствие роста и изменения их конфигурации при изменении скорости охлаждения дополнительно подтверждает некристаллическую природу этих структур. Данные наблюдения показывают, что, по крайней мере, для скоростей охлаждения менее 3000 °C в минуту криоповреждения сперматозоидов не обусловлены образованием внутриклеточного льда. При скоростях охлаждения, используемых в рутинной практике, криоповреждения клеток должны быть вызваны другими физико-химическими факторами [43].

Результаты, полученные Моррисом и соавторами, имеют фундаментальное значение для понимания особенностей криоповреждений сперматозоидов. Они демонстрируют, что, в отличие от соматических и генеративных клеток с высоким содержанием воды (например, ооцитов и эмбрионов), у сперматозоидов образование внутриклеточных кристаллов льда не является доминирующим механизмом повреждения. Следовательно, для этих клеток классическая двухфакторная гипотеза требует модификации, а стратегии криозащиты должны быть направлены преимущественно на стабилизацию мембран и контроль осмотических нагрузок, а не на подавление внутриклеточной кристаллизации.

Криоконсервация сперматозоидов в присутствии криопротектора глицерина. После первоначального образования зародышей льда и последующего роста кристаллов из раствора глицерина удаляется вода. В результате образуется двухфазная система: лёд и концентрированный раствор глицерина. При дальнейшем понижении температуры образуется ещё больше льда, остаточная незамёрзшая фаза становится всё более концентрированной, клетки концентрируются в незамёрзшей фракции. Вопреки ожиданиям, кристаллы льда не прокалывают клетки и не повреждают их механически: клетки концентрируются в незамёрзшей фракции, в которой они подвергаются ряду биофизических воздействий. Реакция клеток на совокупность этих воздействий в конечном счёте определяет их выживаемость после размораживания [46].

Часто предполагается, что клетки подвергаются воздействию условий, предсказанных на основе фазовой диаграммы равновесия. Однако равновесные значения будут достигаться только в хорошо перемешиваемых системах или при наличии достаточного времени для осуществления диффузии. При понижении температуры вязкость незамёрзшей фракции заметно возрастает в относительно небольшом диапазоне температур от -35 °C до -55 °C, что значительно снижает диффузионные процессы. При температурах выше -35 °C диффузия вряд ли будет ограничена, в

то время как при температуре -55°C вязкость будет настолько высокой, что эффективная диффузия невозможна. При относительно высоких скоростях охлаждения, используемых для криоконсервации сперматозоидов, вполне вероятно, что состав замороженного концентрированного материала будет неравновесным. Во время замораживания клетки будут подвергаться воздействию ряда физических условий, отличных от фазовой диаграммы равновесия, и именно реакция на этот набор физических условий будет определять криобиологическое поведение [46].

Фактическое отсутствие внутриклеточного льда в сперматозоидах в широком диапазоне скоростей охлаждения свидетельствует о том, что криоповреждения преимущественно связаны с деструктивными осмотическими и фазовыми эффектами, возникающими в мембранных структурах [47]. Охлаждение приводит к фазовым переходам в липидном бислое мембран, особенно в области акросомы и митохондриального сегмента, с последующим нарушением проницаемости, дестабилизацией потенциала мембран и инактивацией ферментных систем [8–10; 50; 51]. Одним из факторов, определяющих ответ клеток на изменения физических свойств внеклеточной среды, в частности, на гипер- и гипоосмотические условия, и следовательно, выживаемость сперматозоидов, может быть проницаемость мембраны для воды, которая зависит от состава и фазового состояния мембраны, а также от наличия криопротектантов [52; 53].

1.3. Структура липидного бислоя биологических мембран

Биологические мембраны играют ключевую роль в регуляции межклеточного и внутриклеточного обмена, сигнальной передаче, энергетическом метаболизме и многих других жизненно важных процессах в клетках. Основу мембран составляет липидный бислой, структура и физико-химические свойства которого во многом определяют функционирование мембранных белков и самих клеток [54; 55]. Основными компонентами биологических мембран являются липиды (структурная основа мембраны), белки, ассоциированные с липидным бислоем, и углеводы, которые всегда входят в состав гликопротеинов (связаны с белковыми молекулами) или гликолипидов (связаны с липидными молекулами).

В зависимости от биологической роли липиды можно разделить на три класса: запасаемые липиды, регуляторные липиды и структурные липиды [56]. К структурным липидам относятся глицерофосфолипиды, сфинголипиды и стерины. Глицерофосфолипиды являются производными фосфатидной кислоты, образованной трёхатомным спиртом глицерином, ацилированным двумя высшими жирными кислотами (диаглицерин), одна из гидроксильных групп которого этерифицирована фосфорной кислотой. Номенклатура глицерофосфолипидов основана на системе стереоспецифической нумерации (*sn*-система). Как правило, насыщенная ацильная цепь этерифицирована (за счёт сложноэфирной или простой эфирной связи) в *sn*-1-

положении глицериновой основы, в то время как ацильная цепь в *sn*-2-положении обычно является ненасыщенной. Жирные кислоты почти всегда состоят из чётного количества атомов углерода, обычно в пределах от 14 до 24. Наиболее распространёнными являются кислоты C16, C18 и C20. Степень ненасыщенности может быть разной, но чаще всего встречаются кислоты 18:1, 18:2, 18:3 и 20:4 (первое число обозначает длину ацильной цепи, второе – количество двойных связей). Ненасыщенная ацильная цепь может содержать от одной до шести двойных связей в *цис*-конфигурации. Наличие двойной связи в *цис*-конфигурации, характерной практически для всех природных кислот, приводит к излому углеводородной цепи. Фосфатная группа у большинства фосфоглицеридов находится в *sn*-3 положении глицерола; она может образовывать сложноэфирную связь с кислородом гидроксильных групп аминспиртов или полиспиртов. К аминокислотам относятся фосфатидилхолин, фосфатидилсерин и фосфатидилэтаноламин [55; 56]. Другими распространёнными глицерофосфолипидами являются фосфатидилинозитол (содержит в головной группе миоинозит), кардиолипин (образуется при взаимодействии с глицерином двух остатков фосфатидовой кислоты) и фосфатидилглицерин (в состав полярной группы входит ещё один остаток глицерина) [56].

Основная функция фосфолипидов, в частности фосфатидилхолина, заключается в поддержании структуры клеточных мембран. Помимо этой функции фосфатидилхолин выполняет регуляторную роль в клетках и участвует в клеточной сигнализации. Клеточный фосфатидилхолин может быть деградирован несколькими фосфолипазами, а именно классами A1, A2, B, C и D [56]. Эти фосфолипазы находятся в различных клеточных компартментах, а некоторые из них также участвуют в сигнальных путях. Фосфатидилхолин служит резервуаром для нескольких липидных мессенджеров: он является источником биоактивных липидов – диацилглицерина, фосфатидной кислоты, лизофосфатидной кислоты, фактора активации тромбоцитов и арахидоновой кислоты [54; 56; 57].

Сфинголипиды имеют особое значение для клеточной физиологии благодаря их свойству кластеризации с холестерином в плоскости мембраны. Эти кластеры сфинголипидов/холестерина составляют основу рафтов в плазматической мембране. Кроме того, сфингомиелин выполняет регуляторные функции в клетке и участвует в клеточных сигнальных системах [58; 59]. Сфингомиелин, находящийся во внешнем слое плазматической мембраны, является источником вторичных мессенджеров в сфингомиелиновом цикле [60; 61]. Цикл начинается с деградации сфингомиелина под действием нейтральной сфингомиелиназы до церамида. В зависимости от активирующего сигнала для распада сфингомиелина церамид может далее метаболизироваться до сфингозина или сфингозин-1-фосфата, либо цикл может быть завершён ресинтезом сфингомиелина с помощью сфингомиелин-синтазы [59; 62; 63].

В структуру сфингомиелина входит гидрофильная фосфорилхолиновая головная группа, как и у фосфатидилхолина. Оба липида также содержат по две длинных углеводородных цепи, которые образуют гидрофобный домен этих амфифильных молекул. Конформация и распределение зарядов у этих фосфолипидов довольно схожи, но химически они, конечно, отличаются [64]. Различия обусловлены тем, что фосфатидилхолин имеет глицериновую основу, с которой две жирные кислоты связаны сложноэфирными связями, в то время как сфингомиелин имеет длинноцепочечное сфингоидное основание с амидной ацильной цепью. Поэтому межфазная область в сфинголипидах значительно более полярна, чем аналогичная область в фосфатидилхолине. Ещё одно важное различие в структуре двух холин-фосфолипидов заключается в том, что межфазная область сфингомиелина содержит как донорные, так и акцепторные группы водородных связей, в то время как соответствующая область в фосфатидилхолине содержит только группы, принимающие водородные связи [64]. Поверхность мембраны, состоящая из сфингомиелина, гораздо более гидратирована по сравнению с фосфатидилхолином. Распределение сфингомиелина между клеточными мембранами неравномерно, и более половины клеточного сфингомиелина расположено в плазматической мембране [65–67]. В плазматической мембране сфингомиелин, как и фосфатидилхолин, в основном сконцентрирован во внешнем бислое [68; 69].

При физиологических условиях, в зависимости от структуры полярной области, молекулы фосфолипидов либо отрицательно заряжены (фосфатидилсерин, фосфатидилинозит, кардиолипин), либо электронейтральны (находятся в форме цвиттерионов – содержат отрицательный и положительный заряды) (фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, сфингомиелин) [55].

Длина и насыщенность углеводородных цепей вносят вклад в свойства биологических мембран. Сфингомиелины в биологических мембранах гораздо более насыщены, чем фосфатидилхолины природного происхождения [70]. Природные сфингомиелины часто имеют очень длинную амидно-связанную ацильную цепь (20–24 атома углерода), а сфингоидная основа чаще всего представляет собой сфингозин (d-эритро-2-амино-транс-4-октадецен-1,3-диол) [71; 72]. Это приводит к несоответствию длины цепей большинства природных сфингомиелинов. Исследователями было доказано, что такое несоответствие цепей влияет на кривизну мембраны [73].

Известно, что плазматические мембраны клеток демонстрируют асимметрию, обусловленную величиной и зарядом полярной «головки» фосфолипидов. Липиды с более объёмными полярными «головками» располагаются, как правило, в наружном монослое, так как имеют большую площадь поверхности полярной «головы». Например, фосфатидилхолин и сфингомиелин локализованы во внешнем листке плазматической мембраны, а

аминофосфолипиды фосфатидилсерин и фосфатидилэтаноламин – преимущественно во внутреннем. Ранее считалось, что такая асимметрия возникает в результате взаимодействия между фосфолипидами и элементами цитоскелета [74], но теперь стало очевидно, что для формирования этой асимметрии необходимы активные энергозатратные механизмы [75; 76].

Свойства липидного бислоя. В водной среде фосфолипиды спонтанно собираются в надмолекулярные структуры. Склонность к агрегации и образованию организованных структур обусловлена строением и амфотерным характером молекул фосфолипидов, в которых одна и та же молекула фосфолипида имеет как липидорастворимую, липофильную неполярную часть («хвост»), так и водорастворимую, гидрофильную полярную часть («головка») [55].

С точки зрения термодинамики, основной силой, способствующей стабилизации гидратированных липидных агрегатов, являются гидрофобные взаимодействия. Ван-дер-Ваальсовы силы, возникающие между соседними гидрофобными цепями, а также водородные связи, образующиеся между полярными головками некоторых липидов, по своей стабилизирующей способности значительно уступают гидрофобным взаимодействиям. За счёт гидрофобных взаимодействий липидная система принимает структуру, при которой минимизируются контакты между неполярными участками липидов и водой. «Гидрофобные» силы имеют энтропийную природу и связаны с ограничениями, налагаемыми на упаковку молекул воды вокруг неполярных углеводородов. Взаимодействие неполярных молекул с молекулами воды термодинамически неблагоприятно из-за энтропийных эффектов, связанных с нарушением структуры воды как растворителя [55; 56].

Геометрические характеристики отдельных липидов, в частности соотношение между эффективной площадью поперечного сечения углеводородных хвостов и площадью полярной головки, определяют тип агрегированных структур, формирующихся в водной среде. Так, молекулы с цилиндрической формой способствуют образованию билипидных слоёв, с конической – мицелл, а с перевёрнуто-конической – инвертированных мицелл или гексагональных фаз [56].

Одной из наиболее распространённых форм молекулярных липидных ассоциатов в водной среде является структура в виде липидного бислоя. Такая организация лежит в основе архитектуры биологических мембран. Липидный бислой представляет собой термодинамически стабильную систему, формирующуюся за счёт взаимодействия липидных молекул с водой, состоящую из двух слоёв, в которых молекулы фосфолипидов ориентированы так, что их гидрофобные хвосты направлены внутрь, друг к другу, а гидрофильные головы – наружу, к водной фазе. Благодаря такой ориентации структура обладает двумя внешними гидрофильными поверхностями и внутренней гидрофобной областью. Формирование бислойных структур возможно в случае, если липиды имеют схожие площади поперечного сечения полярных голов и

углеводородных цепей, либо в смеси различных липидов, геометрические параметры которых сбалансированы таким образом, чтобы обеспечить образование устойчивого плоского интерфейса [55].

Холестерин. Если фосфолипиды и сфинголипиды образуют матрикс клеточных мембран, то стерины являются важнейшими компонентами этих мембран. При удивительном разнообразии фосфолипидов в клетках млекопитающих в них содержится всего один основной стерол – холестерин, который абсолютно необходим для жизнеспособности и пролиферации клеток [77; 78]. Существует мнение, что содержание холестерина в эукариотических клетках увеличивается по ходу секреторного пути, будучи очень низким в эндоплазматическом ретикулуме, более высоким в аппарате Гольджи и самым высоким в плазматической мембране [79; 80]. Это действительно подтверждается, если сравнить концентрацию холестерина в этих биологических мембранах. Первая группа включает в себя мембраны эндоплазматического ретикулума, аппарата Гольджи и митохондрий, которые имеют низкое содержание холестерина, с молярным отношением холестерина к фосфолипидам между 0 и 0,1 (< 10 мол. % холестерина). Данные по этим мембранам разрознены, но они показывают, что для эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи молярное соотношение холестерина/фосфолипидов составляет 0,06 и 0,1 соответственно [81]. Вторая группа включает биологические мембраны с «нормальным» содержанием холестерина, которые представляют собой типичные плазматические мембраны с молярным соотношением холестерин/фосфолипиды от 0,1 до 0,5 (от 10 до 30 мол. % холестерина) [55]. Несмотря на то, что большинство плазматических мембран характеризуется таким содержанием холестерина, в цитоплазматических мембранах некоторых клеток оно значительно выше. К третьей группе относятся мембраны с высоким содержанием холестерина, такие как плазматическая мембрана эритроцитов и миелиновые мембраны шванновских клеток, изолирующих нервные аксоны; молярное отношение холестерин/фосфолипиды в этих мембранах близко к 1 (~ 50 мол. % холестерина) [82; 83]. При молярном соотношении холестерин/фосфолипиды равном 1 происходит насыщение фосфолипидного бислоя холестерином [84]. В мембранах с более высоким содержанием холестерина внутри фосфолипидного бислоя, насыщенного холестерином, начинают формироваться несмешивающиеся (нерастворимые в липидном бислое) домены чистого холестерина, известные как бислойные домены холестерина (БДХ) [85]. Мембраны, в которых присутствуют БДХ, обычно относят к мембранам с очень высоким уровнем холестерина. К этой четвертой группе относятся плазматические мембраны фибриллярных клеток хрусталика глаза, в которых молярное соотношение холестерин/фосфолипиды больше 1 (> 50 мол. % холестерина) [86–88]. При превышении порогового уровня растворимости холестерина в мембране, что, как правило, наблюдается при молярном соотношении холестерин/фосфолипиды равном 2 (66

мол. % холестерина), происходит образование кристаллов холестерина. Предположительно эти кристаллы формируются вне липидного бислоя [84; 89]. Подобные процессы были обнаружены, в частности, в хрусталике глаза человека при возрастных изменениях, а также в мембранах клеток артериальных сосудов, подвергшихся атеросклеротическим изменениям [89–91].

Структура холестерина. Молекула холестерина (Рисунок 1) состоит из трёх основных частей: 1) циклопентанпергидрофенантреновой системы, являющейся ядром стероидов; 2) полярной гидроксильной группы в положении 3; 3) короткой неполярной углеродной цепи в положении 17 [92].

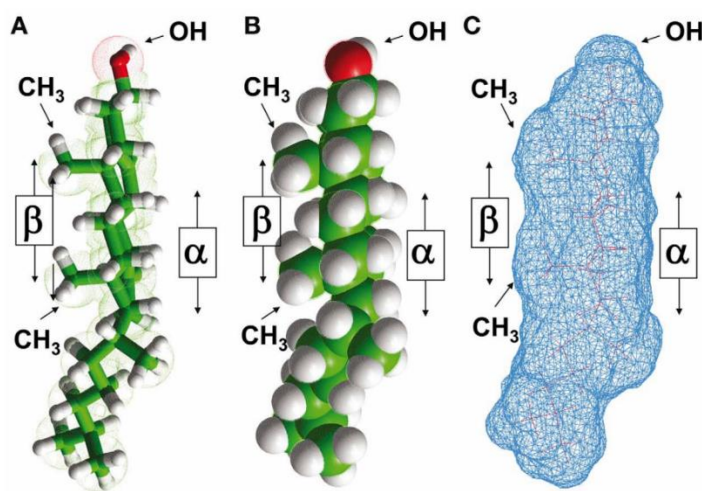


Рисунок 1 – Структурные свойства холестерина. Ассиметричное распределение алифатических групп (метильной, изо-актильной), присоединенных к планарному стеранному скелету холестерина, определяет две различные стороны, называемые α - и β -поверхностями, согласно номенклатуре, предложенной И. Розе и соавторами [93]. Ассиметричная структура холестерина показана в виде трубчатой модели (А), шаростержневой модели (В) и молекулярной поверхности (С). Рисунок воспроизведен из работы [94]

Все четыре кольца стериновой группы находятся в *транс*-конформации, что делает молекулу холестерина плоской. Двойная связь между 5-м и 6-м атомами углеродной цепи обеспечивает жёсткость молекулы холестерина [95]. Важным для формирования представления о трёхмерной структуре холестерина является тот факт, что ОН-группа, две метильные группы и боковая цепь расположены на одной стороне кольцевого скелета (β -конфигурация) [92]. Гидроксильная группа в молекуле холестерина придаёт соединению амфифильный характер и вносит вклад в ориентацию молекулы холестерина в бислое. Холестерин ориентируется в фосфолипидном бислое так, что его полярная гидроксильная группа обращена к водной фазе, а гидрофобное стероидное кольцо ориентировано параллельно остаткам жирных кислот. Холестерин интеркалирует в мембрану с полярной гидроксильной группой, расположенной между полярными головками фосфолипидов, а его жёсткая пластиноподобная кольцевая структура достигает глубины C9 – C10 атомов углерода ацильных цепей фосфолипидов.

Изоактивная цепь холестерина, поперечное сечение которой значительно меньше, чем у жесткого кольца, расположена в центре мембраны [96–98].

1.4. Роль холестерина в латеральной организации липидного бислоя и определении физико-химических свойств мембраны

Холестерин играет ключевую роль в латеральной организации липидного бислоя и определении основных физико-химических свойств мембраны. В ходе исследований монослоёв было установлено, что общая площадь поверхности монослоёв, образованных из яичного лецитина и холестерина, меньше, чем суммарная площадь поверхностей монослоёв, сформированных из того же количества молекул лецитина и холестерина в отдельности [99; 100]. В своих исследованиях Д. Марш и Я. Смит [101] использовали плёнки с высоким содержанием (~8 мол. %) холестанового спинового зонда. Они измеряли латеральное разделение спиновых зондов, основываясь на величине электронного диполь-дипольного взаимодействия. Было обнаружено, что увеличение концентрации холестерина приводит к уменьшению разделения холестановых спиновых зондов в гидратированных двойных слоях яичного лецитина и диолеиллецитина. В то же время в гидратированных двойных слоях дипальмитоиллецитина наблюдается обратный эффект – разделение спиновых зондов увеличивается. Авторы предположили, что уплотняющий эффект холестерина может быть вызван двумя причинами. Первая заключается в том, что молекулы холестерина заполняют пустоты между молекулами лецитина. Вторая причина – специфические взаимодействия между лецитином и холестерином изменяют конформацию молекул лецитина. Основываясь на величине наблюдаемого изменения упаковки спиновых зондов и на данных о размерах молекул лецитина и холестерина в монослое, авторы пришли к выводу, что каждое из этих предположений может объяснить примерно половину уплотняющего эффекта. Лецитин – не единственный липид, на молекулярную ориентацию которого влияет холестерин. В исследовании С. Шрейера-Мучилло, К. Батлера и И. Смита [102] было обнаружено, что холестерин способствует упорядочиванию насыщенных моноглицеридов, а также смесей липидов, полученных из мозга быка, эритроцитов человека, клеток ипомеи [103], фосфатидилэтаноламина, фосфатидилсерина, сфингозина, цереброзидов и церамидов [104].

Для изучения тех структурных характеристик холестерина, которые играют существенную роль в его воздействии на молекулярное построение липидов, авторы работы [103] изучали пленки, образованные из липидов, выделенных из белого вещества бычьего мозга или теней эритроцитов человека. Как холестерин, так и растительный стерин β -ситостерин (24- β -этильное производное холестерина) эффективно упорядочивали систему. Однако 5-андростанол-3- β , который не содержит хвостового фрагмента холестерина, оказался гораздо менее эффективным.

Ключевую роль в упорядочивающем эффекте играла 3- β -гидроксильная группа. Холестанон, который её не содержит, вызывал лишь незначительную степень упорядоченности, а холестерин был полностью неэффективен. Наличие двойных связей в стероидном ядре не оказывало значительного влияния на эффективность. Холестерин и холестеранол были одинаково эффективны во всех концентрациях, в то время как эргостерин – ещё один растительный стероид с двумя двойными связями в ядре и одной в боковой цепи – проявлял значительно большую эффективность в низких концентрациях. Форма ядра стероида имела ключевое значение: 5- β -соединения, характеризующиеся изогнутым ядром, демонстрируют крайне низкую способность к упорядочиванию липидных мембран, в то время как стероиды с плоским ядром проявляют значительно большую упорядочивающую активность.

Таким образом, для достижения упорядочивающего эффекта необходимо плоское ядро и 3 β -гидроксильная группа, а наличие углеводородной цепи при C17 лишь усиливает эту способность. Наличие полярной группы при C17 или на углеводородной цепи, напротив, лишает стероид возможности оказывать упорядочивающее действие на мембранные липиды животных клеток [103].

Упорядочение ацильных цепей фосфолипидов в бислоях димиристоилфосфатидилхолин/холестерин (по данным ЭПР исследований методом спиновых зондов). В липидном бислое ацильная цепь PL-аналоговой спиновой метки (p-PC или p-SASL) подвергается быстрому анизотропному вращательному движению из-за своей вытянутой формы и осевой симметрии липидного бислоя. Она вращается вокруг своей длинной оси, и её длинная ось колеблется в пределах конуса, налагаемого мембранным окружением. Однако поскольку ацильная цепь гибкая, каждый её сегмент обладает собственной вращательной свободой, что проявляется в особенностях спектров ЭПР спиновых зондов [105]. Из этого спектра можно рассчитать параметр порядка для спин-меченного сегмента ацильной цепи (Рисунок 2 А).

Параметр порядка S – это мера амплитуды колебательного движения данного сегмента цепи, усредненная по времени и ансамблю. Профили параметра порядка (Рисунок 2 В) регулярно используются в качестве характеристики микровязкости («текучести») липидного бислоя мембраны [106; 107]. Как показано на Рисунке 2 В, при перемещении парамагнитного фрагмента молекулы спинового зонда вдоль ацильной цепи (в глубину мембраны) параметр порядка S уменьшается. Эффект разупорядочения углеводородных цепей наиболее наглядно проявляется в профиле параметра порядка для бислоёв, содержащих холестерин. Очевидно, что это обусловлено тем, что стероидное кольцо холестерина влияет на упорядочение не только сегментов ацильной цепи, находящихся с ним в непосредственном контакте (вблизи поверхности мембраны), но и дистальных участков (вблизи центра мембраны). Как видно из Рисунка 2 В,

разупорядочение ацильных цепей под действием холестерина происходит от поверхности мембраны к её центру. Этот эффект также наблюдался при компьютерном моделировании бислоёв димиристоилфосфатидилхолина (ДМФХ) с холестерином, например, в работе Т. Рога [108].

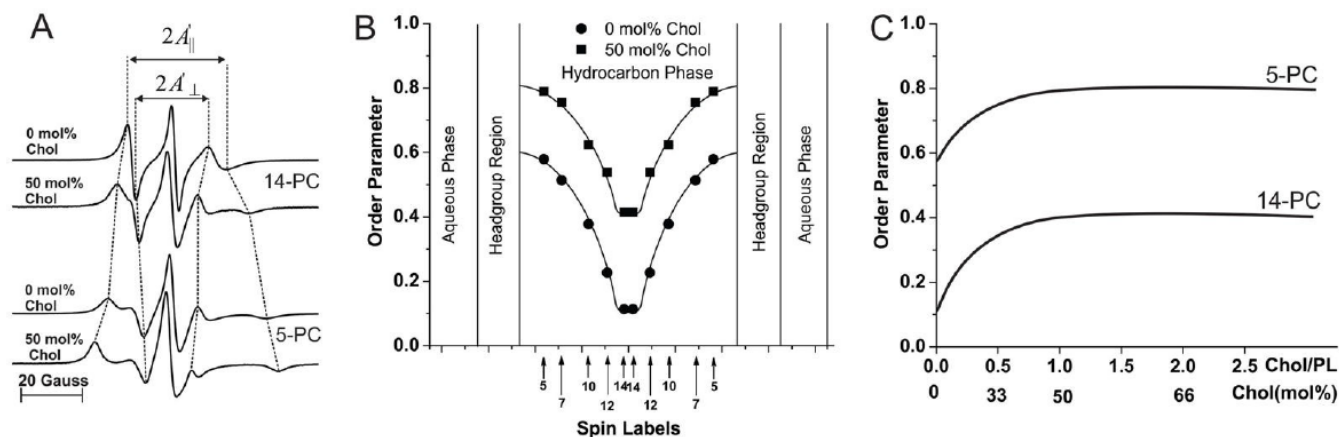


Рисунок 2 – Параметр порядка S , характеризующий амплитуду колебаний ацильных цепей липидов. А: репрезентативные спектры ЭПР спиновых зондов 5- и 14-ДС, растворённых в бислоях димиристоилфосфатидилхолина (ДМФХ) и ДМФХ с 50 мол. % холестерина ($T = 27^\circ\text{C}$). В: зависимость параметра порядка S от глубины погружения парамагнитного фрагмента спинового зонда в липидный бислой. Параметр S был рассчитан согласно Маршу [105] с использованием уравнения $S = 0,5407(A'_{||} - A'_{\perp})/a_o$, где $a_o = (A'_{||} + A'_{\perp})/3$. Профили параметра порядка были получены для мембран ДМФХ и ДМФХ с 50 мол. % холестерина ($T = 27^\circ\text{C}$). Примерные локализации нитроксидных молекул спиновых меток указаны стрелками. С: зависимость параметра порядка 5- и 14-ДС в мембранах ДМФХ от мольной доли холестерина ($T = 27^\circ\text{C}$). Рисунок воспроизведён из работы: [95]

Значение параметра порядка S для молекул зонда, у которых парамагнитный фрагмент находится вблизи поверхности бислоя (положение С5, 5-ДС) и в центре бислоя (положение С 14, 14-ДС), в зависимости от содержания холестерина в бислое ДМФХ показаны на Рисунке 2 С. Видно, что как вблизи поверхности, так и в центре бислоя параметр порядка увеличивается с ростом содержания холестерина вплоть до молярного соотношения холестерина к фосфолипидам, равного 1, и затем становится постоянным при дальнейшем увеличении содержания холестерина [95]. Это имеет смысл, поскольку, как упоминалось ранее, максимальное количество холестерина, которое может раствориться в фосфолипидном бислое, составляет 50 мол. % (молярное соотношение холестерин/ДМФХ равно 1). При более высоком молярном соотношении холестерин/ДМФХ начинают формироваться БДХ, холестерин распределяется между насыщенным холестерином бислоем ДМФХ и погружёнными в него БДХ; увеличение содержания холестерина свыше 50 мол. % не изменяет свойств окружающего бислоя ДМФХ/холестерин [84]. Дальнейшее увеличение содержания холестерина сверх порога его растворимости (> 66 мол. %) приводит к образованию кристаллов холестерина

предположительно вне бислоя. Их формирование не влияет на значение параметра упорядоченности по тем же причинам, которые обсуждались в отношении образования БДХ. Эти результаты позволяют сделать вывод о том, что БДХ могут поддерживаться окружающим бислоем ДМФХ, насыщенным холестерином, когда содержание холестерина составляет от 50 до 66 мол. % (молярное соотношение холестерин/фосфолипиды от 1 до 2) и образование БДХ предшествует образованию кристаллов холестерина [84].

Текучесть бислоёв димиристоилфосфатидилхолин/холестерин. Исследование бислоёв ДМФХ и ДМФХ с 50 мол. % холестерина показало, что в присутствии холестерина текучесть мембраны уменьшается вблизи поверхности и увеличивается вблизи центра бислоя [109]. Переход между ригидизирующим и флюидизирующим эффектами холестерина лежит примерно в положении атома углерода С9, на глубине, на которую жёсткое кольцо холестерина погружено в бислой. Эти результаты согласуются с результатами атомистического компьютерного моделирования, которые показывают точные положения атомов кольца холестерина и влияние кольца холестерина на упаковку атомов в бислое ДМФХ/холестерин [110–112]. Важно отметить, что профили параметра порядка не различают эффекты холестерина на разной глубине (Рисунок 2 В), поскольку они показывают, что эффект упорядочения холестерина распространяется на всю глубину бислоя.

Как было отмечено выше, жёсткое стероидное кольцо молекулы холестерина простирается только на глубину, приблизительно соответствующую положению атома углерода С9 ацильных цепей. Ниже стероидного кольца изоактильная цепь молекулы холестерина имеет гораздо меньшее поперечное сечение, чем само кольцо; в результате центральная область бислоя менее плотная, чем в бислое без холестерина. Однако в менее плотной среде центра бислоя ДМФХ/холестерин терминальные фрагменты ацильных цепей ДМФХ вращаются быстрее, поскольку обладают большей свободой движения. Таким образом, увеличение подвижности ацильных цепей в центре бислоя в присутствии холестерина, на которое указывают динамические параметры, описывающие скорость движения [109], согласуется с увеличением параметра порядка, характеризующего амплитуду движения парамагнитного фрагмента спинового зонда.

Влияние холестерина на профиль гидрофобности липидной мембраны. Внутренняя (гидрофобная) область липидного бислоя сформирована углеводородными хвостами жирных кислот, ориентированными внутрь бислоя. Она играет критическую роль в барьерной функции биологических мембран. Именно эта область определяет проницаемость мембраны для воды и гидрофильных веществ. Мембранная среда становится всё более неполярной по направлению от поверхности мембраны к концам ацильных цепей липидов. В пионерской работе Гриффита и

соавторов [113; 114] с помощью метода спиновых меток было продемонстрировано существование градиента гидрофобности в мембране. С тех пор этот метод интенсивно используется для изучения гидрофобности внутренней части мембраны [115; 116]. Метод спиновых меток основан на зависимости спиновой плотности неспаренного электрона у атома азота от растворителя и полярности. Полярные растворители увеличивают эту плотность, тем самым увеличивая гиперфиновое взаимодействие между спином неспаренного электрона и ядерным спином азота. С увеличением полярности растворителя возрастает z-компонента гиперфинового взаимодействия, A_z . В мембранах этот параметр, определяемый как максимальное расщепление ($2A_z$), может также зависеть от движения спиновых меток, усредняющего анизотропию тензоров сверхтонкой структуры (A) и g .

Профили гидрофобности для бислоев ДМФХ и ДМФХ с 50 мол. % холестерина показаны на Рисунке 3 В.

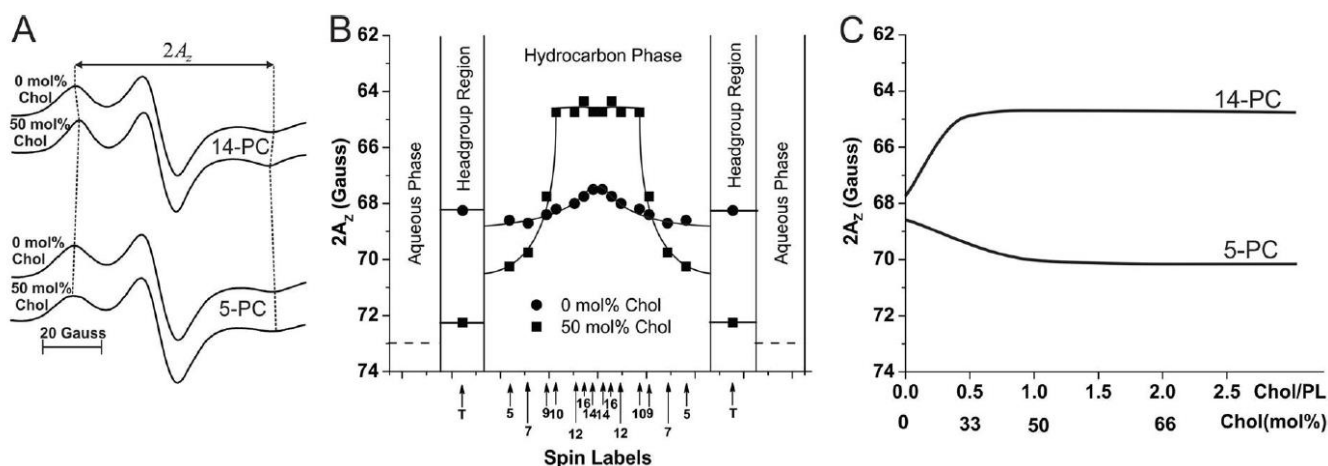


Рисунок 3 – Гидрофобность (измеряется как гиперфиновое расщепление, $2A_z$). А: репрезентативные спектры ЭПР 5- и 14-ДС для мембран ДМФХ и ДМФХ с 50 мол. % холестерина, зарегистрированные при $-165\text{ }^{\circ}\text{C}$. В: профили гидрофобности ($2A_z$), полученные с помощью п-РС и 9-SASL для бислоев ДМФХ и ДМФХ с 50 мол. % холестерина. Примерная локализация спиновых меток указана стрелками. С: график зависимости $2A_z$ 5- и 14-ДС в мембранах ДМФХ от мольной доли холестерина. Рисунок воспроизведён из работ [95; 115]

В отсутствие холестерина гидрофобность бислоя постепенно увеличивается по мере продвижения к центру бислоя и имеет типичный колоколообразный профиль. Холестерин оказывает значительное влияние на профиль гидрофобности, вызывая снижение гидрофобности в области, близкой к поверхности мембраны, и значительное увеличение гидрофобности в центральной области бислоя [115]. Гидрофобность резко возрастает между атомами углерода C9 и C10, а затем выходит на плато. Это происходит в узком диапазоне одной углерод-углеродной связи (т. е. $1,34\text{--}1,53\text{ }\text{\AA}$). В положениях ниже, т. е. глубже атома C10, значения $2A_z$ почти

постоянны, что указывает на область однородно высокой гидрофобности. Это придает профилю гидрофобности общую прямоугольную форму.

Рисунок 3 С наглядно демонстрирует влияние холестерина на гидрофобность бислоя в двух ключевых точках: вблизи его поверхности (в положении С5) и в центральной части (в положении С14). Вблизи поверхности бислоя холестерин снижает его гидрофобность до молярного отношения холестерин/ДМФХ, равного 1. Однако в центре бислоя холестерин увеличивает гидрофобность мембраны до молярного отношения холестерин/ДМФХ, равного 0,5 (~ 30 мол. %). Дальнейшее увеличение содержания холестерина не влияет на гидрофобность бислоя либо незначительно (в пределах погрешности измерения) снижает её. Измеренные значения как вблизи поверхности бислоя, так и в его центре стабилизируются при молярном соотношении холестерин/ДМФХ, равном 1.

Для придания физического смысла гидрофобности, количественно оцениваемой через параметр $2A_z$ и представленной на Рисунке 3 А, значения $2A_z$, соответствующие определённой глубине бислоя, можно соотнести с полярностью или диэлектрической проницаемостью (ϵ) органических растворителей, в которых спиновая метка демонстрирует аналогичные значения параметра спектра $2A_z$ [115]. Так, для бислоя ДМФХ добавление 50 мол. % холестерина увеличивает полярность (уменьшает гидрофобность) вблизи поверхности бислоя (в положении С5) с 2-пропанола ($\epsilon = 15$) до метанола ($\epsilon = 50$). Последнее значение велико, но указывает на то, что эта область всё ещё значительно менее полярна, чем объёмная водная фаза ($\epsilon = 80$). И наоборот, в центре бислоя включение 50 мол. % холестерина в бислой уменьшает полярность (увеличивает гидрофобность) бислоя от уровня 2-пентанола или 1-октанола ($\epsilon = 10-20$) до уровня гексана ($\epsilon = 2$).

Следует отметить, что гидрофобность фосфолипидного бислоя зависит от конкретного типа фосфолипида, а именно от степени ненасыщенности ацильных цепей жирных кислот, как описано в работе В. К. Субчинского и др. [115]. Бислои, состоящие из фосфолипидов с насыщенными ацильными цепями, не создают высоких гидрофобных барьеров. Их гидрофобность в центре бислоя сравнима с гидрофобностью 2-пентанола или 1-октанола ($\epsilon = 10-20$). Однако, если бислои состоят из липидов с ненасыщенными ацильными цепями (например, 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин), их гидрофобность приближается к гидрофобности 1-деканала ($\epsilon = 10$). Однако все эти различия сводятся на нет при увеличении содержания холестерина, поскольку для всех типов бислоёв гидрофобность в их центре приближается к значению $\epsilon = 2$, характерному для гексана.

1.5. Структурные («фазовые») переходы в мембранах

Одним из фундаментальных физических явлений, лежащих в основе изменения свойств мембраны, являются «фазовые» переходы липидного бислоя [117]. Переход из одного фазового состояния в другое сопровождается изменением структуры мембраны как в ламеллярном (перпендикулярном поверхности мембраны), так и в латеральном (параллельном) направлении. Наиболее подробно изучен переход из гелевой фазы ($L\beta$) в жидкокристаллическую ($L\alpha$), сопровождающийся резким изменением таких параметров, как «текучесть», проницаемость и удельная теплоёмкость мембраны. В гелевом состоянии гидрофобные хвосты липидов упорядочены и плотно упакованы, мембрана характеризуется низкой подвижностью липидов и высокой жёсткостью [118; 119]. При повышении температуры выше определённой критической точки – температуры фазового перехода (T_m) – мембрана переходит в жидкокристаллическое состояние, где липидные цепи дезорганизованы, а текучесть значительно возрастает [120; 121].

На молекулярном уровне это связано с изменением конформационного состояния углеводородных цепей липидов. В гелевой фазе липиды преимущественно находятся в *транс*-конформации, при которой валентные связи C-C ориентированы линейно, способствуя плотной упаковке цепей. При повышении температуры происходит накопление *гош*-конформаций – изгибов в углеводородных цепях, обусловленных вращением вокруг C-C связей, что приводит к увеличению подвижности цепей, ослаблению межмолекулярных взаимодействий и общей дезорганизации бислоя. Эти микроскопические конформационные изменения служат физическим механизмом фазового перехода и напрямую связаны с макроскопическими свойствами мембраны [117; 122].

Температура структурного перехода зависит от длины и степени насыщенности жирнокислотных остатков фосфолипидов. Температура перехода из гелевой фазы в жидкокристаллическую увеличивается с ростом числа атомов углерода в ацильных цепях липидов. Насыщенные фосфатидилхолиновые липиды с хвостами, содержащими более 14 атомов углерода, являются твёрдыми при комнатной температуре, а липиды с числом атомов углерода менее 14 – жидкими. Например, парафин, состоящий из длинных алканов, является твёрдым при комнатной температуре, а октан – короткий алкан – жидким [123; 124].

Помимо длины ацильной цепи, на температуру перехода может влиять степень ненасыщенности липидных «хвостов». Рассмотрим насыщенные углеводородные цепи. В *транс*-конформации цепь максимально вытянута и сохраняет своё направление, что делает её наиболее стабильной. В *гош*-конформации направление цепи меняется, что приводит к образованию дефекта упаковки. В результате последовательности *гош-транс-гош* для трёх смежных C-C связей в цепи возникает излом (кинк), что приводит к значительному смещению участков цепи

выше и ниже излома относительно друг друга [125]. Формирование подобных структур приводит к появлению подвижных дефектов, которые могут захватывать целые участки мембраны – кластеры [126; 127]. Их количество и подвижность зависят от температуры. В случае ненасыщенных жирных кислот почти все двойные связи в липидах, входящих в состав мембран, находятся в *цис*-конфигурации. Подобно *гош*-форме, это приводит к изменению общей ориентации цепи и формированию дефекта. Пространственные дефекты в структуре бислоя, возникающие при включении в бислой ненасыщенных жирных кислот, отличаются большей стабильностью. Вследствие этих дефектов бислой становится более рыхлым [128]. Иначе говоря, подобные дефекты в структуре бислоя создают дополнительное свободное пространство внутри бислоя, что обеспечивает дополнительную гибкость соседних цепей. Именно это нарушение упаковки приводит к снижению температуры перехода при увеличении количества двойных связей [129]. Уменьшение общей длины цепи на один атом углерода обычно приводит к изменению температуры плавления липида на 10 °C или меньше [130], но добавление одной двойной связи может снизить температуру плавления на 50 °C и более [123; 131]. Переходы между фазами могут сопровождаться промежуточными структурами, такими как «волнистая» фаза ($P\beta'$) [132]. Такие структурные состояния могут быть стабильными при определённых условиях или выступать как переходные фазы [133; 134].

Фазовые свойства мембран играют критическую роль в адаптации организмов к изменениям внешней среды. Например, у бактерий и холоднокровных животных отмечена способность регулировать состав мембранных липидов в ответ на изменение температуры окружающей среды с целью поддержания текучести мембраны в физиологических пределах – явление, известное как гомеовискозная адаптация [16; 135; 136]. Влияние фазового перехода на функционирование интегральных и периферических белков также подтверждено многочисленными исследованиями [137]. Было показано, что активность ряда мембранных ферментов и рецепторов коррелирует с физическим состоянием липидного бислоя [138].

Таким образом, структурные (фазовые) переходы в биомембранах представляют собой не только фундаментальное физико-химическое явление, но и биологически значимый механизм регуляции клеточных процессов. Понимание закономерностей и факторов, влияющих на фазовое поведение липидного бислоя, имеет важное значение для биофизики, клеточной биологии и криобиологии.

Влияние холестерина на структурные переходы в липидной мембране. Существенное влияние на фазовое поведение липидного бислоя оказывает холестерин. Он нарушает регулярную упаковку липидов в гелевой фазе [25; 139] и одновременно ограничивает свободу движения хвостов жирных кислот в жидкой фазе, стабилизируя промежуточное состояние [140]. Это приводит к размыванию фазового перехода, то есть снижению кооперативности процесса:

вместо резкого скачка свойств мембраны при достижении T_m наблюдается постепенное изменение параметров в широком диапазоне температур [141].

Кооперативность фазового перехода отражает степень согласованности изменения состояния липидных молекул: при высокой кооперативности большинство липидов одновременно переходят из одного фазового состояния в другое, что выражается в резком и узком пике на кривой теплоёмкости [123]. В мембранах, содержащих только один вид фосфолипида, такой переход может быть высококооперативным. Однако в биологических мембранах, которые содержат множество типов липидов белков, а также холестерин, кооперативность существенно снижается [141]. Холестерин действует как буфер текучести, препятствуя образованию крупных доменов гелевой фазы и подавляя масштабные кооперативные колебания. Это делает мембрану более стабильной при температурных изменениях, сохраняя функциональные свойства в физиологических условиях [140].

Кроме того, в присутствии холестерина наблюдается образование жидкой упорядоченной фазы, при которой углеводородные цепи липидов остаются в упорядоченном (преимущественно *транс*) состоянии, но обладают повышенной подвижностью [142]. Это состояние отличается от классической жидкой фазы и лежит в основе липидных рафтов – микродоменов с особым липидным составом, участвующих в передаче сигналов, регуляции мембранного транспорта и сборке белковых комплексов [143]. Структурная организация и устойчивость этих доменов в значительной степени зависят от содержания холестерина и способности липидов к упорядоченной упаковке без перехода в жёсткое гелевое состояние [144].

Таким образом, холестерин играет двойную роль: он не только структурно модифицирует липидный бислой, но и существенно влияет на термодинамику фазового перехода, снижая его кооперативность и обеспечивая функциональную устойчивость мембраны в физиологически значимом температурном диапазоне [141; 145].

1.6. Фазовые переходы в модельных системах

Исследование фазового поведения биологических мембран затруднено высокой сложностью их состава, включающего множество разновидностей липидов, белков, углеводов и других молекул [120; 122]. Поэтому для получения воспроизводимых и интерпретируемых результатов часто используют модельные липидные мембраны, состоящие из одного, двух или трёх компонентов. Такие системы позволяют варьировать состав с высокой точностью и контролировать физико-химические параметры, что делает их незаменимыми для изучения механизмов фазовых переходов [122; 146].

Влияние холестерина на фазовые переходы мембран наиболее наглядно и удобно изучать на бинарных модельных липидных системах [140]. Одной из наиболее изученных модельных

систем является смесь дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ) и холестерина. Чистый ДПФХ образует хорошо охарактеризованную липидную мембрану с резким, высококооперативным фазовым переходом при температуре около 41 °С [124]. Это делает его «эталонным» липидом для изучения изменений термотрофических свойств при добавлении холестерина [119].

Л. Редондо-Мората, М. И. Джаннотти и Ф. Санз [147] показали, что моноламеллярные липосомы из ДПФХ претерпевают резкий фазовый переход из гель-фазы (S_o или L_β) в жидкокристаллическую фазу (L_α) при температуре 41,6 °С. Для липосом ДПФХ при 34,6 °С наблюдается также предпереход, соответствующий переходу от кристаллической гель-фазы к волнистой гелевой фазе (P_β). При добавлении 10 мол. % холестерина к смеси температура основного перехода снижается до 40,5 °С, а предпереход больше не наблюдается. Кроме того, эндотермический пик демонстрирует асимметрию, что может быть связано с наложением на основной фазовый переход теплового компонента, обусловленного плавлением минорной составляющей смеси, отличающейся от основной по составу и свойствам. Наличие более одного перехода становится ещё более очевидным при увеличении концентрации холестерина в смеси. При 20 мол. % холестерина наблюдаются, по крайней мере, острый маленький пик и очень широкий пик. При 30 мол. % острая компонента плавления уменьшается, а широкая – становится ещё шире. В основном температура перехода не изменяется, но меняются относительные вклады двух основных компонент. Для 40 и 50 мол. % холестерина фазовый переход не наблюдается [147].

Существует общее мнение, что липиды в таких мембранах могут находиться в одной из трёх фаз: гелевой (S_o), жидкокристаллической (L_α) или упорядоченной жидкокристаллической (L_o) [141]. Когда концентрация холестерина в смеси составляет менее 10 мол. %, он полностью равномерно смешивается с L_α (выше температуры фазового перехода) и S_o (ниже температуры фазового перехода). При более высоких концентрациях холестерина, ниже температуры плавления смеси, система разделяется на две фазы: фазу, богатую холестерином (жидкоупорядоченная, L_o), и фазу с низким содержанием холестерина (гель-фаза S_o). Эти две фазы находятся в равновесии, пока общая концентрация холестерина в смеси не достигнет концентрации L_o -фазы, которая составляет около ~ 30 мол. %. При более высоких концентрациях холестерина происходит лишь обогащение «жидкой» фазы растворённым холестерином [148; 149]. При содержании холестерина в смеси более 50 мол. % избыток холестерина образует БДХ внутри фазы L_o [150].

Таким образом, в диапазоне концентраций холестерина от 10 до 40 мол. % поведение системы ДПФХ/холестерин при плавлении характеризуется двумя компонентами: «острой» компонентой, связанной с плавлением доменов ДПФХ с низким содержанием холестерина (S_o); более широкой компонентой, связанной с плавлением доменов ДПФХ, обогащённых

холестерином (Lo) [151; 152]. В интервале концентраций холестерина от 40 до 50 мол. % включительно фазовый переход не наблюдается, что позволяет предположить, что бислой является однородным и находится в Lo-фазе в исследуемом диапазоне температур [147].

Хотя при дифференциально-сканирующей калориметрии (ДСК) исследовании липосом ДПФХ/холестерин с высоким (40–50 мол. %) содержанием холестерина фазовый переход не наблюдается, исследователями [147] с использованием атомно-силовой микроскопии было продемонстрировано, что плоские бислойные мембраны ДПФХ/холестерин с содержанием холестерина 40 и 50 мол. % претерпевают фазовый переход при температуре около 42–45 °С. Ниже этой температуры система находится в фазе Lo и демонстрирует уникально высокую латеральную степень упорядоченности, характерную для бислоев в гель-фазе, а с повышением температуры она постепенно становится системой с более высокой латеральной подвижностью. Вероятно, наблюдаемый фазовый переход является переходом второго порядка. В ДСК-экспериментах такого рода переходы, как правило, проявляются в виде сильно размытого (широкого) пика или вовсе не регистрируются [147].

Известно, что в плоских липидных мембранах с соотношением ДПФХ/холестерина 1:1 формируется структура, обладающая повышенной механической стабильностью как в гелевой, так и в жидкокристаллической фазах [147]. При температурах, превышающих область фазовых переходов ($T \approx 55$ °С), параметр F_b – так называемая сила прорыва (максимальная сила, которую может выдержать мембрана до локального разрушения под действием зонда) – остаётся практически неизменным при увеличении концентрации холестерина до 40 мол. % и составляет порядка 8 нН. Для сравнения, в плоских бислойных мембранах с эквимольным соотношением ДПФХ/холестерин значение F_b составляет $11,1 \pm 1,3$ нН.

1.7. Особенности липидного состава мембраны сперматозоидов

Липидный состав плазматической мембраны сперматозоидов определён для различных видов млекопитающих [153–155]. Существуют некоторые межвидовые различия, но в целом известно, что 70 % от общего количества липидов плазматической мембраны сперматозоидов составляют фосфолипиды, 25 % – нейтральные липиды и 5 % – гликолипиды (в молярном соотношении). Основными представителями фосфолипидов являются глицерофосфолипиды, среди которых преобладают фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин. Примечательно, что значительную часть этих фосфолипидов составляют плазмалогены, глицерин в составе которых этерифицирован жирной кислотой в положении *sn*-2, а в положении *sn*-1 образует эфирную связь с алкильным или алкенильным фрагментом; в результате образуются два типа эфирных фосфолипидов, а именно плазманил (алкильный фрагмент) и плазменил (алкенильный фрагмент) [156]. Липиды мембран сперматозоидов содержат большое количество полиненасыщенных

жирных кислот (ПНЖК), таких как арахидоновая (20:4), докозапентаеновая (22:5) и докозагексаеновая кислота (22:6) [157]. Другой особенностью, которая отличает мембраны сперматозоидов от мембран соматических клеток, является наличие в сфинголипидах очень длинных ПНЖК [158–160]. Эти полиеновые ацильные фрагменты имеют значительную длину, варьирующуюся от 28 до 34 углеродных атомов и от 4 до 6 двойных связей. Наличие множества двойных связей делает мембраны сперматозоидов особенно уязвимыми для перекисного окисления липидов активными формами кислорода (АФК) [161]. Что касается нейтральных липидов, то мембраны сперматозоидов в основном содержат диацилглицерин и холестерин. Как правило, синтез гликолипидов включает связывание головной группы гликозидов с церамидами [162]. Семинолипид (сульфогалактозилглицеролипид) – единственное исключение среди гликолипидов, в его молекулярной структуре есть сульфогалактозилглицерин. Этот основной анионный гликолипид содержится исключительно в мембранах сперматозоидов. Он играет важную роль на различных стадиях созревания и функционирования сперматозоидов [163–165]. Основные данные о липидном составе плазматической мембраны сперматозоидов приведены в Таблице 1.

Таблица 1 – Липидный состав плазматической мембраны сперматозоидов человека. Таблица составлена по материалам исследований: [166–169]

Компонент		нмоль/10 ⁸ сперматозоидов	% от всех жирных кислот	%
Фосфолипиды				
Холиндиаглицерофосфаты		37,0	–	
Этаноламинглицерофосфолипиды		31,5	–	
Этаноламиновые плазмогены		20,0	–	
Сфингомиелин		20,0	–	
Холиновые плазмогены		12,5	–	
Жирнокислотный состав фосфолипидов				
Насыщенные жирные кислоты (ПНЖК)			49,95	НЖК
	Пальмитиновая (C16)	105,5	29,73	59,52
	Стеариновая (C18)	35,9	11,35	22,72

Продолжение Таблицы 1

Компонент		нмоль/10 ⁶ сперматозоидов	% от всех жирных кислот	%
Ненасыщенные жирные кислоты (НЖК)			50,05	ПНЖК
	Докозагексаеновая (C22:6; (3))	108,0	21,54	43,04
	Олеиновая кислота (C18:1; (9))	32,6	9,17	18,32
	Линолевая кислота (C18:2; (6))	23,2	3,91	7,81
	Арахидоновая (C20:4; (6))	20,1	2,39	4,77
	Икозатриеновая (C20:3; (6))	14,9	2,71	5,41
Стероиды (нейтральные липиды)				
Холестерол		133,0	—	—
Демостерол		78,5	—	—
Гликолипиды		6,4	—	—

1.8. Функции холестерина в сперматозоидах

Холестерин в мембране сперматозоидов выполняет не только структурную, но и регуляторную функцию. Он способен модулировать работу мембранных белков – рецепторов, каналов и ферментов [170–172]. Многие из этих белков отличаются высокой чувствительностью к изменениям липидного окружения [173–176]. Некоторые белки могут также напрямую взаимодействовать с молекулами холестерина, что приводит либо к их активации, либо к инактивации [177; 178]. Активность белков, регулируемых холестерином, вероятно, опосредована через стерол-чувствительные домены [176; 177]. Нормальное функционирование белков, включённых в липидные рафты, невозможно без участия холестерина, так как он необходим для их формирования [178]. В плазматической мембране сперматозоидов холестерин имеет особое значение: его перераспределение и частичный отток из мембраны являются одним из ключевых механизмов капацитации сперматозоидов и обязательным этапом подготовки к последующей акросомальной реакции, что обеспечивает способность сперматозоида к оплодотворению яйцеклетки [179–181].

При прохождении через женский репродуктивный тракт к месту оплодотворения в яйцевоме сперматозоиды подвергаются воздействию сложной и разнообразной биохимической среды, что приводит к их капацитации [182; 183], последнему событию созревания, необходимому для успешного оплодотворения. В ходе этого процесса сперматозоиды претерпевают ряд функциональных изменений, которые в совокупности обеспечивают способность этих клеток к гиперактивации (энергичной и пропульсивной подвижности), акросомальной реакции и оплодотворению яйцеклетки [184; 185]. Примечательно, что во время этой трансформации, наряду с активацией сигнальных путей [186], изменением ионной проницаемости [187] и фосфорилированием белков (серина, треонина и тирозина) [188], плазматическая мембрана сперматозоидов подвергается обширному ремоделированию [189; 190]. Это ремоделирование представляет собой серию последовательных изменений плазматической мембраны, включающих в себя повышение текучести мембраны под действием опосредованной бикарбонатом активности циклического аденозинмонофосфата – протеинкиназы А (цАМФ-ПКА) [191], истощение холестерина из мембраны сперматозоидов внеклеточными акцепторами, в частности альбумином и липопротеинами высокой плотности, и, наконец, последующего перераспределения липидных рафтов, с которыми ассоциированы необходимые для оплодотворения белки, в апикальную область головки сперматозоида [189; 192].

Отток холестерина из мембраны сперматозоидов в процессе капацитации в основном рассматривался исследователями как механизм дестабилизации плазматической мембраны для облегчения слияния мембраны сперматозоида с мембраной яйцеклетки. Однако со временем эта парадигма претерпела значительные изменения: стало понятно, что истощение холестерина является одним из ключевых событий капацитации, в связи с чем молекулярные мишени холестерина в сперматозоидах активно изучаются [193]. Например, было показано, что мембранный холестерин ведёт себя как функциональный ингибитор TRPV1, ванилоидного рецептора первого типа, участвующего в термотаксисе сперматозоидов, а именно способности клеток мигрировать в направлении возрастающего температурного градиента [194]. Ингибирующее действие холестерина опосредовано его взаимодействием с аминокислотной консенсусной последовательностью распознавания холестерина (CRAC), присутствующей в спиральном домене S5 канала TRPV1, что подтверждается более низкой эффективностью эпихолестерина: 3-гидрокси-эпимерхолестерин демонстрирует неоптимальное межмолекулярное взаимодействие с предполагаемым сайтом связывания на TRPV1 [194; 195].

Совсем недавно была идентифицирована ещё одна молекулярная мишень холестерина – протонный потенциал-зависимый канал hHv1, участвующий в регуляции внутриклеточного pH многих типов клеток, включая сперматозоиды [196]. В работе Хана и соавторов было показано,

что холестерин ингибирует протонный канал hHv1 посредством стабилизации вольт-чувствительного сегмента S4 в конформации покоя, подавляя открытие канала – механизм, который также используется Zn^{2+} и который был хорошо охарактеризован с помощью различных подходов [197–199]. Отток холестерина приводит к открытию канала и цитоплазматическому ошелачиванию, которое является ключевым фактором, активирующим основной кальциевый канал сперматозоидов CatSper [200; 201]. CatSper опосредует гиперактивированную подвижность сперматозоидов во время капацитации [202; 203], а вырабатываемый им кальциевый ток необходим для акросомальной реакции [204; 205].

Следует отметить, что CatSper также является эффектором мембранного рецептора прогестерона ABHD2 (рецептор прогестерона: белок 2, содержащий домен α/β -гидролазы). Согласно предложенной прогестерон-эндоканнабиноидной модели ((P4)-ABHD2) [206] в сперматозоидах, связывание прогестерона (P4) с ABHD2 активирует липидную гидролазную функцию рецептора, истощая эндоканнабиноид 2-арахидоноилглицерол (2AG) из плазматической мембраны. Поскольку 2AG оказывает ингибирующее действие на CatSper, ABHD2-зависимое удаление 2AG устраняет ингибирование CatSper. Результаты молекулярно-динамического анализа показали, что холестерин может напрямую взаимодействовать с ABHD2, влияя на конформационную свободу ключевых аминокислот, участвующих в связывании субстратов фермента, тем самым ингибируя ABHD2 и нарушая прогестерон-опосредованное истощение эндоканнабиноида с помощью ABHD2. Предложенный механизм регуляции прогестерон-опосредованной активации сперматозоидов мембранным холестерином подтверждается тем фактом, что содержание холестерина в мембране коррелирует со всеми признанными прогестерон-опосредованными функциями сперматозоидов (событиями): хемотаксисом, концентрацией внутриклеточного кальция, изменением паттерна подвижности и акросомальной реакцией [206].

Данные биохимического анализа и визуализации высокого разрешения подтверждают прямую роль холестерина в экзоцитозе акросомы сперматозоида, поскольку члены семейства SNAREs (растворимые рецепторы белков прикрепления N-этилmaleимидчувствительного фактора), такие как синтаксин 1 и синаптосомно-ассоциированный белок 25 (SNAP 25), сосредоточены в холестерин-обогащённых доменах (рафтах), известных как кластеры SNAP 25 и синтаксина [207–210]. Присутствие SNAREs в липидных рафтах концентрирует эти белки в определённых зонах плазматической мембраны, определяя наиболее подходящие для их активности участки мембраны. Липидные рафты сперматозоидов разных видов млекопитающих, включая человека, обогащены R-SNAREs, такими как синаптобrevин (VAMP), и Q-SNAREs, такими как синтаксин, а также Ca^{2+} сенсорный белок синаптотагмин [211–213]. Интересно, что SNARE сперматозоидов и зона пеллюцида (ЗП)-связывающие белки агрегируются в одной и той

же области мембраны головки сперматозоида, и это имеет значение для ЗП-связывания и ЗП-индуцированной акросомальной реакции [214].

Ещё одной специфической мишенью холестерина является белок Rab3A, член суперсемейства малых ГТФ-связывающих белков, который участвует в кальций-зависимом экзоцитозе в различных клетках, включая нейроны, хромаффинные клетки, клетки поджелудочной железы, меланотрофы и сперматозоиды млекопитающих [215]. Содержание стерина не влияет на цикл активации-деактивации Rab3A, но регулирует его прикрепление к мембране. Первоначально SNARE сперматозоидов концентрируются в липидных рафтах, а Rab3A остаётся в цитозоле. Однако при снижении уровня холестерина активный Rab3A может присоединять свои геранилгераниловые группы к мембране, рекрутируя эффекторы и инициируя привязку наружной акросомальной мембраны к плазматической мембране. Таким образом, отток холестерина способствует созданию условий, необходимых для эффективной сборки механизмов слияния мембран, что приводит к экзоцитозу акросомы [215; 216].

1.9. Способы модификации липидного состава мембраны

1.9.1. Модификация криопротекторной среды яичным желтком

Яичный желток (ЯЖ) на протяжении многих десятилетий используется в составе криопротекторных сред для замораживания сперматозоидов животных [217–221]. Его эффективность как защитного агента при криоконсервации обусловлена уникальным химическим составом, включающим фосфолипиды, триглицериды, липопротеины, антиоксиданты и холестерин [222–224].

Одним из ключевых компонентов, определяющих эффективность яичного желтка как криопротектора, являются липопротеины низкой плотности (ЛПНП) [225–227]. Эти макромолекулярные комплексы представляют собой высокоупорядоченные коллоидные структуры, образованные липидами и аполипопротеинами, и обладают выраженной способностью к стабилизации клеточных мембран в условиях криостресса. ЛПНП проявляют многоуровневую криозащитную активность, основными направлениями которой являются:

- 1) мембраностабилизирующее действие: благодаря встраиванию в клеточные мембраны, фосфолипиды и холестерин стабилизируют липидный бислой [228], препятствуя фазовым переходам и образованию дефектов мембраны, возникающим при охлаждении [229–231];
- 2) осмотическая буферизация: ЛПНП, благодаря своей коллоидной природе, формируют устойчивую вязкую дисперсную фазу, в которой липидные и белковые компоненты образуют микроокружение вокруг клеток [232]. Такая структура существенно снижает скорость выхода воды из клетки и ограничивает резкое повышение ионной активности во внеклеточной среде.

Дополнительно, поверхностная активность фосфолипидов и холестерина в составе ЛПНП может способствовать связыванию ионов и стабилизации мембранных структур. В совокупности эти эффекты позволяют поддерживать более стабильный ионно-водный баланс в процессе охлаждения и оттаивания, снижая вероятность осмотически индуцированных повреждений и повышая выживаемость клеток после криоконсервации [233]; 3) антиоксидантная защита: в составе ЛПНП присутствуют жирорастворимые антиоксиданты, такие как витамин Е и каротиноиды, которые нейтрализуют активные формы кислорода и уменьшают перикисное окисление липидов мембраны, вызванное криоконсервацией [230].

1.9.2. Модификация мембран сперматозоидов соевым лецитином

В последние годы внимание исследователей привлекает соевый лецитин (СЛ) как перспективная растительная альтернатива ЯЖ в качестве криозащитного агента [234]. Его применение обусловлено как биохимической схожестью с компонентами мембран, так и этическими, экономическими и санитарными соображениями [235].

СЛ представляет собой смесь фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилинозитола и свободных жирных кислот, получаемую при переработке соевого масла [236]. В основе криозащитного действия СЛ лежит способность фосфолипидов СЛ встраиваться в клеточные мембраны, стабилизируя липидный бислой и снижая вероятность перехода в гелевую фазу при понижении температуры ниже температуры фазового перехода [237]. Кроме того, СЛ обладает способностью предотвращать перикисное окисление липидов и снижать уровень активных форм кислорода (АФК) при оттаивании [238]. С помощью метода криомикроскопии было установлено, что два препарата липидов, выделенных из морских позвоночных, а также липосомы, изготовленные из липидов спермы форели, эффективно препятствуют росту кристаллов льда в многокомпонентных растворах при их замораживании. При этом форма и размер кристаллов существенно изменяются: в присутствии высоких концентраций липидов образование кристаллов либо не происходит, либо образующиеся кристаллы имеют неправильную форму и размытые границы. Добавление яичного желтка приводит к увеличению размера и значительному изменению формы кристаллов льда, образующихся при замерзании раствора [239].

Согласно результатам проведённых исследований, СЛ способен эффективно выполнять криопротекторную функцию ЯЖ при добавлении в среды для криоконсервации спермы быков, баранов и кабанов, обеспечивая аналогичные или даже более высокие показатели подвижности и жизнеспособности сперматозоидов после размораживания [240–242]. Установлено, что использование СЛ при криоконсервации сперматозоидов человека приводит к статистически значимому повышению процента прогрессивно подвижных сперматозоидов после оттаивания

[243]. Тем не менее при криоконсервации спермы некоторых видов млекопитающих, например лошадей, ЯЖ показывает более высокую эффективность по сравнению с СЛ, что, вероятно, обусловлено видоспецифическими особенностями липидного состава клеточных мембран [244].

1.9.3. Модификация мембран сперматозоидов холестерином с помощью липосом с холестерином или комплексов циклодекстрины – холестерин

Ещё одной альтернативой ЯЖ являются технологии целенаправленной модификации мембран сперматозоидов с помощью экзогенного холестерина [245; 246]. В частности, согласно исследованиям, липосомы с холестерином и комплексы холестерина с циклодекстринами позволяют напрямую повышать молярное отношение холестерин/фосфолипиды в мембране сперматозоидов [247].

Липосомы. Механизм действия липосом заключается в их слиянии с наружным монослоем плазматической мембраны сперматозоида, что обеспечивает прямую доставку холестерина в липидный бислой. Данный метод был апробирован при криоконсервации сперматозоидов различных видов животных и показал вариабельные результаты – от отсутствия эффекта до умеренного улучшения посткриогенных показателей – в зависимости от вида [248].

Циклодекстрины. Циклодекстрины представляют собой циклические олигосахариды, состоящие из остатков D-(+)-глюкопиранозы, связанных α -D-1,4-гликозидной связью [249]. Циклодекстрины обладают гидрофильной внешней поверхностью и гидрофобной внутренней полостью, способной образовывать комплексы включения с широким спектром гидрофобных гостевых молекул [250]. Включение происходит в основном за счёт гидрофобных и ван-дер-ваальсовых взаимодействий [251]. Номенклатура циклодекстринов определяется количеством остатков глюкозы в их структуре. Так, гексамер глюкозы обозначается как α -ЦД, гептамер – β -ЦД, а октомер – γ -ЦД [252]. Степень полимеризации определяет размер гидрофобной полости и, следовательно, сродство носителя с определёнными классами соединений [253]: α -ЦД обладают наивысшим сродством к фосфолипидам, а β -ЦД – к холестерину [254]. Стоит отметить, что полость одной молекулы β -ЦД ($\sim 8 \text{ \AA}$) слишком мала, чтобы полностью экранировать молекулу холестерина ($\sim 18 \text{ \AA}$) от молекул воды [255]. Существование комплекса включения холестерина на основе β -ЦД со стехиометрией 1:2 было неопровержимо доказано с помощью дифракционного анализа: в результате взаимодействия двух молекул β -ЦД с молекулой холестерина последняя оказывается инкапсулированной с обоих концов: стероидное ядро входит в полость одной молекулы β -ЦД, а боковая цепь – в полость другой [256].

Применение нативных β -ЦД затруднено из-за их низкой растворимости в полярных растворителях (18,8 г/л при 25 °С для воды) [257]. Растворимость β -ЦД и комплексов включения на его основе может быть значительно повышена модификацией гидроксильных групп

различными заместителями [258]. Метилированные производные β -ЦД, такие как 2,6-ди-О-метил β -ЦД и 2,3,6-три-О-метил- β -ЦД, известны своей высокой растворимостью в воде (> 300 г/л) [259]. Однако в связи с трудоёмкостью синтеза дизамещенного производного [260] использование произвольно замещённого производного RAMEB в настоящее время является предпочтительным [261]. Эффективность применения комплексов метил- β -циклодекстринов с холестерином при криоконсервации сперматозоидов сельскохозяйственных животных подтверждена рядом исследований [28; 29; 31].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы, использованные в работе: набор реагентов для определения холестерина «Холестерин-ФКД» (Агат, Россия); набор для оценки жизнеспособности сперматозоидов Vital Screen (FertiPro, Бельгия); набор для оценки фрагментации ДНК сперматозоидов DeadEnd Fluorimetric TUNEL System (Promega, США); раствор Дюльбекко с Ca^{2+} Mg^{2+} – DPBS (Панэко, Россия); фосфатно-солевой буфер – PBS (Solarbio, Китай); среда Sperm Wash (Vitromed, Германия); среда All Grad Wash (Vitromed, Германия); криопротекторная среда Sperm Freeze (Fertipro, Бельгия); среда HTF HEPES (Genotec, Нидерланды); холестерин, лецитин, сухой порошок яичного желтка (Sigma, США); метил- β -циклодекстрины RAMEB (степень замещения $\text{DS} = 1,5\text{--}2,1$ метильных групп на каждый остаток глюкозы) (Sigma, США); ДНaza I (Sigma, США), спиновый зонд – 5-доксил стеарат (5-ДС, Sigma, США); поли-л-лизин (Polysine, Menzel-Glaser); уксусный ангидрид, хлороформ (х. ч.), метанол (х. ч.), этанол (х. ч.), серная кислота (о. с. ч.) – производства «Реахим» (Россия); бромид калия для спектроскопии (Aladdin, Китай).

Объект исследования. В работе использованы образцы эякулята доноров с нормозооспермией (по критериям 6-го издания руководства ВОЗ [262]). Критерии включения в исследование: концентрация сперматозоидов ≥ 50 млн/мл; доля прогрессивно подвижных сперматозоидов (категории a+b) $\geq 32\%$; доля сперматозоидов с нормальной морфологией по строгим критериям Крюгера $\geq 4\%$; концентрация лейкоцитов ≤ 0.2 млн/мл. Образцы спермы доноров были предоставлены клиникой «Альтравита», г. Москва.

2.1. Оценка концентрации, подвижности и жизнеспособности сперматозоидов

Оценка концентрации и подвижности сперматозоидов. После получения образец эякулята помещали на подвижный лоток орбитального смесителя для разжижения. Разжижение при комнатной температуре обычно наступает в течение 15–30 мин, после чего приступали к оценке макро- и микроскопических параметров эякулята.

Концентрацию и подвижность сперматозоидов определяли с использованием счётной камеры Маклера, позволяющей проводить измерения без предварительного разбавления образца и без фиксации клеток. Верхняя часть камеры Маклера выполняет роль покровного стекла, в центре которого нанесена сетка площадью 1 мм^2 , разделённая на 100 квадратов размером 100×100 мкм. Глубина камеры – 10 мкм, поэтому объём десяти квадратов составляет 10^6 мкм³. Соответственно, число сперматозоидов в десяти квадратах численно равно их концентрации в млн/мл. Для повышения точности подсчёт выполняли в нескольких полях зрения в пределах сетки камеры Маклера и вычисляли среднее значение.

Оценку подвижности сперматозоидов проводили по четырём категориям: а – быстрое прогрессивное движение (сперматозоид пересекает квадрат камеры Маклера за 4 с), b – медленное прогрессивное движение, с – непрогрессивное движение, d – неподвижные сперматозоиды. Проводили оценку подвижности 100 сперматозоидов в нескольких соседних квадратах камеры Маклера. В каждом квадрате сначала учитывали все прогрессивно подвижные сперматозоиды, избегая подсчёта тех сперматозоидов, которые заплывают в квадрат камеры во время подсчёта, затем подсчитывали непрогрессивно подвижные и неподвижные сперматозоиды в том же квадрате. Если число сперматозоидов достигало 100 до того, как были подсчитаны все категории подвижности в последнем квадрате, подсчёт продолжали до тех пор, пока не будут учтены все категории. Это необходимо для того, чтобы избежать смещения в сторону категории прогрессивно подвижных сперматозоидов, которые подсчитываются первыми. Рассчитывали долю (%) четырёх категорий подвижности.

Тест на жизнеспособность сперматозоидов. Оценку жизнеспособности сперматозоидов проводили с использованием коммерческого набора VitalScreen в соответствии с протоколом производителя. Метод основан на окрашивании клеток красителями – эозином и нигрозином. Эозин проникает только в сперматозоиды с повреждённой плазматической мембраной, вследствие чего головки мёртвых сперматозоидов приобретают красный или розовый цвет, а живые остаются неокрашенными (головка белая). Сперматозоиды с бледно-розовой головкой также относили к мёртвым. Нигрозин обеспечивает окрашивание фона в чёрный цвет, что повышает контраст и облегчает визуализацию клеток. Для оценки жизнеспособности сперматозоидов на предметное стекло наносили 5 мкл исследуемого образца и 5 мкл реагента с эозином, тщательно перемешивали в течение 30 с, затем добавляли 5 мкл реагента с нигрозином, перемешивали и накрывали покровным стеклом. Долю жизнеспособных клеток определяли по формуле:

$$\% \text{ живых} = \frac{N_{\text{неокрашенных}}}{N_{\text{общее}}} \times 100 \% \text{ (I)},$$

Для каждого образца подсчёт проводили не менее чем на 200 сперматозоидов. Результат округляли с точностью до целого числа.

2.2. Криоконсервация сперматозоидов

Криоконсервацию сперматозоидов выполняли с использованием криопротекторной среды Sperm Freeze (SF) в соответствии с протоколом фирмы-изготовителя. Криопротекторную среду добавляли к образцу из расчета 0,7 мл среды на 1 мл образца. Криопротекторную среду вносили по каплям, со скоростью 2–3 капли/с, при этом пробирку с образцом постоянно перемешивали

на вортексе. После добавления криопротекторной среды содержимое криопробирки тщательно перемешивали и инкубировали образец в течение 10 мин при комнатной температуре.

Замораживание образцов осуществляли путём трехэтапного ступенчатого охлаждения в парах жидкого азота в течение 45 мин, после чего образцы помещали в жидкий азот. Для обеспечения ступенчатого охлаждения применяли устройство Handi-freezer (Freezing tray Taylor-Wharton), оснащённое винтовым механизмом, позволяющим постепенно перемещать образцы в парах азота. Размораживание образцов проводили на водяной бане при 37 °C в течение 5 мин.

Долю прогрессивно подвижных сперматозоидов (категории a + b) после размораживания выражали через индекс подвижности:

$$I_{motility} = \frac{P_{postthaw}}{P_{prefreeze}} \times 100 \% \text{ (II)},$$

где $I_{motility}$ – индекс подвижности, $P_{postthaw}$ – доля прогрессивно подвижных сперматозоидов с категориями подвижности a и b после разморозки, а $P_{prefreeze}$ – доля сперматозоидов с категориями подвижности a и b до криоконсервации (в нативном образце). Долю сперматозоидов с интактной мембраной после размораживания выражали через индекс «жизнеспособности»:

$$I_{viability} = \frac{V_{postthaw}}{V_{prefreeze}} \times 100 \% \text{ (III)},$$

где $I_{viability}$ – индекс «жизнеспособности», $V_{postthaw}$ – доля сперматозоидов с интактной мембраной после разморозки, $V_{prefreeze}$ – доля сперматозоидов с интактной мембраной до криоконсервации (в нативном образце).

2.3. Оценка фрагментации ДНК сперматозоидов в нативном и криоконсервированных – размороженных образцах

Подготовка образцов и дизайн эксперимента. Эякулят делили на 3 равные по объёму аликвоты. К первой аликвоте добавляли среду SpermWash в соотношении 1:3 (об./об.), центрифугировали при 300 g в течение 10 мин, отбирали супернатант, осадок ресуспендировали в среде SpermWash. Вторую аликвоту замораживали в соответствии с протоколом (Пункт 2.2). Третью аликвоту замораживали без добавления криопротекторной среды. Размороженные образцы переносили в центрифужные пробирки и медленно добавляли 3 мл среды SpermWash (2–3 капли/с) при постоянном перемешивании на вортексе. Образцы центрифугировали в течение 10 мин при 300 g, после чего супернатант удаляли, а полученные осадки ресуспендировали в среде SpermWash. Оценку фрагментации ДНК сперматозоидов проводили через 0 ч (для нативного образца – сразу после отмывки от семенной плазмы, для криоконсервированных образцов – сразу после размораживания и отмывки), а также через 24 ч инкубации при комнатной температуре.

Оценка фрагментации ДНК сперматозоидов. Фрагментацию ДНК сперматозоидов определяли методом TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labeling), основанным на катализируемом терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазой (ТдТ) присоединении флуоресцентно-меченых нуклеотидов к свободным 3'-концам ДНК. Для анализа использовали коммерческий набор DeadEnd Fluorimetric TUNEL System. В качестве флуорохрома в данном наборе используется флуоресцеин-12-dUTP (флуоресцеин-5(6)-карбоксамино-капроил-(5-(3-аминоаллил)-2'-дезоксиуридин-5'-трифосфат), который при возбуждении при 495 нм испускает свечение с максимумом 521 нм.

Оценку фрагментации ДНК выполняли в соответствии с инструкцией производителя. На предметные стёкла, покрытые поли-л-лизином, наносили 10–15 мкл суспензии сперматозоидов, готовили мазки и высушивали при комнатной температуре в течение 10 мин. Препараты фиксировали в 4%-м растворе параформальдегида при 4 °С в течение 20 мин, после чего двукратно промывали фосфатно-солевым буфером (PBS). Далее мембраны пермеабилizировали в 0,2 %-м растворе Triton X-100 в течение 5 мин, после чего препараты двукратно промывали в PBS. На препараты наносили 100 мкл реакционного буфера (200 мМ $(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2\text{H}$ (pH 6,6 при 25 °С), 0,2 мМ DDT, 0,25 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 2,5 мМ CoCl_2) и инкубировали под парафильмом 10 мин при комнатной температуре. Для реакции TUNEL на препараты наносили 50 мкл реакционной смеси (45 мкл реакционного буфера + 5 мкл смеси флуорисцентно-меченых нуклеотидов + 1 мкл ТдТ), накрывали пленкой «parafilm» и инкубировали в тёмном месте при 37 °С в течение 1 ч. По окончании инкубации препараты отмывали двумя сменами PBS. Для ингибирования реакции помещали препараты в 2×SSC (20×SSC: 7 г NaCl, 1 г цитрата натрия на 500 мл H_2O , разбавление 1:10) на 15 мин при комнатной температуре, после чего двукратно промывали PBS. Для контрастного окрашивания ядер применяли краситель Hoechst 33258 (2'-(4-гидроксифенил)-5-(4-метил-1-пиперазинил)-2,5'-би-1Н-бензимидазол).

В качестве негативного контроля окрашивание проводили по стандартному протоколу без добавления ТдТ. Для позитивного контроля после этапа пермеабилзации и промывки в PBS на препараты наносили 100 мкл буфера ДНаза I (40 мМ Трис-HCl (pH 7,9 при 25 °С), 10 мМ NaCl, 6 мМ MgCl_2 , 10 мМ CaCl_2) и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Затем на препарат наносили 100 мкл буфера ДНаза I, содержащего 5,5–10 Ед/мл фермента ДНаза I, и повторно инкубировали 10 мин при комнатной температуре. После 3–4 промывок в деионизированной воде фрагментацию ДНК определяли согласно вышеописанного протоколу.

Препараты анализировали с использованием флуорисцентного микроскопа Olympus BX51 (увеличение $\times 40$; λ возбуждения 495 нм, λ эмиссии 521 нм). Для каждого образца подсчёт проводили не менее чем на 200 сперматозоидов.

2.4. Модификация криопротекторной среды яичным желтком

Приготовление раствора яичного желтка. Сухой порошок яичного желтка (ЯЖ) смешивали со средой Sperm Wash в соотношении 3:37 (по массе). Смесь подвергали ультразвуковой обработке (Bandelin Sonorex, 35 кГц, 10 мин), после чего центрифугировали (Eppendorf, ротор F 0650, 3000 об/мин, 10 мин). Полученный супернатант использовали в качестве рабочего раствора. Концентрацию желтка определяли весовым методом по сухому остатку, в среднем она составляла 24,7 мг/мл.

Определение оптимальной концентрации яичного желтка. К криопротекторной среде SF добавляли рабочий раствор ЯЖ; итоговая концентрация в полученных растворах составляла 0,7–5,6 мг/мл. Эякулят делили на аликвоты по 200 мкл, к которым добавляли по 140 мкл полученных растворов среды SF с различными концентрациями ЯЖ. Замораживание и последующее размораживание проводили в соответствии с описанными ранее протоколами (Пункт 2.2.). Непосредственно после размораживания образцов оценивали подвижность сперматозоидов.

Оценка эффективности криопротекторной среды, модифицированной яичным желтком. К криопротекторной среде SF добавляли стоковый раствор ЯЖ так, что концентрация ЯЖ в полученном растворе составляла 5,6 мг/мл. Из эякулята отбирали две аликвоты по 200 мкл; к одной аликвоте добавляли 140 мкл криопротекторной среды SF, ко второй аликвоте добавляли 140 мкл среды SF с 5,6 мг/мл ЯЖ. Образцы замораживали и размораживали в соответствии с протоколами, описанными ранее (Пункт 2.2.). Непосредственно после размораживания образцов оценивали подвижность сперматозоидов.

2.5. Определение концентрации холестерина в мембранах сперматозоидов человека

Подготовка образцов. К эякуляту добавляли раствор DPBS в соотношении 1:2 (по объёму) и центрифугировали при 300 g в течение 10 мин. Отбирали супернатант, осадок ресуспендировали в 2 мл DPBS и повторно центрифугировали при 300 g в течение 10 мин. Отбирали супернатант, осадок ресуспендировали в 200–500 мкл DPBS, в зависимости от объема осадка, проводили подсчёт концентрации клеток в камере Маклера (подсчёт проводили не менее чем в 5 разных аликвотах, рассчитывали среднее значение концентрации сперматозоидов в образце). Далее определяли концентрацию холестерина с помощью одного из нижеописанных методов.

Экстракция липидов по методу Фолча. Экстракцию липидов проводили методом Фолча [263]. К 100 мкл суспензии клеток добавляли 4 мл смеси хлороформа и метанола (2:1, об./об.),

перемешивали на вортексе в течение 5 мин, затем добавляли 750 мкл деионизированной воды и центрифугировали при 10 000 g в течение 15 мин при комнатной температуре. Нижний органический слой, содержащий липиды, отбирали, после чего процедуру экстракции повторяли, добавляя 4,3 мл хлороформа, 700 мкл метанола и 500 мкл воды. Смесь перемешивали на вортексе 5 мин, затем центрифугировали при 10 000 g в течение 15 мин. Отбирали органический слой и объединяли с образцом, полученным на первом этапе. Объединённые органические фазы осушали в ротационном испарителе Laborota-4000 (Heidolph, Германия).

2.5.1. Определение концентрации холестерина в мембранах сперматозоидов ферментативно-колориметрическим методом

К 100 мкл суспензии клеток добавляли 100 мкл 2 %-го раствора Triton X-100 в DPBS, инкубировали в течение 1 ч при 37 °С. Затем в образцы вносили 2 мл ферментно-хромогенной смеси «Холестерин ФКД» (холестеролэстераза, холестеролоксидаза, пероксидаза, аминоантипирин, гидроксibenзолсульфонат натрия, холат натрия, фосфатный буфер). Для приготовления калибровочной пробы к стандартному раствору холестерина (51,7 нмоль холестерина в пробе объёмом 200 мкл) добавляли 2 мл ферментно-хромогенной смеси. Все образцы тщательно перемешивали на вортексе и инкубировали в течение 25 мин при комнатной температуре в темноте. По окончании инкубации сперматозоиды осаждали центрифугированием при 300 g в течение 10 мин. Супернатант отбирали для регистрации спектра поглощения на спектрофотометре ПЭ-5400УФ (ЭКРОСХИМ, Россия) в диапазоне длин волн 300–700 нм с шагом 1 нм, используя кюветы с длиной оптического пути 10 мм. Концентрацию холестерина в образцах рассчитывали по формуле:

$$C = \frac{E_0}{E_K} * \frac{51,7}{n} \quad (\text{IV}),$$

где C – концентрация холестерина в исследуемом образце, нмоль/млн; E_0 – оптическая плотность опытной пробы при $\lambda = 514$ нм; E_K – оптическая плотность калибровочной пробы при $\lambda = 514$ нм; 51,7 нмоль – количество холестерина в калибровочной пробе; n – количество сперматозоидов в образце, млн.

2.5.2. Определение концентрации холестерина в мембранах сперматозоидов методом Либермана-Бурхарда

Высушенные экстракты липидов растворяли в 500 мкл реактива Либермана-Бурхарда (смесь хлороформа, уксусного ангидрида и серной кислоты в соотношении 3:2:0,1 по объёму). Для построения калибровочной кривой к серии стандартных растворов холестерина (20–200 нмоль холестерина в пробе объёмом 10 мкл) добавляли по 500 мкл реактива Либермана-Бурхарда. Образцы инкубировали в темноте при 25 °С в течение 20 мин. Спектры поглощения

регистрировали на спектрофотометре ПЭ-5400УФ (ЭКРОСХИМ, Россия) в диапазоне длин волн 300–700 нм с шагом 1 нм, используя кюветы с длиной оптического пути 10 мм. Характерный спектр реакции Либермана-Бурхарда имеет два максимума поглощения – при 410 нм и 650 нм. Для построения калибровочного графика и количественного определения холестерина в образцах использовали оптическую плотность при 650 нм.

2.5.3. Определение концентрации холестерина в мембранах сперматозоидов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Высушенные экстракты липидов растворяли в 500 мкл подвижной фазы (смесь изопропанола, ацетонитрила и воды в соотношении 60:30:10 по объёму). Хроматографический анализ выполняли с использованием системы Agilent 1100 (Agilent, США) и колонки с обращённой фазой Agilent Zorbax XDB-C18 (4,6 × 150 мм, 5 мкм). Условия хроматографического разделения: температура колонки 28 °С, элюент – смесь изопропанол:ацетонитрил:вода (60:30:10 по объёму), скорость потока – 1 мл/мин. Детекцию проводили с помощью диодно-матричного спектрофотометрического детектора (DAD) при $\lambda = 205$ нм. На колонку наносили 40 мкл образца, общее время анализа составило 14 мин. Холестерин идентифицировали по времени удерживания в сравнении со стандартом с использованием программного обеспечения Agilent (Agilent, США). Для построения калибровочной кривой регистрировали хроматограммы стандартных растворов холестерина в диапазоне концентраций 10–100 мкг (объём пробы 40 мкл, растворитель – изопропанол:ацетонитрил:вода = 60:30:10). Калибровочный график строили по площади пика, соответствующего времени удерживания холестерина ($T_R = 8,4$ мин).

2.5.4. Определение концентрации холестерина в мембранах сперматозоидов методом инфракрасной спектроскопии

Полученный после центрифугирования осадок сперматозоидов высушивали в сушильном шкафу при 60 °С в течение 48 часов до полного удаления влаги. Подготовку проб для регистрации ИК-спектров проводили методом взвесей в бромиде калия. К 200 мг спектрально чистого KBr, предварительно растёртого в фарфоровой чашке, добавляли навеску высушенных сперматозоидов. Для получения одной таблетки объединяли образцы нескольких пациентов до достижения общей массы около 20 мг. Смесь клеток с KBr тщательно перетирали и перемешивали в фарфоровой чашке, затем прессовали, получая прозрачные или полупрозрачные таблетки. Регистрацию ИК-спектров проводили на спектрометре Specord M80 (Carl Zeiss, Германия) в диапазоне частот 400–4000 см⁻¹. Для построения калибровочной кривой регистрировали ИК-спектры таблеток с различными навесками холестерина (1,1–4,7 мг холестерина на 200 мг KBr). Калибровочный график строили по высоте пика поглощения при

2940 см⁻¹. После определения массы холестерина рассчитывали его концентрацию в образцах по формуле:

$$C_{IK} = \frac{m_{chol}}{M_{chol} \times N_{sperm}} (V),$$

где C_{IK} – концентрация холестерина в образце, нмоль/млн; m_{chol} – масса холестерина в образце, мг; M_{chol} – молярная масса холестерина, г/моль; N_{sperm} – количество сперматозоидов в образце, млн.

2.6. Оценка цитотоксичности метилированных β-циклодекстринов и их комплексов с холестерином по отношению к сперматозоидам человека

Приготовление комплексов метилированных β-циклодекстринов с холестерином.

Комплексы случайно-метилированных β-циклодекстринов (RAMEB) с холестерином (RAMEB-CHOL) готовили по методике, описанной в работе П. Х. Пурди и Дж. К. Грэхэма [264]. Для этого 1 г RAMEB растворяли в 2 мл метанола, а 200 мг холестерина – в 1 мл хлороформа. К раствору RAMEB добавляли 450 мкл раствора холестерина, тщательно перемешивали и выпаривали растворитель на ротационном испарителе Laborota-4000 (Heidolph, Германия).

Определение цитотоксичности метилированных β-циклодекстринов и их комплексов с холестерином. Для выделения подвижной фракции сперматозоидов применяли метод центрифугирования в градиенте плотности. На 1 мл 90%-го раствора All Grad Wash (All Grad Wash:Sperm Wash в отношении 9:1 по объёму) наслаивали 1 мл 45%-го раствора All Grad Wash (All Grad Wash:Sperm Wash в отношении 5,5:4,5 по объёму), затем наслаивали 2 мл эякулята и центрифугировали при 400 g в течение 7 мин. Осадок ресуспендировали в 2 мл среды Sperm Wash и центрифугировали при 300 g в течение 10 мин. Отбирали супернатант, к осадку добавляли 2 мл среды Sperm Wash и повторно центрифугировали при 300 g в течение 10 мин. Осадок ресуспендировали в объёме среды Sperm Wash, необходимом для достижения концентрации сперматозоидов в образце ~ 100 млн/мл. Полученную клеточную суспензию делили на аликвоты по 50 мкл и добавляли к аликвотам по 50 мкл среды Sperm Wash, содержащей 0,2, 0,4, 0,8, 1,6, 3,2, 6,4 и 12,8 мг RAMEB или 0,2, 0,4, 0,8, 1,6 и 3,2 мг RAMEB-CHOL. К контрольному образцу добавляли 50 мкл среды Sperm Wash. Образцы инкубировали при комнатной температуре, а через 15, 30 и 60 мин проводили оценку доли жизнеспособных сперматозоидов в образцах.

2.7. Оценка способности метилированных β -циклодекстринов к экстракции холестерина из мембран сперматозоидов

К эякуляту добавляли среду DPBS в соотношении 1:2 (по объёму) и центрифугировали при 300 g в течение 10 мин. Отбирали супернатант, осадок ресуспендировали в 2 мл среды DPBS и повторно центрифугировали при 300 g в течение 10 мин. Осадки, полученные после обработки нескольких эякулятов, объединяли, оценивали концентрацию клеток в камере Маклера (не менее 3 измерений в разных аликвотах) и разделяли на аликвоты по 100 мкл. К опытным аликвотам добавляли по 100 мкл среды DPBS, содержащей 1,6, 3,2, 6,4 и 12,8 мг RAMEB. К контрольной аликвоте добавляли 100 мкл 2%-го Triton X-100 в DPBS. Образцы инкубировали 1 ч при 37 °С, после чего определяли концентрацию холестерина в образцах с использованием набора «Холестерин ФКД».

2.8. ЭПР-исследование

2.8.1. ЭПР-исследование липосом с различным содержанием холестерина

Приготовление липосом с холестерином. Моноламеллярные смешанные липосомы, содержащие диолеилфосфатидилхолин и холестерин, получали методом озвучивания. Для этого смешивали необходимое количество растворов диолеилфосфатидилхолина и холестерина в метаноле (или в смеси метанол-хлороформ) и выпаривали на вакуумном роторном испарителе при 30 °С до образования тонкой плёнки. Плёнку диспергировали в 2 мл 10^{-2} М трис-буфера (pH 7,0), после чего образцы подвергали ультразвуковой обработке (22 кГц, 2×200 с) при постоянном охлаждении водой. Использовали ультразвуковой диспергатор 4710 (Cole-Parmer, США). Полученные липосомы отделяли от титановой пыли центрифугированием на ультрацентрифуге J-11 (Beckman, США) 5 мин при 12 000 об/мин. Средний размер липосом от партии к партии варьировался в диапазоне 80–100 нм.

2.8.2. Влияние метилированных β -циклодекстринов на спектр ЭПР зонда 5-доксил стеарата в сперматозоидах

Обработка сперматозоидов. Для того чтобы отделить сперматозоиды от семенной плазмы, использовали метод центрифугирования в градиенте плотности. На 1 мл 45%-й среды All Grad Wash (All Grad Wash:Sperm Wash в отношении 5,5:4,5 по объёму) наслаивали 1 мл эякулята и центрифугировали 7 мин при 400 g. Полученный осадок ресуспендировали в 2 мл среды Sperm Wash и центрифугировали при 300 g в течение 10 мин. Отбирали супернатант, к осадку добавляли 2 мл среды Sperm Wash и повторно центрифугировали 10 мин при 300 g. Полученные от нескольких эякулятов осадки объединяли и ресуспендировали в объёме среды

Sperm Wash, необходимом для достижения концентрации сперматозоидов в образце ~ 100 млн/мл, и разделяли на аликвоты по 500 мкл. К аликвотам добавляли 500 мкл среды Sperm Wash, содержащей разные количества (0–50 мг) RAMEB, и инкубировали суспензию 30 мин при комнатной температуре. После этого к образцам добавляли по 2 мл среды HTF HEPES и центрифугировали 10 мин при 300 g, отбирали супернатант, ресуспендировали осадок в 2 мл среды HTF HEPES и повторно центрифугировали 10 мин. Отбирали супернатант и ресуспендировали полученные осадки в 75 мкл среды HTF HEPES.

ЭПР-исследование. Для изучения свойств мембран сперматозоидов использовали спиновой зонд 5-ДС производства фирмы Sigma (США). Сухой порошок молекул зонда растворяли в этаноле (100 %), концентрация зонда в растворе составляла 10 мМ. К 50 мкл образца, содержащего липосомы или сперматозоиды, добавляли 2 мкл концентрированного спиртового раствора 5-ДС, тщательно перемешивали и затем инкубировали 5 мин при 23 °С. Образцы объёмом 25 мкл помещали в пластиковый капилляр, пропускающий кислород (TFE-трубочки от Zeus Inc. (США), внутренний диаметр 0,635 мм, толщина стенок 0,051 мм). Конечная концентрация спинового зонда в образце составляла 0,4 мМ. Капилляр с образцом помещали в вентилируемый держатель, располагавшийся в центре резонатора спектрометра ЭПР.

Спектры ЭПР (первая производная сигнала поглощения СВЧ) регистрировали с помощью спектрометра 3 см диапазона модели E-4 (Varian, США) при температуре 23 °С. Стандартные условия регистрации спектров: мощность СВЧ – 10 мВт, амплитуду ВЧ модуляции магнитного поля H_m варьировали в интервале от 1 до 4 Гс. Для записи и обработки спектров, сохранявшихся в цифровом виде, использовали программное обеспечение, разработанное Б. В. Трубицининым, сотрудником кафедры биофизики физического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова.

Для оценки параметра порядка S , характеризующего ориентированность молекул зонда в мембранах липосом и сперматозоидов, использовали приведённую в работе К. Шорна и соавторов [265] формулу, основанную на измерениях параметров ЭПР-спектра зонда (расстояния между «внешними» и «внутренними» экстремумами спектра, обозначаемыми как $2T_{\parallel}'$ и $2T_{\perp}'$). Время вращательной корреляции метки τ_c определяли согласно общепринятой методике [266].

2.9. Оценка способности комплексов метилированных β -циклодекстринов с холестерином к насыщению мембраны сперматозоидов холестерином

К 1 мл нативного эякулята добавляли 0, 2, 4, 8 или 16 мг RAMEB-CHOL и инкубировали 15 мин при комнатной температуре. После инкубации к образцу добавляли среду DPBS в

соотношении 1:2 (по объёму) и центрифугировали 10 мин при 300 g. Осадок ресуспендировали в 2 мл среды DPBS и повторно центрифугировали 10 мин при 300 g. Отбирали супернатант, добавляли к осадку 100 мкл DPBS. Оценку концентрации сперматозоидов проводили с использованием камеры Маклера (подсчёт повторяли на менее 5 раз, затем рассчитывали среднее значение). Из полученной суспензии отбирали 100 мкл для определения концентрации холестерина с использованием набора «Холестерин ФКД».

2.10. Определение оптимальной концентрации комплексов метилированных β -циклодекстринов с холестерином для повышения криотолерантности сперматозоидов

Нативный эякулят разделяли на аликвоты по 200 мкл, к аликвотам добавляли по 50 мкл среды Sperm Wash, содержащей 0 (контроль), 0,25, 0,5 или 1 мг RAMEB-CHOL. Образцы инкубировали 15 мин при комнатной температуре, после чего замораживали и размораживали в соответствии с вышеописанными протоколами (Пункт 2.2.). Непосредственно после разморозки образцов проводили оценку подвижности и жизнеспособности сперматозоидов.

2.11. Рентгеноструктурный анализ

К 1 мл среды Sperm Wash добавляли 2, 4 и 8 мг М β -ЦД или 2, 4 и 8 мг М β -ЦД-Х. Затем к образцам добавляли криопротекторную среду Sperm Freeze и замораживали в соответствии с вышеописанным протоколом. Дифракционные картины для исследуемых растворов были получены на пучке P11 синхротронного источника PETRA III в центре DESY (Гамбург, Германия).

2.12. Статистическая обработка

Представление данных. При нормальном распределении количественные показатели описывали как среднее $\pm$ стандартное отклонение ($M \pm SD$). При отклонении от нормального распределения данные представляли в виде медианы (Me) и межквартильного интервала ($Q1-Q3$). Проверку нормальности распределения выполняли с помощью критерия Шапиро – Уилка.

Сравнение групп. Для оценки различий между группами при нормальном распределении данных использовали парный t-критерий Стьюдента с поправкой Холма на множественные сравнения. В случае отклонения от нормальности распределения применяли критерий Уилкоксона для двух зависимых выборок и критерий Фридмана – для более чем двух зависимых выборок. При выявлении статистически значимых различий по критерию Фридмана проводили множественные парные сравнения с использованием критерия Уилкоксона с поправкой Холма.

Категориальные данные. Для сравнения категориальных данных использовали критерий χ^2 Пирсона.

Корреляционный анализ. Для оценки связей между количественными признаками использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена.

Статистическая значимость. Во всех случаях различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Обработку экспериментальных данных проводили с использованием компьютерной программы Statistica (StatSoft, США).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1. Фрагментация ДНК сперматозоидов до и после криоконсервации

Ранее в исследованиях, посвященных криоконсервации спермы человека и других видов млекопитающих, было продемонстрировано значительное снижение доли прогрессивно подвижных сперматозоидов и доли сперматозоидов с интактной мембраной в образцах эякулята после криоконсервации [4; 5]. Вместе с тем подвижность – лишь один из показателей качества спермы. Сперматозоиды, сохранившие свою жизнеспособность и подвижность после криоконсервации, могут иметь скрытые структурные или молекулярные повреждения, которые не выявляются стандартным спермиологическим анализом. Одним из таких критических параметров является целостность ДНК сперматозоидов. В связи с этим первым этапом исследования стал анализ степени фрагментации ДНК сперматозоидов до и после криоконсервации.

В настоящей работе для исследования влияния криоконсервации на фрагментацию ДНК сперматозоидов была использована следующая схема эксперимента: эякулят каждого донора делили на три части – для заморозки без криопротекторной среды, с криопротекторной средой SF и нативный образец. Оценку фрагментации ДНК в нативных образцах проводили методом TUNEL после обработки (0 ч); в криоконсервированных образцах – непосредственно после разморозки (0 ч). Повторные измерения проводили через 24 ч инкубации при 21 °С. Для описания центральной тенденции и разброса использованы среднее значение и стандартное отклонение (SD). С учётом связанной структуры данных статистическая обработка была выполнена с использованием парного t-критерия Стьюдента с поправкой Холма на множественные сравнения.

Из представленного на Рисунке 4 графика видно, что после размораживания (0 ч) процент сперматозоидов с фрагментацией ДНК (DFI) в образцах, криоконсервированных с использованием криопротекторной среды SF, статистически значимо не отличался от нативного контроля ($9,7 \pm 3,5$ против $8,6 \pm 3,2$, $p = 0,67$). В то время как в образцах, замороженных без криопротекторной среды, значение DFI было почти в 1,9 раз выше по сравнению с нативным контролем ($p < 0,05$) [267].

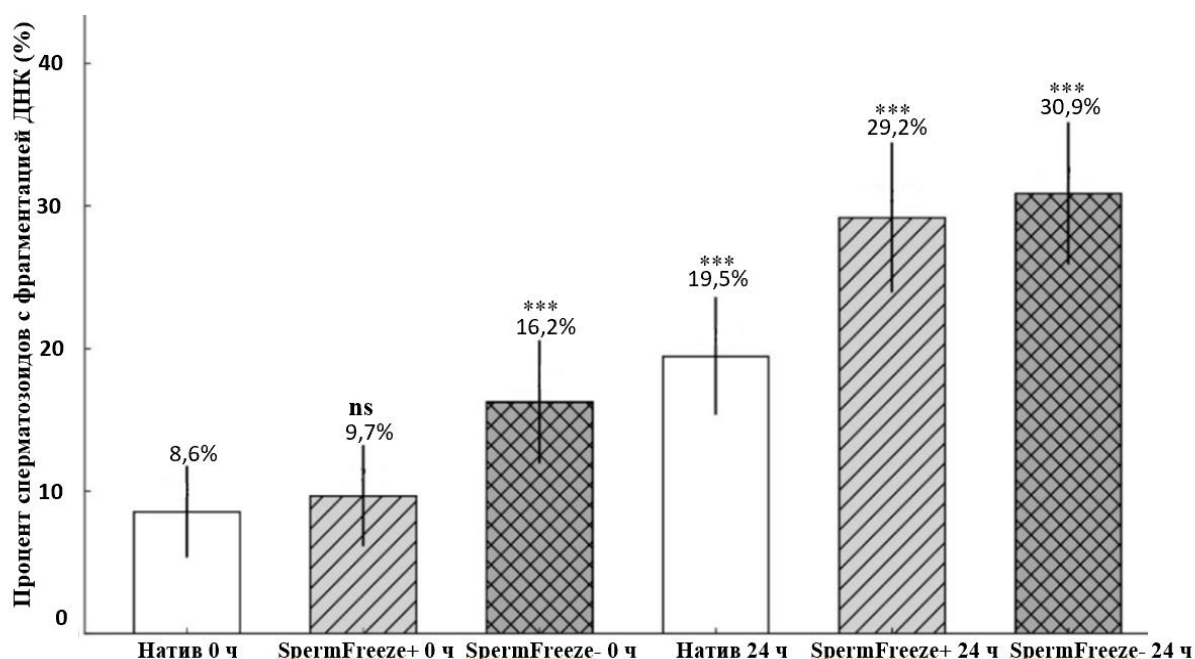


Рисунок 4 – Процент сперматозоидов с фрагментацией ДНК (Mean $\pm$ SD; $n = 19$) в нативных образцах и после криоконсервации с использованием среды SpermFreeze+ или без неё (SpermFreeze-) – сразу после размораживания (0 ч) и через 24 ч инкубации при 21 °C. Статистическая значимость оценивалась между всеми исследуемыми группами, однако на графике для наглядности представлены только различия по сравнению с контрольными образцами (натив в 0 ч; *** $p < 0,05$; парный t-критерий Стьюдента с поправкой Холма на множественный сравнения)

Через 24 ч инкубации при 21 °C во всех исследованных группах наблюдалось статистически значимое увеличение DFI по сравнению с нативной группой в 0 ч: в нативных образцах – в 2,3 раза ($p < 0,05$), в группе с SF – в 3,4 раза ($p < 0,05$), в группе без криопротекторной среды – в 3,6 раз ($p < 0,05$) (Таблица 2). Между группами с использованием и без использования SF на этом этапе статистически значимых различий выявлено не было ($p = 0,54$). При этом в обеих криогруппах значения DFI существенно превышали соответствующий показатель для нативных образцов после 24-часовой инкубации ($p < 0,05$) [267].

Таблица 2 – Процент сперматозоидов с фрагментацией ДНК (Mean $\pm$ SD; $n = 19$) в нативных образцах и после криоконсервации с использованием среды SpermFreeze + или без неё (SpermFreeze - через 24 ч инкубации; парный t-критерий Стьюдента с поправкой Холма на множественные сравнения

Образцы	DFI (%)	P-value (натив в 0 ч)	Кратность (натив в 0 ч)
Натив 0 ч	8,6 $\pm$ 3,2	—	—
Натив 24 ч	19,5 $\pm$ 4,1	$p < 0,05$	2,3
SpermFreeze + 24 ч	29,2 $\pm$ 5,3	$p < 0,05$	3,4
SpermFreeze – 24 ч	30,9 $\pm$ 4,9	$p < 0,05$	3,6

Анализ современной научной литературы по теме свидетельствует об отсутствии единого мнения относительно влияния процессов замораживания и оттаивания на степень фрагментации ДНК сперматозоидов. В ряде исследований было продемонстрировано статистически значимое повышение показателя DFI после процессов замораживания и последующего оттаивания, в то время как в других работах аналогичных закономерностей выявлено не было [4; 268–270]. Подобная вариабельность полученных результатов, по-видимому, обусловлена различиями в применяемых подходах к предварительной обработке образцов, протоколах замораживания и оттаивания, а также в используемых методах оценки фрагментации ДНК. Стоит отметить, что в тех исследованиях, где после криоконсервации наблюдалось статистически значимое увеличение DFI, отсутствует общепринятое представление о механизмах повреждения ДНК сперматозоидов. Тем не менее наибольшее внимание традиционно уделяется роли окислительного стресса. В исследовательской литературе он рассматривается как один из ключевых факторов, приводящих к структурно-функциональным повреждениям сперматозоидов, в том числе к фрагментации их ДНК [269; 271]. В физиологических концентрациях АФК выполняют в сперматозоидах регуляторные функции: участвуют в активации сигнальных путей, необходимых для капацитации, гиперактивации и акросомальной реакции [272]. Однако превышение физиологического уровня АФК сопровождается окислительной модификацией липидов, белков и нуклеиновых кислот; на уровне ДНК отмечаются одно- и двуцепочечные разрывы, окислительные модификации оснований (например, 8-оксогуанин), образование апуриновых/апиримидиновых сайтов и ДНК-белковых перекрёстных сшивок. В контексте криоконсервации генерация АФК многократно усиливается за счёт сочетания физических и биохимических стресс-факторов [271].

В проведённом исследовании не было выявлено статистически значимого увеличения показателя DFI в образцах, криоконсервированных с использованием криопротекторной среды SF, непосредственно после размораживания. Однако при анализе динамики показателя было зафиксировано статистически значимое увеличение DFI в постинкубационный период (Рисунок 4). Полученные данные согласуются с результатами, представленными в работе Дж. Госалвеза и соавторов [270], где было показано, что динамика роста показателя DFI после размораживания может описываться линейными, логарифмическими или экспоненциальными моделями, при этом максимальная скорость накопления повреждений приходится на первые часы после оттаивания. В частности, в их исследовании наиболее выраженное увеличение DFI наблюдалось в первые 4 часа инкубации при 37 °C, во второй фазе (4–8 ч) скорость прироста снижалась примерно на 50 %, а на заключительном этапе (8–24 ч) была минимальной (~ 1 %).

Установлено, что сразу после размораживания DFI в образцах, замороженных без применения криопротекторной среды, оказался значительно выше по сравнению с исходными

(нативными) значениями. Напротив, в образцах, криоконсервированных с использованием SF, статистически значимых изменений данного показателя по сравнению с исходным уровнем зарегистрировано не было. После 24-часовой инкубации образцов в группе без криопротекторной среды DFI увеличился примерно в 2 раза по сравнению с показателями, зафиксированными непосредственно после размораживания. В то же время в группе, где применялась криопротекторная среда, рост DFI оказался ещё более выраженным – в 3 раза [267] (Таблица 3).

Таблица 3 – Процент сперматозоидов с фрагментацией ДНК (Mean $\pm$ SD; n = 19) в нативных образцах и после криоконсервации с использованием среды SpermFreeze + или без неё (SpermFreeze -) – сразу после размораживания (0 ч) и через 24 ч инкубации при 21 °C; парный t-критерий Стьюдента с поправкой Холма на множественный сравнения)

Образцы	DFI 0 ч (%)	DFI 24 ч (%)	P-value	Отношение DFI (24 ч / 0 ч)
Натив	8,6 $\pm$ 3,2	19,5 $\pm$ 4,1	p < 0,05	2,3
SpermFreeze +	9,7 $\pm$ 3,5	29,2 $\pm$ 5,3	p < 0,05	3,0
SpermFreeze –	16,2 $\pm$ 4,3	30,9 $\pm$ 4,9	p < 0,05	1,9

Полученные данные свидетельствуют о том, что применение криопротекторной среды способствует снижению DFI в момент оттаивания. Вероятно, данный эффект обусловлен уменьшением выраженности прямых криоиндуцированных повреждений клеточных структур, возникающих в процессе замораживания и оттаивания. Однако более выраженный рост DFI в постинкубационный период в этой группе может быть связан с наличием латентных (сублетальных) повреждений, прежде всего митохондрий и клеточных мембран [51]. Такие повреждения не проявляются немедленным увеличением уровня фрагментации ДНК, но инициируют каскады окислительного стресса, что со временем приводит к генерации АФК и вторичным повреждениям ДНК [273]. В образцах, замороженных без использования криопротекторной среды, клетки, вероятно, погибают уже на этапе замораживания-оттаивания. Это приводит к немедленному росту DFI, который обусловлен прямыми криоиндуцированными повреждениями (разрывами ДНК, нарушением целостности мембран и дестабилизацией хроматина). Дальнейшее повышение данного показателя, по всей видимости, связано с постмортальной деградацией ДНК.

Таким образом, выявленные различия в кинетике DFI между исследуемыми группами могут быть объяснены изменением доминирующего механизма повреждений ДНК. В группе без применения криопротекторной среды фрагментация ДНК, по-видимому, обусловлена преимущественно прямыми криоиндуцированными повреждениями. В то же время в группе, где

использовалась криопротекторная среда, ведущим механизмом повреждений является митохондриальная дисфункция и связанный с ней окислительный стресс. Полученные данные имеют практическое значение, так как высокий уровень фрагментации ДНК ассоциируется с нарушением мужской фертильности и снижением эффективности программ вспомогательных репродуктивных технологий [274]. В этой связи перспективным направлением дальнейших исследований является оптимизация состава криопротекторных сред с целью минимизации отсроченных повреждений ДНК и повышения сохранности функциональной активности сперматозоидов.

3.2. Эффективность модификации криопротекторной среды яичным желтком

В большинстве доступных многокомпонентных коммерческих криопротекторных сред, предназначенных для криоконсервации сперматозоидов человека, отсутствуют липидные компоненты, направленные на стабилизацию плазматической мембраны сперматозоидов, в то время как интактность мембран является одним из важнейших факторов жизнеспособности клеток после оттаивания.

Среди различных подходов к повышению выживаемости сперматозоидов при криоконсервации особый интерес представляют компоненты, способные стабилизировать плазматическую мембрану. Одной из таких добавок традиционно считается яичный желток (ЯЖ), который содержит фосфолипиды, липопротеины низкой плотности и холестерин. Эффективность применения ЯЖ в качестве компонента криопротекторных сред ранее была подтверждена на различных видах млекопитающих, что обосновывает целесообразность его использования в настоящем исследовании [19; 219; 222; 228].

Была проведена серия экспериментов по добавлению ЯЖ в криопротекторную среду SF в диапазоне концентраций от 0,7 до 5,6 мг/мл. По результатам анализа было установлено, что при повышении концентрации ЯЖ до 1,7 мг/мл наблюдается статистически значимое увеличение доли прогрессивно подвижных сперматозоидов категорий а и б в образцах после разморозки. При дальнейшем увеличении концентрации ЯЖ (более 1,7 мг/мл) этот показатель не демонстрировал достоверных изменений. На основании полученных данных и удобства работы для дальнейших исследований была выбрана концентрация ЯЖ, равная 5,6 мг/мл [275].

Проведенное сравнение эффективности двух сред – среды SF и среды SF с добавлением 5,6 мг/мл ЯЖ – показало статистически значимое (в среднем на 18,9 %, $p > 0,05$) повышение индекса подвижности сперматозоидов после разморозки в образцах с модифицированной ЯЖ криопротекторной средой по сравнению с нативной средой SF [275] (Рисунок 5). Для описания центральной тенденции и разброса использованы медиана и межквартильный размах (IQR). С учётом связанной структуры проверка различий проводилась с помощью критерия Уилкоксона для связанных выборок.

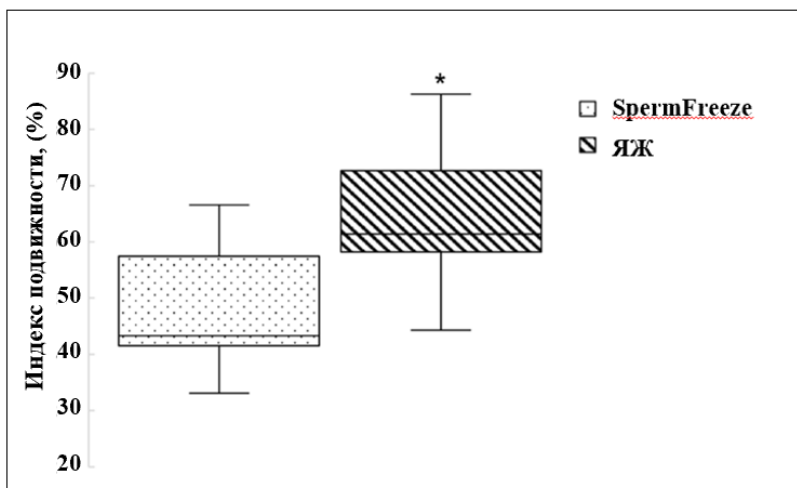


Рисунок 5 – Диаграммы индекса подвижности сперматозоидов (%) после разморозки: контроль (Sperm Freeze) и криопротекторная среда Sperm Freeze с добавлением 5,6 мг/мл ЯЖ ($n = 11$). Статистическая значимость оценивалась критерием Уилкоксона (двусторонний). Обозначения: * – $p < 0,05$

Полученный результат подтверждает эффективность использования ЯЖ в качестве компонента криопротекторной среды для повышения доли прогрессивно подвижных сперматозоидов после размораживания.

В традиционных протоколах криоконсервации спермы млекопитающих (крупный рогатый скот, овцы, кабаны, собаки, коты) обычно используют 10–20 % (об./об.) ЯЖ. Такая концентрация обусловлена многочисленными исследованиями, демонстрирующими улучшение выживаемости сперматозоидов и их функциональной сохранности после замораживания-оттаивания [219; 220; 225; 228]. У представителей этих видов также установлено дозозависимое улучшение посткриогенных параметров сперматозоидов в указанном диапазоне концентраций ЯЖ, при этом снижение концентрации ЯЖ ниже 5–10 % сопровождается ухудшением показателей подвижности и выживаемости.

Согласно опубликованным исследованиям, основной вклад в криопротекторные свойства ЯЖ вносят ЛПНП. В ряде экспериментальных работ на животных применение изолированной фракции ЛПНП позволяло достичь посткриогенных показателей, сопоставимых или более высоких по сравнению с использованием цельного ЯЖ [22; 223; 226; 227; 232].

В настоящем исследовании использовался порошок ЯЖ производства Sigma Aldrich. Согласно технической документации производителя, данный продукт получают методом распылительной сушки (*spray-drying*) из предварительно отделённого и гомогенизированного ЯЖ. В процессе производства проводится контроль по микробиологическим показателям, включая тестирование на отсутствие *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, дрожжей и плесневых грибов, что позволяет существенно снизить риск биологической контаминации по сравнению с использованием свежего цельного желтка. Тем не менее продукт не является стерильным, а состав порошка может варьировать в зависимости от партии сырья, условий обработки и хранения. Использование порошковой формы действительно снижает вариабельность по сравнению со свежим желтком, однако полностью устранить нестандартизированность не удастся: содержание липидов, белков и минорных компонентов остаётся непостоянным. Это влияет на воспроизводимость результатов, особенно при сравнении данных, полученных в разные временные периоды и в разных лабораториях. В связи с этим представляют интерес альтернативные источники фосфолипидов, лишенные животного происхождения, такие как соевый лецитин (СЛ), который состоит преимущественно из фосфатидилхолина и других фосфолипидов растительного происхождения, обладает высокой воспроизводимостью состава и низким риском микробной контаминации.

Сравнительная оценка эффективности СЛ и ЯЖ при криоконсервации сперматозоидов различных видов животных представлена в ряде экспериментальных исследований, показавших, что СЛ в концентрации 1–2 % способен обеспечить криозащитный эффект, аналогичный или более выраженный по сравнению с традиционной средой на основе 20 % ЯЖ [234; 241; 276; 277]. Для сперматозоидов человека было показано, что при использовании криопротекторной среды, модифицированной СЛ в концентрации 1,5 мг/мл, доля прогрессивно подвижных сперматозоидов после разморозки была статистически значимо выше по сравнению с немодифицированной средой SF [278], при этом достоверных отличий от модифицированной ЯЖ криопротекторной среды SF выявлено не было.

Для сперматозоидов человека концентрации как ЯЖ (5,6 мг/мл (0,56 % масс./об.), что эквивалентно ~ 1,1 % (об./об.)), так и СЛ (1,5 мг/мл (0,15 % (масс./об.), что эквивалентно ~ 0,14 (об./об.)), необходимые для достижения криопротекторного эффекта, были существенно ниже, чем в аналогичных протоколах, применяемых на животных. Вероятно, это связано с относительно высоким содержанием проникающего криопротектора в используемой среде SF (глицерин ~ 15 %) [279]. В таких условиях введение ЯЖ или СЛ, по-видимому, выполняет вспомогательную функцию, а не является основным фактором криозащиты. В ветеринарных протоколах, напротив, содержание глицерина обычно составляет ~ 7 % [241; 280], что, предположительно, делает вклад проникающего криопротектора менее выраженным. В этом

случае внеклеточным компонентам может отводиться более существенная роль (1–3 % СЛ или до 20 % ЯЖ). Таким образом, различия в оптимальных дозах ЯЖ и СЛ между человеком и животными, вероятно, отражают различия в «балансировании» проникающих и внеклеточных компонентов криопротекторной среды в зависимости от особенностей клеточных мембран и состава применяемых сред. Кроме того, подобные различия в оптимальной концентрации могут быть обусловлены видоспецифическими различиями в липидном составе мембран, уровне холестерина и холодовой чувствительности сперматозоидов [247]. Для человека относительно низкие концентрации ЯЖ и СЛ оказываются достаточными, в то время как для большинства животных требуется более высокая концентрация, что необходимо учитывать при разработке и модификации криопротекторных сред.

Обобщая результаты по криоконсервации спермы человека и животных, можно заключить, что как ЯЖ, так и СЛ являются эффективными компонентами криопротекторных сред, обеспечивающими повышение доли жизнеспособных и доли прогрессивно подвижных сперматозоидов после размораживания.

3.3. Концентрация холестерина в мембранах сперматозоидов человека

Холестерин, содержащийся в ЯЖ, может являться одним из ключевых компонентов, определяющих его криозащитные свойства. Как уже было отмечено ранее, этот стероидный липид способен интегрироваться в фосфолипидный бислой клеточных мембран, повышая их упорядоченность, снижая проницаемость для ионов и воды, а также препятствуя резким фазовым переходам липидов бислоя при изменении температуры [247].

В связи с этим особое значение приобретает объективная оценка уровня холестерина в мембранах сперматозоидов. Достоверные количественные данные необходимы как для понимания роли холестерина в устойчивости клеток к низким температурам, так и для оценки эффективности различных подходов к его экзогенному введению в мембрану. Следовательно, требуется метод, который позволяет достоверно и воспроизводимо определять содержание холестерина в мембранах сперматозоидов. В ходе нашего исследования мы сравнили четыре метода количественного определения холестерина на предмет их пригодности для оценки уровня холестерина в сперматозоидах человека в условиях лаборатории вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ).

Определение концентрации холестерина в мембранах сперматозоидов методом Либермана-Бурхарда. Метод Либермана-Бурхарда является одним из наиболее хорошо описанных и широко применяемых подходов к количественному определению холестерина в биологических образцах. Метод основан на дегидратации стерина с последующим

присоединением к ним сульфоновой кислоты. В качестве сильного дегидратирующего агента используется уксусный ангидрид, а для образования сульфоновой кислоты – смесь уксусной и серной кислот. Сложная система двойных связей, сопряжённых с сульфоновой группой, обуславливает интенсивное окрашивание конечного продукта реакции с максимумом поглощения 610 и 410 нм [281].

В настоящей работе анализ проводился на экстрактах холестерина, полученных из суспензии сперматозоидов методом Фолча [263]. На основании 21 проанализированного образца была рассчитана средняя концентрация холестерина в сперматозоидах, которая составила $C_{LB} = 1,3 \pm 0,2$ нмоль/млн [282], что хорошо согласуется с данными научной литературы (см. Таблицу 4).

Стоит отметить, что метод достаточно чувствителен к температуре, времени инкубации, качеству реактивов и чистоте растворителей, но при строгом соблюдении протокола и стандартизации условий метод даёт стабильные результаты [283].

Определение концентрации холестерина методом обратнофазовой высокоэффективной хроматографии. Коэффициент распределения октанол – вода для холестерина составляет примерно 3,7, что характеризует его как липофильное соединение [284]. В лабораторной практике для определения концентрации гидрофобных молекул широко используется обратнофазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), которая может сочетаться со спектрофотометрическим или масс-спектрометрическим детектированием. В настоящей работе применяли обращённо-фазовую ВЭЖХ с использованием УФ-детектора, поскольку холестерин имеет максимум поглощения в области 205 нм [285].

В результате анализа 14 образцов получено следующее среднее значение концентрации холестерина в мембранах сперматозоидов человека: $C_{HPLC} = 1,5 \pm 0,2$ нмоль/млн [282]. Сравнение полученных значений показывает, что средняя концентрация холестерина в мембранах сперматозоидов, определённая методом Либермана-Бурхарда, составляет $1,3 \pm 0,2$ нмоль/млн, тогда как по данным ВЭЖХ – $1,5 \pm 0,2$ нмоль/млн (Таблица 4). Различия находятся в пределах аналитической погрешности, что позволяет рассматривать оба подхода как дающие сопоставимые результаты при надлежащей стандартизации.

Таблица 4 – Средние концентрации холестерина в сперматозоидах (нмоль/ 10^6 клеток), полученные разными методами (Mean $\pm$ SD) и данные литературных источников

Метод определения концентрации холестерина	Концентрация холестерина (нмоль/ 10^6 клеток)
Либермана-Бурхарда	$1,3 \pm 0,2$
Высокоэффективная жидкостная хроматография	$1,5 \pm 0,2$
Ферментативно-колориметрическая детекция	$1,0 \pm 0,3$
Инфракрасная спектроскопия	$5,1 \pm 1,8$
Данные научной литературы	$1.0 \pm 0,1$ [286]; $1,2 \pm 0,3$ [287]

Метод ВЭЖХ в целом характеризуется более высокой селективностью и воспроизводимостью по сравнению с колориметрическими методами, что обусловлено предварительным хроматографическим разделением аналита и снижением влияния матричных примесей. Селективность обеспечивается физическим разделением компонентов смеси на колонке и возможностью их детектирования по специфическим спектральным характеристикам. Воспроизводимость повышается за счёт автоматизации процесса, точного дозирования проб и стабильных условий элюирования [288].

Применение методов Либермана-Бурхарда и ВЭЖХ в рутинной лабораторной практике клиник вспомогательных репродуктивных технологий представляется затруднительным. Это связано, прежде всего, с использованием агрессивных реагентов, таких как хлороформ, метанол, концентрированная серная кислота и уксусный ангидрид, что требует наличия специализированных помещений и строгого соблюдения мер безопасности. Оба метода могут применяться только в изолированных помещениях, оснащённых отдельной системой вентиляции и предназначенных для работы с такими реагентами. Кроме того, оба метода требуют сложной и многоступенчатой подготовки образцов к анализу, что накладывает повышенные требования на квалификацию персонала и увеличивает временные затраты. Однако можно рассматривать эти методы в качестве референтных для валидации и сравнительной оценки альтернативных подходов к определению содержания холестерина.

Определение концентрации холестерина в мембране сперматозоидов методом ферментативно-колориметрической детекции. Ферментативно-колориметрические методы (ФКД) определения холестерина представляют собой один из наиболее широко применяемых и специфичных подходов к количественной оценке этого стерола в биологических образцах. Их принцип основан на использовании последовательных ферментативных реакций, в ходе которых

холестерин превращается в продукт, дающий окрашенное соединение, интенсивность окрашивания которого пропорциональна его концентрации. Высокая специфичность достигается благодаря участию ферментов, распознающих исключительно холестерин или его эфиры, что минимизирует влияние посторонних липидов и других компонентов биологической матрицы [289].

В наборе «Холестерин-ФКД» («Агат», Россия), который был использован в данной работе, реализован классический трёхэтапный ферментативный подход. На первом этапе холестеролэстераза гидролизует эфиры холестерина, высвобождая его свободную форму, что позволяет определить общее содержание холестерина в образце. Далее холестериноксидаза катализирует окисление холестерина до 4-холестен-3-она, сопровождающееся образованием перекиси водорода. На заключительном этапе пероксидаза (в большинстве методик используется пероксидаза из хрена, *horseradish peroxidase*) окисляет специфический хромоген, в результате чего образуется окрашенный продукт. Экстракцию холестерина из мембран проводили с использованием детергента Triton X-100.

В результате проведённого анализа 24 образцов установлено, что среднее содержание холестерина в мембранах сперматозоидов составляет $C_{ENZ} = 1,0 \pm 0,3$ нмоль/млн [282]. Важно отметить, что данный метод даёт более низкую оценку концентрации холестерина в мембране сперматозоидов. Вероятно, это связано с используемым способом экстракции: в отличие от смеси хлороформа и метанола, применяемой в методе Фолча, Triton X-100 является менее агрессивным экстрагентом. При этом липидные рафты, в которых локализуются наибольшие количества холестерина, обладают устойчивостью к действию «мягких» детергентов, что может приводить к неполному извлечению стеролов [290].

Вместе с тем, по сравнению с вышеуказанными методами, ферментативный анализ отличается простотой выполнения, высокой специфичностью и отсутствием необходимости работы с агрессивными реагентами. Метод не требует сложного дорогостоящего оборудования, помимо спектрофотометра, что делает его удобным и безопасным для рутинного применения, в том числе в клинической практике центров вспомогательных репродуктивных технологий.

Определение концентрации холестерина методом инфракрасной спектроскопии. Молекула холестерина содержит следующие фрагменты, которые могут быть идентифицированы с помощью ИК-спектроскопии: гидроксильная группа, двойная $C = C$ связь, а также CH_2 -группы в системе конденсированных циклических фрагментов. Наиболее селективной для определения количества холестерина является полоса поглощения при 1646 см^{-1} (соответствующая колебаниям двойной $C = C$ связи циклогексановой группы) [291].

Важно отметить, что для проведения анализа необходимо было получить порядка 20 мг сухого остатка. Такое количество образца невозможно получить из одного эякулята. В нашей

работе для каждой постановки эксперимента требовалось смешивать порядка 6 эякулятов, что уже накладывает ограничение на клиническое использование. Даже при таком количестве образца полоса поглощения при 1646 см^{-1} была слабо выражена и значительно перекрывалась спектральным шумом. Среди наблюдаемых в ИК-спектре полос поглощения наибольшую интенсивность имела полоса при 2940 см^{-1} , соответствующая возбуждению колебаний CH_2 -групп в системе конденсированных циклических фрагментов [292], относительно которой были проведены дальнейшие расчёты.

На основании семи проведённых измерений была рассчитана средняя концентрация холестерина в мембранах сперматозоидов, которая составила $C_{\text{ИК}} = 5.1 \pm 1.8$ нмоль/млн [282]. Этот результат значительно превышает данные, полученные с использованием других методов, а также противоречит данным научной литературы. Вероятно, это связано с малой селективностью выбранной полосы поглощения. Расхождение в результатах в первую очередь вызвано нестрогой селективностью полосы поглощения при 2940 см^{-1} , соответствующей возбуждению колебаний CH_2 -групп, которые присутствуют не только в холестерине, но и во всех липидах мембраны.

В результате проведённого тестового определения концентрации холестерина в мембранах сперматозоидов мы получили хорошо сходящиеся результаты всех тестируемых методов, за исключением ИК-спектроскопии, которая к тому же не может использоваться в клинической практике, так как этот метод требует большого объёма образца (около 20 мл при среднем объёме одного эякулята, равном $\sim 3,5$ мл). Метод ВЭЖХ, обладая высокой селективностью и воспроизводимостью, требует дорогостоящего специализированного оборудования и оператора высокой квалификации. Метод Либермана-Бурхарда, в свою очередь, предполагает работу с агрессивными химическими реагентами, что накладывает ограничения на его применение в рутинной практике. С учётом этих факторов наиболее целесообразным вариантом был выбран ферментативно-колориметрический метод, который при достаточной аналитической точности и воспроизводимости является простым в выполнении, не требует сложного оборудования и исключает использование агрессивных и летучих органических растворителей.

3.4. Цитотоксичность метилированных β -циклодекстринов и их комплексов с холестерином по отношению к сперматозоидам человека

Для оценки цитотоксичности RAMEB и комплекса RAMEB с холестерином (RAMEB-CHOL) в отношении сперматозоидов человека использовали выделенную методом центрифугирования в градиенте плотности фракцию сперматозоидов категорий подвижности а и b. Клетки инкубировали при комнатной температуре с RAMEB в диапазоне концентраций 2–128 мг/мл либо с комплексами RAMEB-CHOL в диапазоне концентраций 2–32 мг/мл. Долю

жизнеспособных клеток, сохраняющих целостность плазматической мембраны, определяли с использованием теста VitalScreen через 15, 30 и 60 минут инкубации [293]. Данные о доле жизнеспособных сперматозоидов в зависимости от концентрации RAMEB, комплекса RAMEB-CHOL и времени инкубации приведены в Таблице 5.

Таблица 5 – Доля сперматозоидов с интактной мембраной в образцах, инкубированных с различными концентрациями RAMEB и RAMEB-CHOL в течение 15, 30 и 60 минут. Для сравнения данных использован критерий хи-квадрат (χ^2). Уровень статистической значимости различий определён как $p < 0.05$

Время	2 мг/мл	4 мг/мл	8 мг/мл	16 мг/мл	32 мг/мл	64 мг/мл	128 мг/мл	контроль
15 минут								
RAMEB	1376/1400 98,3 (%) $p = 0,67$	1373/1400 98,1 (%) $p = 0,98$	1236/1400 88,3 (%) $p < 0,05$	910/1400 65,0 (%) $p < 0,05$	609/1400 43,5 (%) $p < 0,05$	567/1400 40,5 (%) $p < 0,05$	22/1400 1,6 (%) $p < 0,05$	1373/1400 98,1(%)
30 минут								
RAMEB	1292/1400 92,3 (%) $p < 0,05$	1276/1400 91,2 (%) $p < 0,05$	1190/1400 85,0 (%) $p < 0,05$	791/1400 56,5 (%) $p < 0,05$	607/1400 43,4 (%) $p < 0,05$	529/1400 37,8 (%) $p < 0,05$	14/1400 1,0 (%) $p < 0,05$	1369/1400 97,8 (%)
RAMEB-CHOL	1379/1400 98,5 (%) $p = 0,16$	1376/1400 98,3 (%) $p = 0,34$	1380/1400 98,6 (%) $p = 0,12$	1370/1400 97,9 (%) $p = 0,89$	1325/1400 94,7 (%) $p < 0,05$	–	–	–
60 минут								
RAMEB	1254/1400 89,6 (%) $p < 0,05$	1240/1400 88,6 (%) $p < 0,05$	1029/1400 73,5 (%) $p < 0,05$	732/1400 52,3 (%) $p < 0,05$	553/1400 39,5 (%) $p < 0,05$	336/1400 24,0 (%) $p < 0,05$	0 (%)	1370/1400 97,9 (%)
RAMEB-CHOL	1380/1400 98,6 (%) $p = 0,15$	1377/1400 98,4 (%) $p = 0,33$	1355/1400 96,8 (%) $p = 0,08$	1253/1400 89,5 (%) $p < 0,05$	1195/1400 85,4 (%) $p < 0,05$	–	–	–

На основании полученных данных были рассчитаны значения полумаксимальной ингибирующей концентрации (IC_{50}) методом аппроксимации экспериментальных данных четырёхпараметрической логистической моделью (4PL) с фиксированным верхним (98 %) и нижним (0 %) пределами. Кроме того, были определены пороговые концентрации отсутствия эффекта (NOEC, *No Observed Effect Concentration*) и минимальной наблюдаемой цитотоксической концентрации (LOEC, *Lowest Observed Effect Concentration*) по критерию χ^2 на основании отсутствия или наличия статистически значимого ($p < 0,05$) снижения жизнеспособности клеток относительно контроля. Рассчитанные значения IC_{50} , NOEC и LOEC для RAMEB и RAMEB-CHOL при различных временах инкубации представлены в Таблице 6.

Таблица 6 – Значения полумаксимальной ингибирующей концентрации (IC_{50}), пороговой концентрации отсутствия эффекта (NOEC) и минимальной наблюдаемой цитотоксической концентрации (LOEC) для RAMEB и RAMEB-CHOL при различных временах инкубации, рассчитанные по данным аппроксимации логистической моделью (4PL) и критерию χ^2 ($p < 0,05$) относительно контроля

Время инкубации	IC_{50} (мг/мл)	NOEC (мг/мл)	LOEC (мг/мл)	Соединение
15 минут	31,3	4	8	RAMEB
30 минут	28,7	–	2	RAMEB
60 минут	20,2	–	2	RAMEB
30 минут	>32	16	32	RAMEB-CHOL
60 минут	>32	8	16	RAMEB-CHOL

Полученные данные демонстрируют выраженную дозо- и времязависимую цитотоксичность RAMEB в отношении сперматозоидов человека в исследованном диапазоне концентраций. Снижение IC_{50} от 31,4 мг/мл (15 минут) до 20,2 мг/мл (60 минут) отражает усиление цитотоксического эффекта при увеличении времени экспозиции. Определённые значения NOEC и LOEC позволяют охарактеризовать диапазоны концентраций, при которых токсическое действие либо отсутствует, либо становится статистически значимым. Для времени экспозиции 15 минут NOEC составил 4 мг/мл, а LOEC – 8 мг/мл, что указывает на наличие концентрационного интервала, в пределах которого жизнеспособность клеток не отличается от контрольной. Для 30- и 60-минутной инкубации NOEC не был выявлен, тогда как LOEC составляет 2 мг/мл, что свидетельствует о статистически значимом снижении жизнеспособности уже при минимальной протестированной концентрации [293].

Комплекс RAMEB с холестерином характеризуется существенно меньшей цитотоксичностью. В исследованном диапазоне концентраций значение IC_{50} не достигалось ни при одном времени инкубации. Для 30 минут NOEC составляет 16 мг/мл, LOEC – 32 мг/мл; для 60 минут NOEC – 8 мг/мл, LOEC – 16 мг/мл. Сравнительный статистический анализ показал, что при 30- и 60-минутной инкубации жизнеспособность сперматозоидов в присутствии RAMEB-CHOL была статистически значимо выше, чем в присутствии RAMEB, на всех исследованных концентрациях в пределах диапазона 2–32 мг/мл (χ^2 , $p < 0,05$) [293].

Полученные данные демонстрируют выраженное дозо- и времязависимое снижение жизнеспособности сперматозоидов человека под действием RAMEB, что полностью согласуется с современными представлениями о механизме взаимодействия метилированных циклодекстринов с клеточными мембранами [250; 294]. RAMEB характеризуется высокой способностью к экстракции холестерина из липидного бислоя, причём эффективность этого процесса напрямую зависит от концентрации и длительности воздействия. Как уже упоминалось,

холестерин является структурным и функциональным элементом мембраны: он стабилизирует упорядоченную упаковку липидных хвостов, уменьшает проницаемость мембраны, поддерживает необходимую микродоменную организацию (рафты) и обеспечивает оптимальное функционирование мембранных белков и сигнальных комплексов. Удаление холестерина под действием циклодекстринов вызывает повышение текучести липидного бислоя, дестабилизацию интегральных белков и нарушение мембранного гомеостаза. Эти структурно-функциональные изменения сопровождаются увеличением проницаемости мембраны, снижением её осмотической устойчивости и перераспределением липидных рафтов. В совокупности эти изменения могут запускать каскад патологических процессов – от нарушения барьерной функции мембраны до гибели клетки [295].

В случае RAMEB-CHOL гидрофобные полости циклодекстринов уже заняты молекулами холестерина, что существенно ограничивает возможность связывания и удаления холестерина из мембран клеток. Таким образом, конкурентное насыщение связывающих центров циклодекстрина снижает его экстрагирующую активность в отношении мембранного холестерина. Полученные в работе значения IC_{50} , NOEC и LOEC подтверждают данное предположение: для RAMEB-CHOL токсический эффект развивается при существенно более высоких концентрациях по сравнению с RAMEB. Тем не менее токсичность комплекса RAMEB-CHOL сохраняется, что может быть связано с присутствием в препарате значительного количества несвязанного циклодекстрина, остающегося после приготовления по стандартному, наиболее цитируемому в литературе протоколу [264] (90 мг холестерина на 1 г RAMEB). Расчёты показывают, что при стехиометрии связывания 1:1 около 69 % исходного RAMEB остаётся свободным, а при 2:1 – около 39 %. Таким образом, в составе препарата может сохраняться от 40 до 70 % циклодекстрина, не связанного в комплексы с холестерином.

Для того чтобы подтвердить взаимосвязь между потерей мембранного холестерина и снижением жизнеспособности сперматозоидов, была проведена количественная оценка концентрации холестерина в инкубационной среде после обработки сперматозоидов различными концентрациями RAMEB. Установлено, что по мере увеличения концентрации RAMEB в образцах содержание холестерина в среде возрастает, что свидетельствует о его активном извлечении из мембран сперматозоидов. Инкубация сперматозоидов в течение 60 минут при 37 °C в среде, содержащей 8, 16, 32 и 64 мг/мл RAMEB, приводит к экстракции соответственно 20, 27, 42 и 67 % исходного количества холестерина из мембран сперматозоидов [293]. Полученные данные согласуются с выявленным снижением жизнеспособности при увеличении концентрации RAMEB.

Стоит отметить, что инкубация сперматозоидов с RAMEB приводит к изменению морфологии сперматозоидов: хвосты сперматозоидов закручиваются. Данный эффект

наблюдается при концентрации RAMEB в образце, равной 16 мг/мл, и становится более выраженным при дальнейшем (32 мг/мл и выше) повышении концентрации RAMEB (Рисунок 6) [293].

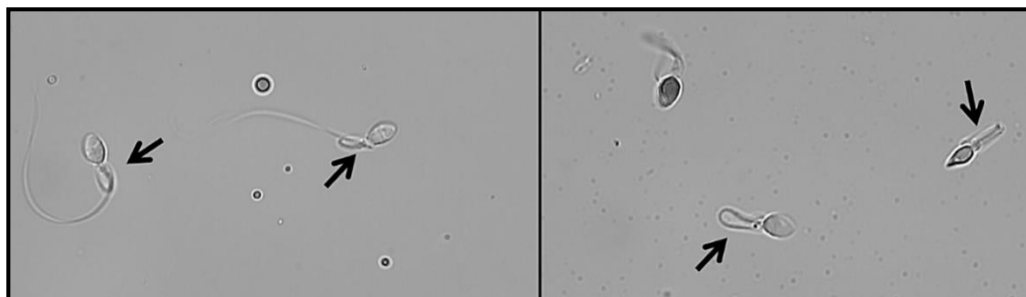


Рисунок 6 – Изменение морфологии сперматозоидов при добавлении к образцу: а) 16 мг/мл RAMEB; б) 32 мг/мл RAMEB. Стрелки указывают на характерное закручивание хвоста сперматозоидов

Выявленное при взаимодействии с RAMEB характерное морфофункциональное изменение – закручивание хвоста («coiled tail») сперматозоидов – представляет собой специфический ответ, который может быть интерпретирован как следствие изменений биофизических свойств плазматической мембраны, обусловленных экстракцией холестерина.

В научной литературе описано, что при помещении сперматозоидов в гипоосмотические условия осмотический приток воды приводит к характерному закручиванию жгутика [296]. С учётом этого наблюдаемый в настоящем исследовании аналогичный эффект закручивания хвоста при воздействии высоких концентраций RAMEB можно объяснить повышением осмотической проницаемости мембраны, возникающим в результате экстракции холестерина [297]. Деплеция стеролов известна как фактор, нарушающий барьерные свойства и механическую стабильность мембраны, что, в свою очередь, способно усиливать осмотическую чувствительность клетки. Таким образом, выявленное изменение морфологии жгутика может рассматриваться как функциональный ответ, схожий с гипоосмотическим, но индуцированный физико-химической модификацией мембраны сперматозоида циклодекстринами.

Согласно концепции *bilayer-couple*, плазматическая мембрана представляет собой ассиметричную структуру, состоящую из двух монослоёв – наружного (экзоплазматического) и внутреннего (цитоплазматического). Эти монослои механически связаны между собой, но способны изменять свою относительную площадь и упругие свойства независимо друг от друга в ответ на изменение липидного состава, температуры или воздействия химических агентов. Изменение относительной площади одного монослоя по отношению к другому приводит к формированию спонтанной кривизны мембраны: увеличение площади наружного монослоя индуцирует выпячивание мембраны наружу (эхиноцитоз), а увеличение площади внутреннего монослоя – впячивание внутрь (стоматоцитоз) [298]. Морфологические изменения клеток, индуцируемые взаимодействием с метил- β -циклодекстринами, описаны для различных типов

клеток. Одним из наиболее изученных и наглядных примеров служат эритроциты. В нашем случае деплеция мембранного холестерина из наружного монослоя приводит к нарушению баланса площадей наружного и внутреннего монослоев липидного бислоя, способствуя формированию спонтанной кривизны мембраны, что для тонкой и протяжённой структуры жгутика может приводить к формированию устойчивого изгиба и закручиванию. В совокупности данные механизмы определяют пороговый, дозозависимый характер эффекта: при концентрациях ниже 16 мг/мл деформация не выявляется, тогда как при 32 мг/мл и выше она становится ещё более выраженной.

Результаты проведённого исследования демонстрируют выраженную токсичность RAMEB в отношении сперматозоидов человека, что проявляется нарушением целостности мембран и утратой жизнеспособности клеток. Установленный эффект согласуется с известными в научной литературе данными, согласно которым метилированные производные β -циклодекстрина характеризуются высокой токсичностью в отношении различных типов клеток, например, эпителиальных (Caco-2) [300], эндотелиальных (HUVEC) [301] и эритроцитов [299]. Общим механизмом повреждения является высокая способность этих соединений к комплексообразованию с мембранным холестерином, что подтверждается исследованиями фазовой растворимости [302]. Согласно исследованиям растворимости, эта способность количественно описывается комплексообразующей эффективностью, зависящей от размера внутренней полости циклодекстрина, природы заместителей и степени замещения [303]. Полость β -циклодекстрина по своим размерам оптимальна для молекулы холестерина, что обеспечивает высокое сродство с этим стеролом [303]. Вместе с тем нативный β -циклодекстрин обладает самой низкой среди всех циклодекстринов растворимостью в воде ($\sim 18,5$ г/л при 25°C), что обусловлено образованием плотной сети внутримолекулярных водородных связей, стабилизирующей кристаллическое состояние и препятствующей гидратации молекулы [304]. Химическая модификация β -циклодекстрина позволяет устранить это ограничение за счёт разрушения сети водородных связей. Например, метилирование приводит к увеличению водорастворимости более чем на порядок (> 500 г/л), а также к повышению гидрофобности внутренней полости, что позволяет реализовать высокую аффинность в полном объёме. Гидроксипропилирование также резко повышает растворимость (> 600 г/л), но при этом ослабляет гидрофобные взаимодействия, снижая комплексообразующую эффективность [258]. Ионные заместители резко увеличивают гидрофильность, но снижают сродство к холестерину [300].

Таким образом, токсичность RAMEB в отношении сперматозоидов человека представляет собой прямое следствие оптимальной геометрии (стехиометрии) полости β -циклодекстрина, высокой гидрофобности, обусловленной метильными заместителями, и высокой растворимости

модифицированной молекулы. Сопоставление с данными по другим клеточным моделям подчёркивает универсальность механизма.

3.5. Исследование мембраны сперматозоидов с помощью метода спиновых зондов: взаимодействие с метилированными β -циклодекстринами

Для исследования мембран сперматозоидов в данной работе был применён классический подход к изучению физических свойств липидных мембран – метод спиновых зондов [266; 305–312]. Спектры электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) спиновых зондов предоставляют информацию о том, насколько подвижны парамагнитные фрагменты зондов, о том, как они ориентированы в мембране, а также о полярности их локального окружения. В качестве чувствительного к изменениям в молекулярном окружении липидорастворимого зонда мы использовали зонд 5-доксилстеарат (5-ДС). Применение липидорастворимых зондов, таких как спин-меченые производные стеариновой кислоты, продемонстрировало их высокую эффективность в качестве молекулярных индикаторов структурных изменений в различных типах липидных мембран [311]. Фрагмент зонда, содержащий группу $>N-O\cdot$ и обладающий парамагнитными свойствами, образует ковалентную связь с молекулой стеариновой кислоты. В молекуле стеариновой кислоты карбоксильная группа находится у поверхности мембраны, а гидрофобная часть молекулы, то есть «хвост», погружена внутрь мембраны. Параметры спектра ЭПР молекул спинового зонда, находящегося в мембране, позволяют получить сведения о подвижности и степени организации углеводородных цепей липидов, которые окружают парамагнитный фрагмент зонда [306]. В научных работах, посвящённых изучению липидных мембран, применяются спиновые зонды, созданные на основе стеариновой кислоты, у которых парамагнитный фрагмент может находиться на разном удалении от полярной «головки» молекулы зонда. С увеличением глубины погружения группы $>N-O$ в мембрану подвижность зонда увеличивается, а степень упорядоченности относительно оси, которая перпендикулярна поверхности мембраны, снижается. В случае спинового зонда 5-ДС, который был использован в этом исследовании, парамагнитный фрагмент расположен в поверхностном слое липидного бислоя. Этот слой отличается упорядоченным расположением жирнокислотных «хвостов» липидов [311]. В своей работе мы использовали данный зонд в качестве индикатора структурного состояния липидной матрицы. Мы начали с изучения модельной системы: проанализировали, как холестерин влияет на спектры ЭПР зонда 5-ДС, погружённого в липидный бислой липосом. На следующем этапе работы мы исследовали, как удаление холестерина из мембран сперматозоидов с помощью RAMEB отражается на спектрах ЭПР зонда 5-ДС, растворённого в мембранах сперматозоидов. Мы воспользовались этим зондом в качестве инструмента для анализа структурного состояния липидного бислоя. На первом этапе работы мы провели исследование

модельной системы, чтобы понять, какое влияние оказывает холестерин на спектры ЭПР зонда 5-ДС, растворённого в липидной мембране липосом. В ходе дальнейшего исследования мы изучили, как сказывается удаление холестерина из мембраны сперматозоидов с помощью RAMEB на спектрах ЭПР зонда 5-ДС, погружённого в мембраны сперматозоидов.

3.6. Влияние содержания холестерина на спектр ЭПР зонда 5-доксил стеарата в липосомах

В качестве объекта исследования были выбраны липосомы с разным содержанием холестерина. На примере этой модельной системы было продемонстрировано, как концентрация холестерина в липидных мембранах влияет на их структурные свойства.

На Рисунке 7 представлены спектры ЭПР спиновоего зонда 5-ДС, который был встроен в мембраны липосом, состоящие из диолеилфосфатидилхолина. Липосомы отличались по содержанию холестерина: спектр 1 – липосомы без холестерина, спектр 2 – липосомы с холестерином [313].

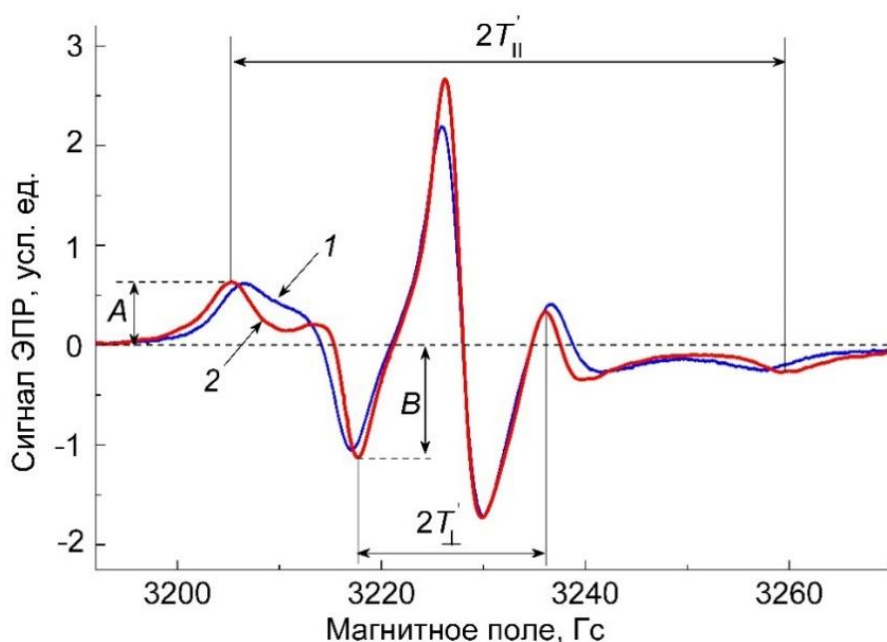


Рисунок 7 – Спектры ЭПР спиновоего зонда 5-ДС, растворённого в мембранах липосом из диолеилфосфатидилхолина, не содержащих холестерина (спектр 1) и в присутствии холестерина (спектр 2)

Можно заметить, что и в случае отсутствия холестерина в липосомах, и при его наличии регистрируются характерные спектры ЭПР, форма которых указывает на анизотропное вращение молекул зонда [306–311]. Сопоставление значений сверхтонкой структуры (СТС) спектров ЭПР в мембране с данными научных публикаций позволяет сделать вывод о том, что парамагнитный фрагмент зонда 5-ДС находится в гидрофобном окружении [266]. Для зонда 5-ДС, погружённого в липидный бислой, спектр ЭПР отражает влияние как полярности микроокружения, так и подвижности парамагнитного фрагмента. В качестве количественных характеристик спектра

используются расстояния между «внешними» и «внутренними» экстремумами спектра, обозначаемыми как $2T_{\parallel}'$ и $2T_{\perp}'$ соответственно (Рисунок 7, а также обзорные статьи [305; 307–310]).

На Рисунке 8 а представлено, каким образом изменяются описанные выше параметры при увеличении концентрации холестерина в липосомах из диолеилфосфатидилхолина. Можно заметить, что с ростом содержания холестерина величина $2T_{\parallel}'$ возрастает, тогда как параметр $2T_{\perp}'$ уменьшается [313].

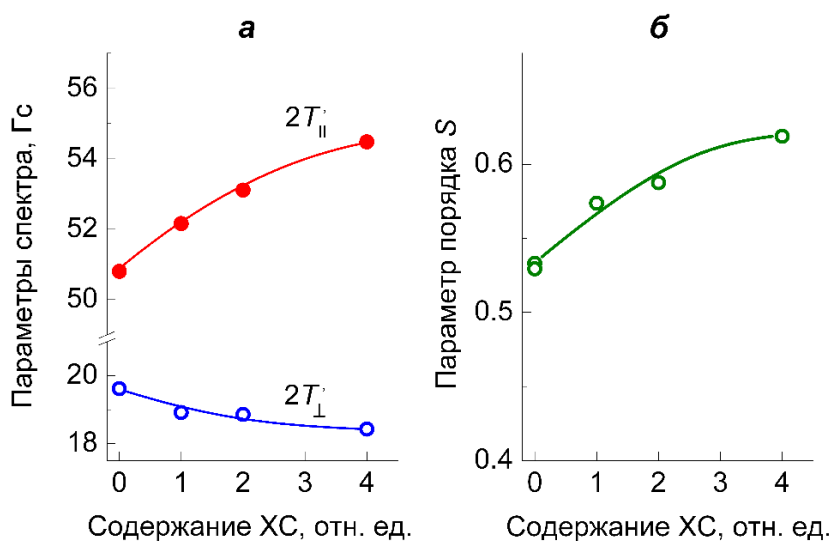


Рисунок 8 – Параметры $2T_{\parallel}'$ и $2T_{\perp}'$ спектра ЭПР (а) и зависимость параметра порядка (б) от относительного содержания холестерина в липосомах. К суспензии липосом был добавлен спиновой зонд 5-ДС (0.2 мМ). Одна условная единица соответствует содержанию холестерина в липосомах, равному 12.5 % от общего числа молекул липидов в липосомах

В ранних научных работах, посвящённых моделированию спектров ЭПР спиновых зондов, было установлено, что увеличение параметра $2T_{\parallel}'$ и уменьшение параметра $2T_{\perp}'$ может быть индикатором изменений подвижности парамагнитных фрагментов. Эти изменения могут быть связаны как с замедлением вращательного движения, так и с изменениями ориентации парамагнитных фрагментов относительно нормали к поверхности мембраны. Эти изменения обычно описываются через величину «параметра порядка» S [307–310]. Параметры $2T_{\parallel}'$ и $2T_{\perp}'$ несут важную информацию об анизотропии тензора сверхтонкой структуры (СТС) спектра ЭПР нитроксильных радикалов. Параметр спектра $2T_{\parallel}'$ определяется константой сверхтонкого взаимодействия тех молекул зонда, у которых p_z -орбиталь неспаренного электрона парамагнитного фрагмента ориентирована параллельно направлению магнитного поля. Параметр $2T_{\perp}'$ определяется константой СТС для молекул, у которых направление p_z -орбитали перпендикулярно направлению поля. Результирующий спектр ЭПР представляет собой

совокупность спектров, полученных для молекул зонда, которые имеют различную ориентацию парамагнитных фрагментов относительно направления приложенного магнитного поля. Принимая во внимание, что молекулы зонда совершают вращательные движения, а их ориентация в мембране может меняться, спектр ЭПР для всего ансамбля молекул будет определяться не только скоростью вращения молекул зонда, но и степенью их упорядоченности в матрице, в которой они находятся [305; 307–310].

Изменения параметров спектра ЭПР молекул зонда, которые мы наблюдаем при изменении концентрации холестерина в мембранах липосом, несут в себе важную информацию: увеличение параметра $2T_{\parallel}'$ и уменьшение $2T_{\perp}'$ свидетельствуют о том, что повышение концентрации холестерина в мембране приводит к снижению скорости вращения зонда.

Для описания подвижности и ориентированности молекул зонда в мембране часто применяется параметр порядка S . Его можно легко рассчитать, измерив значения $2T_{\parallel}'$ и $2T_{\perp}'$ [265]. На Рисунке 8 б видно, что параметр S увеличивается с ростом относительного содержания холестерина в липосомах. С высокой точностью этот параметр пропорционален величине $2T_{\parallel}'$. Увеличение параметра S при росте относительного содержания холестерина говорит о снижении подвижности углеводородных цепей липидов. Иными словами, холестерин приводит к «затвердеванию» липидной матрицы, в которой локализованы молекулы зонда.

Вместе с изменением параметров $2T_{\parallel}'$ и $2T_{\perp}'$ меняется и другой параметр спектра – отношение амплитуд экстремумов B/A , которое определяет форму низкополевой составляющей спектра ЭПР [313]. Как уже упоминалось, экстремум A соответствует радикалам, у которых p_z -орбиталь нитроксильного фрагмента расположена параллельно вектору магнитного поля. В свою очередь, экстремум B характерен для молекул зонда, у которых p_z -орбиталь ориентирована перпендикулярно вектору магнитного поля. Вероятно, стерические ограничения, которые накладывают молекулы холестерина, приводят к уменьшению анизотропии вращения ацильных цепей молекул зонда 5-ДС. Это подтверждается смещением экстремума A от центра спектра ЭПР, а экстремума B – к центру спектра.

Представленные выше данные о влиянии холестерина на спектр ЭПР спинного зонда 5-ДС в липосомах подтверждают выводы других работ, в которых было установлено, что добавление холестерина значительно усиливает анизотропию вращения молекул спинного зонда на основе 3-доксилхолестана, погружённого в гидратированные мультислой яичного лецитина [314–318]. Р. Лаппер, С. Патерсон и И. Смит [314] предложили модель случайных блужданий, согласно которой молекулы зонда быстро вращаются внутри конуса ограниченного объёма. При повышении содержания холестерина угол этого конуса уменьшается от 46° до 17° (в присутствии 55 мол. % холестерина). При этом скорость вращения молекул зонда существенно снижается, о чём свидетельствует увеличение времени вращательной корреляции с 1,8 до 3,8 нс

в присутствии 30 мол. % холестерина. Это также подразумевает снижение скорости латеральной диффузии зонда (уменьшение «текучести»), обусловленное ростом степени упорядоченности молекул зонда.

Таким образом, экспериментальные результаты, полученные в настоящем исследовании с использованием липидорастворимого зонда 5-ДС, согласуются с литературными данными [314] и подтверждают гипотезу о том, что холестерин приводит к вытяжению цепей жирных кислот (снижает вероятность *gauche*-конформации углеводородных цепей) и уменьшает амплитуду вращательного движения ацильных цепей липидов. Эти данные также согласуются с предположением о том, что биологическая роль холестерина в мембране сперматозоидов заключается в регулировании микровязкости липидных областей этих мембран. Увеличение микровязкости мембраны может приводить к снижению латеральной подвижности липидов в бислое.

3.7. Влияние метилированных β -циклодекстринов на спектр ЭПР зонда 5-доксил стеарата в мембранах сперматозоидов

Отметим, что исследование мембран сперматозоидов, содержащих функционально активные белковые комплексы, потребовало особого внимания для получения корректных спектров ЭПР спиновых зондов в сперматозоидах, не осложненных эффектами редокс-превращений парамагнитных зондов. Действительно, регистрация спектров ЭПР требует соблюдения важного контроля – не происходит ли изменение формы спектра, вследствие восстановления молекул зонда во время измерения спектра, которое занимает несколько (1–4) минут? Заметим, что концентрация сперматозоидов в измеряемых образцах была ограничена по ряду причин, в частности, необходимо было следить за равномерным заполнением кюветы, не допуская агрегации клеток. По этой причине мы накапливали сигнал ЭПР для каждого образца, многократно регистрируя спектры (каждый спектр записывали в течение $\approx 0,5$ –1 мин) и сохраняли их в памяти компьютера спектрометра, контролируя при этом, что форма записанного спектра ЭПР не изменяется в ходе многократных измерений для данного образца. Низкое соотношение сигнал/шум потребовало накопления сигнала: спектры записывались 4 раза подряд, производилось выравнивание по центральной линии, усреднение спектров и дополнительное сглаживание (скользящее среднее по 30 точкам для спектров из 5000 точек с линейной аппроксимацией между соседними точками) полученного усредненного спектра. Обработка осуществлялась в программе WinEPR, разработанной Б. В. Трубициным на кафедре биофизики физического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова.

На Рисунке 9 представлен характерный спектр ЭПР спинового зонда 5-ДС, встроенного в мембрану сперматозоидов контрольного образца (спектр 1 – сперматозоиды без обработки

RAMEB). Как и в случае с липосомами, спектр ЭПР зонда указывает на его расположение в липидном бислое мембраны и на замедленное анизотропное вращение парамагнитного фрагмента зонда [313]. Для описания подвижности парамагнитного фрагмента зонда и его ориентации в мембране относительно оси, перпендикулярной поверхности мембраны, удобно воспользоваться двумя параметрами спектра ЭПР. Первый параметр – это расстояние между внешними точками экстремумов спектра (параметр $2T_{\parallel}'$). Второй параметр – это отношение амплитуд двух экстремумов в низкополевой области спектра ЭПР, параметр (B/A). На Рисунке 9 можно достаточно отчётливо различить экстремумы в спектре ЭПР, которые позволяют измерить значение параметра $2T_{\perp}'$ (расстояние между внутренними экстремумами). Следует отметить, что параметр $2T_{\perp}'$ в случае сперматозоидов не всегда определяется достаточно чётко, что, вероятно, может быть обусловлено гетерогенностью препаратов. Поэтому для количественной оценки спектра ЭПР зонда, исходя из которой можно судить о его поведении в мембране, особую информационную ценность представляет параметр $2T_{\parallel}'$, который всегда проявляется достаточно чётко.

Следует пояснить, почему параметр $2T_{\parallel}'$, использованный нами для анализа влияния холестерина на структурные свойства мембран сперматозоидов, является наиболее удобной количественной характеристикой спектра ЭПР. Применение параметра $2T_{\parallel}'$ в качестве источника данных о подвижности липидорастворимого зонда 5-ДС позволяет исключить возможность возникновения побочного влияния примесного сигнала ЭПР, который может быть вызван парамагнитными молекулами зонда, связанными с RAMEB. После того как опытные образцы были проинкубированы в присутствии RAMEB для удаления молекул холестерина из сперматозоидов, мы провели двукратную отмывку и последующее ресуспендирование клеток в среде, не содержащей RAMEB. Можно было бы предположить, что даже незначительное количество молекул зонда, не связанных с мембраной (например, растворённых в воде или находящихся внутри RAMEB), может повлиять на спектр ЭПР молекул 5-ДС, находящихся в мембранах опытных образцов, прошедших обработку. Легко продемонстрировать, что мы способны исключить подобные искажения. На Рисунке 9 под цифрой 2 представлен сигнал ЭПР, зарегистрированный для молекул зонда, растворённых в среде для инкубации, содержащей RAMEB, но не содержащей сперматозоидов. Очевидно, что данный сигнал представляет собой асимметричный триплет, состоящий из относительно узких линий, которые принадлежат молекулам зонда, быстро вращающимся в полярной среде. Характерное время вращательной корреляции для этих молекул, определённое по форме спектра ЭПР [266], составляет $\tau_c \approx 0.1$ нс. Для этих молекул константа изотропного (контактного) сверхтонкого взаимодействия составляет $a_{\text{изо}} = 15,5$ Гс, что характерно для нитроксильных радикалов, находящихся в полярной среде [266]. Сопоставляя спектры 1 и 2, представленные на Рисунке 9, можно заметить, что расстояние

между линиями СТС в спектре молекул зонда, находящихся в содержащем RAMEB растворе, значительно меньше, чем расстояние $2T_{\parallel}'$ между «внешними» экстремумами в спектре молекул метки, растворённых в мембране сперматозоидов. Стоит отметить, что низкополевой и высокополевой экстремумы ЭПР-сигнала молекул зонда в мембране (спектр 1) достаточно удалены от узких линий молекул метки (спектр 2). Это свидетельствует о том, что параметр $2T_{\parallel}'$ может быть использован в качестве надёжного индикатора поведения молекул зонда 5-ДС в мембране сперматозоидов. Для экстремумов спектра ЭПР, по которым определяется параметр $2T_{\perp}'$, также наблюдается смещение относительно узких линий триплетного сигнала молекул зонда в полярном окружении (Рисунок 9). Следовательно, применение $2T_{\parallel}'$ и $2T_{\perp}'$ в качестве параметров, отражающих изменения в свойствах мембранных липидов, помогает избежать искажений, которые могли бы возникнуть из-за остаточного (примесного) сигнала ЭПР от молекул зонда, не связанных с мембраной.

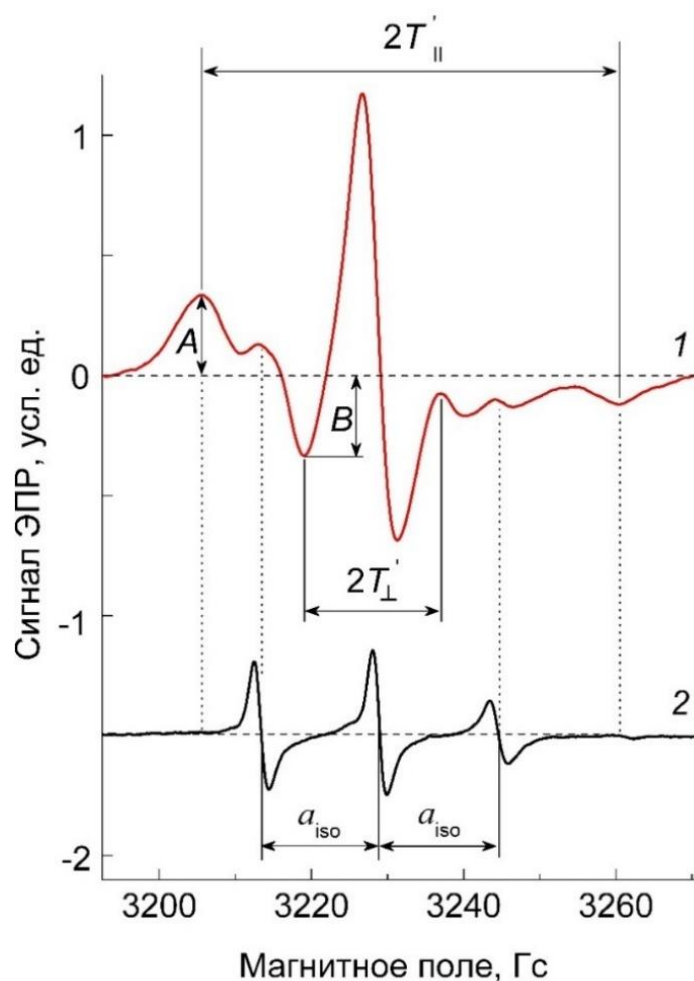


Рисунок 9 – Спектры ЭПР спинового зонда 5-ДС в суспензии сперматозоидов (спектр 1) и в водном растворе RAMEB (спектр 2). Спектр 1 записан при амплитуде ВЧ-модуляции $H_m = 4$ Гс, спектр 2 – при амплитуде ВЧ-модуляции $H_m = 1$ Гс; спектр был усреднён по четырём последовательным измерениям

На Рисунке 10 показаны спектры ЭПР спинового зонда 5-ДС в контрольных образцах сперматозоидов (спектр 1) и опытных образцах, из которых холестерин был удален с помощью обработки RAMEB (спектр 2). Можно видеть, что в контрольных образцах, не обработанных RAMEB, значение параметра $2T_{||}'$ увеличивается по сравнению с опытными образцами. Данное наблюдение соответствует тому, что мы видели в модельной системе (липосомах с разным содержанием холестерина). Этот результат показывает, что удаление холестерина (даже частичное) приводит к увеличению подвижности молекул зонда в мембранах сперматозоидов [313].

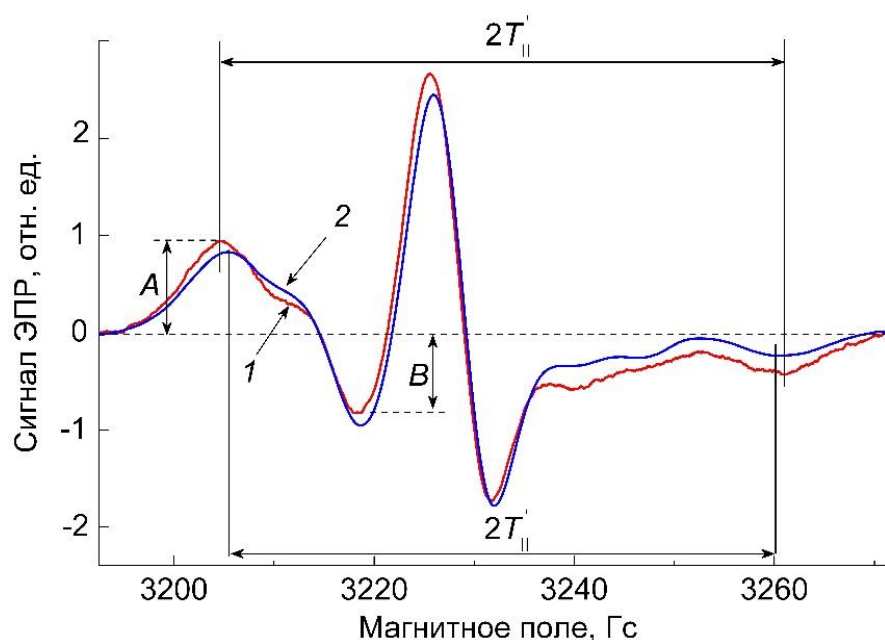


Рисунок 10 – Спектры ЭПР парамагнитного зонда 5-ДС в сперматооидах (записаны при $H_m = 2$ Гс). Спектр 1 – контрольные препараты (без обработки RAMEB), спектр 2 – препараты сперматозоидов, предварительно инкубированных в присутствии RAMEB. Спектры были усреднены по четырём последовательным измерениям

Кроме того, после удаления холестерина из мембран сперматозоидов с помощью RAMEB, отношение B/A в спектре ЭПР молекул зонда возрастает [313]. Данное наблюдение служит дополнительным подтверждением того, что после удаления холестерина из мембран сперматозоидов мембраны претерпевают структурное изменение, подобное тому, которое можно было наблюдать в модельной системе (липосомы). Следует отметить, что применение отношения B/A в качестве «диагностического» показателя является обоснованным, так как положение экстремумов B и A не совпадает с положением узких линий триплетного сигнала от молекул 5-ДС, не ассоциированных с мембраной. Удаление холестерина посредством обработки сперматозоидов с использованием RAMEB приводит к увеличению отношения B/A (Рисунок 10). Уменьшение параметра $2T_{||}'$, также как и увеличение параметра B/A , обусловленные удалением холестерина, свидетельствуют об изменении ориентированности и подвижности молекул зонда

в мембране сперматозоидов. Рост амплитуды пика В по отношению к величине пика А (Рисунок 11), по-видимому, обусловлен сужением спектральных линий. Такой эффект может возникать как в результате ускоренного вращательного движения молекул зонда, приводящего к компенсации вклада анизотропной составляющей тензора СТС, так и вследствие уменьшения «конуса вращений» углеводородных цепей липидов, что связано с их более упорядоченной ориентацией относительно нормали к поверхности мембраны.

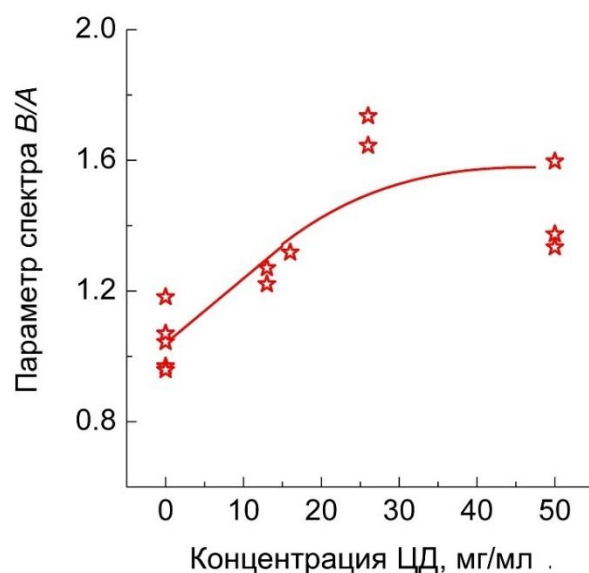


Рисунок 11 – Зависимость параметра В/А спектра ЭПР спинового зонда 5-ДС, локализованного в мембранах сперматозоидов, в зависимости от концентрации циклодекстрина (RAMEB), использованного для удаления холестерина из мембран сперматозоидов. Спектры ЭПР зонда 5-ДС в мембранах сперматозоидов были записаны при $H_m = 2$ Гс. Каждая точка – результат разных измерений

Действительно, как указывается в опубликованных работах [308–310], зафиксированные изменения в форме ЭПР-спектра могут быть интерпретированы как результат ускорения анизотропного вращения молекул зонда, а также следствием более упорядоченного состояния углеводородных цепей липидов мембраны. При удалении холестерина выявленные изменения спектра ЭПР способны отражать не только сужение «конуса» вращений углеводородных цепей мембранных липидов, но и изменения толщины мембраны [318–320].

Таким образом, сопоставление ЭПР-сигналов молекул 5-ДС в контрольных образцах и в клетках, обработанных RAMEB, позволяет сделать вывод, что удаление холестерина вызывает изменения спектра ЭПР зонда 5-ДС, аналогичные тем, которые можно наблюдать в липосомах с разным содержанием холестерина. При этом микровязкость («текучесть») липидного бислоя после экстракции холестерина оказывается ниже, чем в контрольных образцах, содержащих сперматозоиды, не подвергавшиеся воздействию RAMEB.

3.8. Насыщение мембраны сперматозоидов холестерином с помощью комплексов метилированных β -циклодекстринов с холестерином

Обогащение мембран клеток холестерином представляет собой сложную задачу, поскольку холестерин – липофильная молекула с крайне низкой растворимостью в водных средах, используемых при работе с клеточными культурами [321]. Для эффективного включения холестерина в мембрану необходимы специальные системы-носители. В качестве таких систем могут быть использованы липосомы и циклодекстрины. В случае циклодекстринов транспорт осуществляется за счёт их уникальной структуры: внутренняя полость инкапсулирует молекулу холестерина, а гидрофильная внешняя поверхность обеспечивает её растворимость в водной фазе [322]. Липосомы, напротив, представляют собой сферические везикулы с липидным бислоем, в который холестерин включается на стадии формирования. Передача холестерина клеточной мембране при использовании липосом происходит через слияние бислоёв или обмен липидами между липосомой и клеткой [248]. В рамках настоящего исследования для доставки холестерина в мембраны сперматозоидов были апробированы циклодекстрины.

β -циклодекстрин – это природный олигосахарид, состоящий из семи глюкопиранозных звеньев, соединённых α -1,4-гликозидными связями. Молекула образует тороид (похожий на усеченный конус) с гидрофобной внутренней полостью и гидрофильной внешней поверхностью. Такая структура позволяет β -циклодекстрину образовывать комплексы включения с широким спектром гидрофобных молекул [252]. В данной работе были использованы случайно метилированные β -циклодекстрины (RAMEB), которые являются полусинтетическими производными β -циклодекстринов, в которых группы на атомах C2, C3 и C6 глюкопиранозных колец частично замещены метильными (CH₃) группами. Особенностью RAMEB является случайное распределение метильных заместителей между доступными позициями, что приводит к образованию смеси молекул с различной степенью и схемой замещения (среднее число метильных групп на мономер обычно составляет 1,6–2,0) [323].

Проведено исследование влияния комплексов RAMEB-CHOL на содержание холестерина в мембранах сперматозоидов человека [293]. Для этого сперматозоиды (нативный эякулят) инкубировали с различными концентрациями комплексов RAMEB-CHOL (2–16 мг/мл), после чего определяли количество холестерина в перерасчёте на 10^6 клеток. Для описания центральной тенденции и разброса использованы медиана и межквартильный размах (IQR). С учётом связанной структуры данных общая проверка различий условий выполнялась тестом Фридмана с расчётом согласованности рангов (коэффициент ранговой корреляции Кендалла). Пост-hoc сопоставление «доза против контроля» выполнено критерием Уилкоксона для связанных выборок с коррекцией Холма на множественные проверки.

Дозозависимое изменение концентрации холестерина в сперматозоидах при обработке RAMEB-CHOL представлено на Рисунке 12.

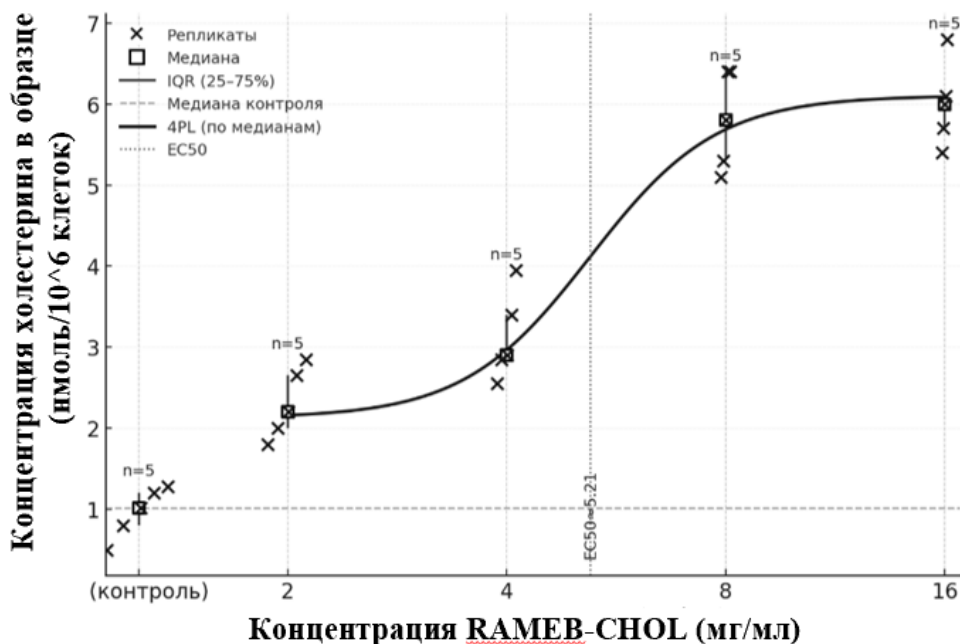


Рисунок 12 – Дозозависимое изменение концентрации холестерина в сперматозоидах при обработке RAMEB-CHOL (мг/мл; логарифмическая шкала с основанием 2; контроль 0 мг/мл вынесен слева). Для каждой дозы показаны отдельные измерения (репликаты), медиана и межквартильный размах (IQR, 25–75 %); $n = 5$. Горизонтальная пунктирная линия – медиана контроля; вертикальная пунктирная линия отмечает EC_{50} (~ 5,2 мг/мл)

Общая проверка показала статистически значимый эффект дозы: тест Фридмана $\chi^2 = 19,36$, $p = 0,0007$; коэффициент согласованности по Кендаллу $W = 0,97$ указывает на очень устойчивую монотонность ответа. Парные сравнения «доза против контроля» (двусторонний критерий Уилкоксона с коррекцией Холма) выявили, что в диапазоне концентраций RAMEB-CHOL 2–16 мг/мл статистическая значимость при $n = 5$ пар и множественных сравнениях не достигается, несмотря на заметные медианные сдвиги. Отсутствие формальной значимости при наличии крупных медианных сдвигов объясняется малым объёмом пар ($n = 5$) и поправкой на множественные сравнения; это подтверждается значимым общим тестом Фридмана.

При инкубации сперматозоидов с RAMEB-CHOL наблюдается дозозависимое увеличение уровня холестерина в мембранах сперматозоидов с насыщением на уровне ~ 6,1 нмоль/10⁶ клеток; половина максимального эффекта (EC_{50}) достигается при ~ 5,2 мг/мл. При дозах RAMEB-CHOL 8–16 мг/мл эффект стабилизируется с выходом на плато, а прирост относительно 8 мг/мл невелик, что указывает на режим убывающей отдачи [293]. Аналогичный вид зависимости – монотонный рост с насыщением – наблюдается в работах по насыщению холестерином мембран сперматозоидов жеребцов [30] и быков [29].

В контрольных образцах (без добавления комплексов RAMEB-CHOL) медианное содержание холестерина составило $\sim 1,02$ нмоль/ 10^6 клеток, что соответствует расчётному соотношению Хол/ФЛ 0,5–0,6 при предполагаемом содержании фосфолипидов в плазматической мембране сперматозоидов 1,7–2,0 нмоль/ 10^6 клеток [157; 166; 169]. Данный результат согласуется с публикациями других авторов о липидном составе мембран сперматозоидов человека [324; 325]. По мере увеличения концентрации комплекса RAMEB-CHOL содержание холестерина в мембранах сперматозоидов возрастает и выходит на насыщение ($\sim 6,1$ нмоль/ 10^6 клеток) при концентрациях комплексов RAMEB-CHOL 8–16 мг/мл. В пересчёте на отношение Хол/ФЛ это соответствует 3,0–3,6, что существенно превышает значения, характерные для биомембран. Однако столь высокий уровень холестерина всё же наблюдается в плазматических мембранах некоторых типов клеток. Так, согласно данным Ли и соавторов [326], соотношение Хол/ФЛ в клеточных мембранах кортикальных волокон хрусталика глаза составляет от 1 до 2, а в ядерных мембранах – от 3 до 4. В таких условиях структура мембраны существенно изменяется: при Хол/ФЛ $\leq 1:1$ (50 мол. %) холестерин равномерно распределён в фосфолипидной матрице; при дальнейшем увеличении концентрации холестерина ($1:1 < \text{Хол/ФЛ} < 2:1$, т.е. 50 – 66 мол. %) в бислое начинают формироваться домены чистого холестерина; при ещё большем избытке (Хол/ФЛ $\geq 2:1$, более 66 мол. %) холестерин уже не удерживается липидным бислоем и выпадает в виде отдельных кристаллических доменов вне мембраны [95]. Таким образом, в мембране клеток хрусталика глаза формируется сложная многофазная система, включающая фосфолипидно-холестериновые области, встроенные домены чистого холестерина и кристаллы холестерина, образующиеся вне бислоя. Подобные по масштабу накопления холестерина описываются и в патофизиологических состояниях, в частности, в гладкомышечных клетках атеросклеротических артерий [327].

Возможными источниками артефактов в подобных экспериментах могут являться наличие остаточных несвязанных комплексов RAMEB-CHOL в среде или адсорбция комплексов RAMEB-CHOL на поверхности клеток. В настоящей работе контрольные эксперименты с комплексами RAMEB-CHOL, инкубированными в отсутствие клеток, показали, что остаточный вклад холестерина после двукратной отмывки не превышает 10 % от наблюдаемого прироста при концентрации комплексов RAMEB-CHOL, составляющей 4 мг/мл [293]. Таким образом, вклад несвязанного холестерина не может объяснить наблюдаемое трёх-четырёхкратное увеличение содержания холестерина. Другой возможный механизм – адсорбция комплексов RAMEB-CHOL на поверхности мембран сперматозоидов. Ранее было показано, что нативный β -ЦД способен адсорбироваться на поверхности липосом, что связывают с образованием водородных связей между полярными головками фосфолипидов и гидроксильными группами β -ЦД [328]. В случае RAMEB таких групп меньше, так как они частично замещены метильными радикалами, поэтому

ождается, что взаимодействие с бислоем будет более слабым. Тем не менее при концентрации 30 мМ как β -ЦД, так и RAMEB образуют на поверхности липосом слой, покрывающий приблизительно половину их поверхности, что подтверждается данными малоуглового рассеяния [328; 329]. Расчёты показывают, что один полный монослой таких комплексов на поверхности сперматозоидов дал бы лишь 0,025–0,05 нмоль/ 10^6 молекул холестерина, то есть порядка 1 % от реально наблюдаемого прироста. Чтобы объяснить весь прирост холестерина в системе (+ 5,1 нмоль / 10^6 клеток) только за счёт адсорбции, потребовалось бы гипотетическое формирование 100–200 слоёв, что физически и биологически нереалистично.

Таким образом, полученные результаты показывают, что обработка RAMEB-CHOL вызывает дозозависимое повышение содержания холестерина в мембранах сперматозоидов с последующим выходом на плато. Такой тип зависимости согласуется с данными, представленными в научной литературе. Соотношение Хол/ФЛ > 3, по-видимому, стоит трактовать, по аналогии с клетками хрусталика глаза, как перенасыщение мембраны холестерином, сопровождаемое формированием доменов чистого холестерина и, вероятно, кристаллов холестерина вне липидного бислоя. С функциональной точки зрения такие концентрации холестерина не являются физиологичными для сперматозоидов, поскольку известно, что холестерин, стабилизируя липидный бислой, одновременно ограничивает подвижность углеводородных цепей фосфолипидов и снижает текучесть мембраны. Поэтому чрезмерное накопление холестерина, в свою очередь, будет приводить к нарушению ключевых процессов, таких как капацитация и акросомальная реакция [192]. Такое содержание холестерина, сопоставимое с наблюдаемым в клетках хрусталика глаза, следует рассматривать как искусственный феномен (методический артефакт), обусловленный экспериментальной системой RAMEB-CHOL.

3.10. Определение оптимальной концентрации комплексов метилированных β -циклодекстринов с холестерином для повышения криотолерантности сперматозоидов человека

Для оценки влияния изменения содержания мембранного холестерина на криотолерантность сперматозоидов было исследовано действие комплексов RAMEB-CHOL. Из каждого образца эякулята отбирали четыре равные по объёму аликвоты. В каждую аликвоту вносили комплексы RAMEB-CHOL в концентрации 0–4 мг/мл. Инкубацию проводили в течение 10 минут при 23 °С. После завершения инкубации образцы подвергались криоконсервации в соответствии со стандартным протоколом с использованием криопротекторной среды SF [293].

После размораживания во всех образцах наблюдалось ожидаемое снижение подвижности и доли сперматозоидов с интактной мембраной (жизнеспособных) по сравнению с нативными

образцами. При этом влияние предварительной инкубации с комплексами RAMEB-CHOL на эти показатели существенно зависело от используемой концентрации [293]. Дозозависимые изменения индекса подвижности и индекса жизнеспособности сперматозоидов при обработке RAMEB-CHOL представлены на Рисунках 13 и 14 соответственно. Для описания центральной тенденции и разброса использованы медиана и межквартильный размах (IQR). С учётом связанной структуры данных проверку различий выполняли критерием знаковых рангов Уилкоксона для связанных выборок с поправкой Холма на множественные сравнения.

Выраженный положительный эффект был получен при концентрации комплексов RAMEB-CHOL, равной 2 мг/мл: индекс подвижности и индекс жизнеспособности в этой группе были статистически значимо выше по сравнению с контролем (49,4 (45,3; 64,3) против 34,6 (28,5; 43,9); $p_{\text{Holm}} < 0,05$; 56,6 (42,9; 70,9) против 42,8 (37,4; 52,1); $p_{\text{Holm}} < 0,05$ соответственно). При концентрации комплексов RAMEB-CHOL, равной 1 мг/мл статистически значимых различий в индексе подвижности и жизнеспособности сперматозоидов по сравнению с контрольными образцами выявлено не было ($p_{\text{Holm}} = 0,26$ и $p = 1$ соответственно). В то же время при обработке образцов комплексами RAMEB-CHOL в концентрации 4 мг/мл индекс подвижности был статистически значимо ниже, чем в контроле (29,6 (25,3; 40,8) против 34,6 (28,5; 43,9), $p_{\text{Holm}} < 0,05$), при этом индекс жизнеспособности в этой группе не отличался от контрольных значений ($p_{\text{Holm}} = 1$) [293].

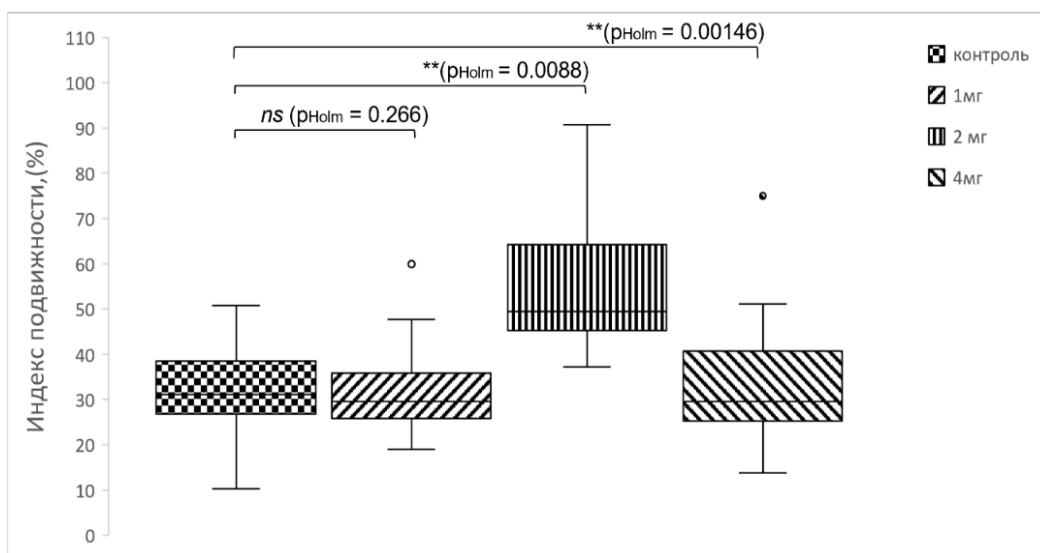


Рисунок 13 – Диаграммы индекса подвижности сперматозоидов (%) после разморозки: контроль и инкубация с RAMEB-CHOL (1, 2 и 4 мг/мл) перед криоконсервацией (n=12). Ящики – медиана и IQR; «усы» – 1,5 x IQR; точки – выбросы. Статистическая значимость для пар «контроль – доза» оценивалась критерием Уилкоксона (двусторонний) с поправкой Холма.

Обозначения: ns – $p \geq 0,05$; ** – $p < 0,05$

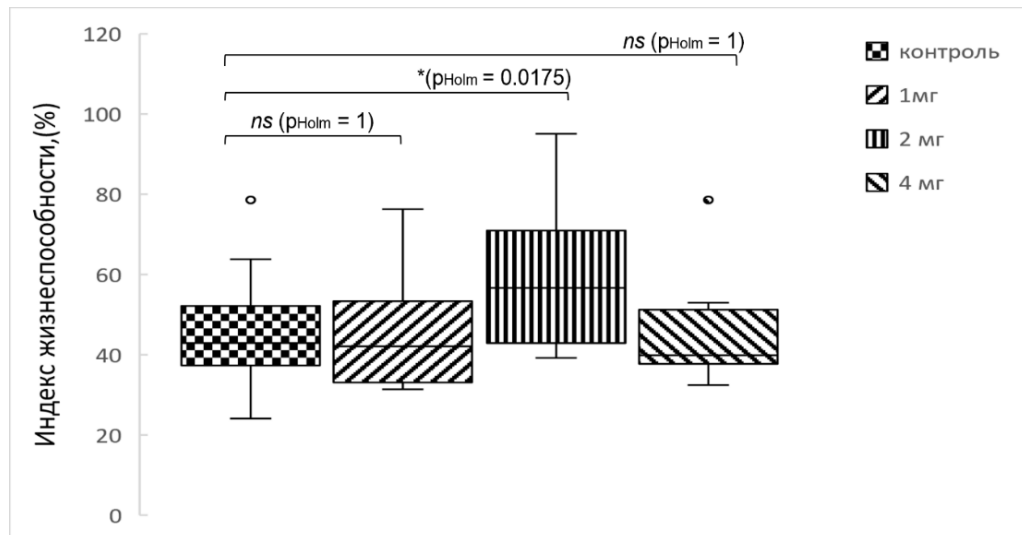


Рисунок 14 – Диаграммы индекса жизнеспособности сперматозоидов (%) после разморозки: контроль и инкубация с RAMEB-CHOL (1, 2 и 4 мг/мл) перед криоконсервацией (n=12). Ящики – медиана и IQR; «усы» – 1,5 x IQR; точки – выбросы. Статистическая значимость для пар «контроль – доза» оценивалась критерием Уилкоксона (двусторонний) с поправкой Холма. Обозначения: ns – $p \geq 0,05$; * – $p < 0,05$

Полученные данные согласуются с результатами исследований на других видах млекопитающих. Так, инкубация сперматозоидов быка и барана с комплексами циклодекстрины-холестерин в концентрации 2 мг на 120 млн клеток перед криоконсервацией приводила к статистически значимому повышению их выживаемости [28; 330]. Для сперматозоидов жеребца оптимальной оказалась концентрация комплексов, равная 1,5 мг на 120 млн сперматозоидов [30; 31], что также указывает на дозозависимый характер действия холестерина и необходимость подбора концентраций для каждого отдельного вида.

Следует отметить, что в настоящем исследовании концентрация комплексов RAMEB-CHOL рассчитывалась исходя из объема образца, а не из количества сперматозоидов, как это принято в большинстве работ. Такой подход был выбран с целью упрощения применения метода в клинической практике, где критически важна воспроизводимость протокола и минимизация дополнительных расчётов. При этом медианная концентрация сперматозоидов в исследованных образцах составила 100,5 (78,0; 90,5) млн/мл, что сопоставимо с концентрациями, которые используются в научной литературе. Также важно подчеркнуть, что нами не было выявлено корреляции между концентрацией сперматозоидов в нативном образце и выживаемостью сперматозоидов после разморозки при инкубации эякулята с различными концентрациями RAMEB-CHOL перед криоконсервацией. Для концентраций RAMEB-CHOL, равных 1 и 2 мг/мл, коэффициент ранговой корреляции Спирмена составил 0,059 ($p = 0,89$) и 0,275 ($p = 0,51$) соответственно [293].

Традиционно основным механизмом криопротекторного действия холестерина в мембране клеток считается стабилизация бислоя: уменьшается вероятность возникновения структурных дефектов мембраны при охлаждении и нагревании, снижается ее проницаемость для воды и ионов [247]. Можно также предположить существование криопротекторных механизмов, связанных с ослаблением окислительного стресса. Известно, что в процессе замораживания и оттаивания сперматозоидов активируются АФК и усиливается окислительный стресс [271]. Согласно некоторым публикациям, холестерин способен обеспечивать защиту мембран от окислительного повреждения посредством двух принципиально различных, но взаимодополняющих механизмов.

Первый механизм можно охарактеризовать как «несакрифициальный» структурный механизм. В отличие от классических антиоксидантов (например, α -токоферола), которые действуют по принципу «жертвенного» перехвата радикалов и сами расходуются в процессе реакции, холестерин реализует другой механизм. Встраиваясь между углеводородными хвостами фосфолипидов, молекулы холестерина вызывают уплотнение бислоя и снижение латеральной подвижности липидов. Это сопровождается уменьшением свободного объёма в гидрофобной части мембраны и снижением диффузии кислорода и активных форм кислорода вглубь бислоя [331]. В результате химическая доступность ненасыщенных углеводородных цепей фосфолипидов снижается (из-за плотной упаковки доступ к ненасыщенным двойным связям в хвостах фосфолипидов уменьшается), и их уязвимость к перекисидации существенно уменьшается. Важно, что при этом холестерин не обязательно подвергается окислению сам – он действует как структурный стабилизатор, ограничивая доступ радикалов к липидным хвостам, а не как классический «жертвенный» антиоксидант [332]. Кроме того, Х. Хаделия и соавторы [333] продемонстрировали, что холестерин способен комплементарно связывать или «сорбировать» окисленные фосфолипиды (например, PazePC, POVPC), выводя их из непосредственного окружения неповреждённых липидов и препятствуя дестабилизации бислоя. Такой механизм можно рассматривать как «ремонтный»: он снижает вероятность образования дефектов упаковки и утраты барьерных свойств мембраны даже при накоплении продуктов перекисного окисления липидов.

Второй механизм реализуется при более выраженной нагрузке активными формами кислорода и представляет собой «сакрификационный» режим, в котором холестерин выступает в роли мишени, перехватывая часть окислительного удара и тем самым снижая степень повреждения полиненасыщенных фосфолипидов мембраны. Традиционно в качестве основных мишеней окислительного стресса рассматриваются полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), поскольку наличие в них двойных связей делает их крайне уязвимыми к АФК [334]. Продукты их перекисидации обладают высокой реакционной способностью и способны

инициировать цепные свободнорадикальные процессы, что приводит к лавинообразному повреждению мембран и образованию вторичных токсичных альдегидов [273]. В научной литературе было показано, что в условиях клеточной мембраны холестерин может окисляться даже активнее, чем ПНЖК [335]. Это связано с его высокой концентрацией и локализацией вблизи источников АФК, а также с меньшей доступностью антиоксидантной защиты в этих участках. Таким образом, мембранное окружение играет ключевую роль: оно определяет не только скорость, но и «распределение» мишеней для АФК [335]. Учитывая достаточно высокий исходный процент холестерина в мембранах сперматозоидов, он может выступать не менее уязвимой мишенью для АФК, чем ПНЖК. Принципиально различаются последствия окисления этих двух классов липидов. Если продукты пероксидации ПНЖК запускают цепные радикальные реакции и ведут к лавинообразному повреждению клеточных структур [273], то продукты окисления холестерина (оксистеролы) не поддерживают цепного процесса. Их действие связано преимущественно с изменением свойств мембран и активацией сигнальных каскадов (апоптоз, воспаление), что делает их менее агрессивными как инициаторов окисления, но не менее значимыми в контексте патогенеза [336]. Повышение концентрации холестерина в мембране сперматозоидов может оказывать двоякий эффект: с одной стороны, стабилизировать липидный бислой и снижать скорость цепного окисления ПНЖК, а с другой – приводить к накоплению оксистеролов, обладающих самостоятельным цитотоксическим потенциалом.

Циклодекстрины способны удалять из мембраны не только холестерин, но и продукты его окисления. Так, для гидроксипропил- β -циклодекстрина экспериментально показана усиленная экстракция оксистеролов (например, 7-кетохолестерина) по сравнению с нативным холестерином [337]. Это согласуется с общим принципом: оксистеролы менее гидрофобны, слабее удерживаются в бислое и имеют более быстрый выход, что облегчает их удаление. Для RAMEB прямых сравнительных рядов «оксистерол-холестерин» нами обнаружено не было, но по ядру распознавания (β -ЦД) и повышенной гидрофобности полости ожидать у RAMEB такой же тенденции биофизически обоснованно. Как уже отмечалось ранее, в составе нашего препарата, содержащего комплексы циклодекстрины-холестерин, может сохраняться от 40 до 70 % (при стехиометрии связывания 1:1 или 2:1 соответственно) «пустых» циклодекстринов, не образовавших комплексы с холестерином. В таких условиях возможен конкурентный обмен стеролов: свободный RAMEB извлекает оксистеролы из мембраны, в то время как комплексы RAMEB-CHOL доставляют холестерин в мембрану, поддерживая упорядоченность и барьерные свойства бислоя. Таким образом формируется цикл: структурная стабилизация – окисление холестерина – удаление оксистеролов циклодекстринами – репопуляция бислоя нативным холестерином.

3.11. Анализ кристаллообразования в криопротекторной среде Sperm Freeze после добавления метилированных β -циклодекстринов и их комплексов с холестерином методом рентгеноструктурного анализа

Дисахариды (сахароза, трегалоза) широко применяются в криобиологии в качестве непроникающих крипротекторов. Их действие обусловлено как снижением количества свободной воды в растворе за счёт выраженного гидратационного эффекта, так и увеличением частоты нуклеации кристаллов льда. Включение дисахаридов в криопротекторный раствор, как правило, приводит к уменьшению размера кристаллов льда при одновременном увеличении их количества [338; 339]. Можно предположить, что циклодекстрины, являясь олигомерами глюкозы, способны влиять на структуру окружающей воды и процессы кристаллообразования. Для проверки этой гипотезы был проведён рентгеноструктурный анализ криопротекторной среды SF, содержащей 2, 4 и 8 мг/мл циклодекстринов или комплексов циклодекстрины-холестерин [293].

Оценка средних размеров кристаллов, формирующихся в изучаемых растворах при различных концентрациях RAMEB и RAMEB-CHOL, была проведена с помощью рентгеноструктурного анализа (PETRA III, DESY, Германия). Проведенный рентгеноструктурный анализ показал, что добавление RAMEB и RAMEB-CHOL в криопротекторную среду SF в концентрациях 2–8 мг/мл не оказывает влияния на средний размер образующихся кристаллов льда [293]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что RAMEB и RAMEB-CHOL (в исследованных концентрациях), несмотря на свою углеводную природу, не обладают выраженной способностью влиять на процессы кристаллообразования в условиях криоконсервации (Таблица 7).

Таблица 7 – Средний размер кристаллов, формирующихся в образцах с различной концентрацией RAMEB и RAMEB-CHOL. Для каждого образца оценка среднего размера кристаллов проводилась по 2000 значений

Контроль (1 мл SpermWash + 0,7 мл SF)	RAMEB 2 мг	RAMEB 4 мг	RAMEB 8 мг	RAMEB- CHOL 2 мг	RAMEB- CHOL 4 мг	RAMEB- CHOL 8 мг
14 мкм	15 мкм	14 мкм	14 мкм	15 мкм	15 мкм	14 мкм

Таким образом, выявленные в работе положительные эффекты комплексов циклодекстрины-холестерин, выражающиеся в более высокой посткриогенной подвижности и жизнеспособности сперматозоидов после замораживания и оттаивания, не связаны с ингибированием роста кристаллов внеклеточного льда. Основной механизм их действия заключается в модификации уровня мембранного холестерина сперматозоидов, что приводит к стабилизации бислоя и повышению устойчивости клеток к криоиндуцированным повреждениям.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В диссертационной работе было изучено влияние ряда физико-химических факторов на сохранение функциональной активности сперматозоидов при их криоконсервации. В контексте поставленной задачи методом TUNEL была проведена оценка фрагментации ДНК в нативных образцах и образцах после криоконсервации с использованием криопротекторной среды и без неё. Показано, что в образцах, замороженных без криопротекторной среды, индекс фрагментации ДНК был значительно повышен (~ в 1,9 раз по сравнению с нативным контролем ($p < 0,05$)) уже сразу после размораживания, что можно рассматривать как проявления преимущественно прямого повреждающего воздействия процедур замораживания/оттаивания на ДНК клеток. В противоположность этому, применение криопротекторной среды SF на основе глицерола и сахарозы обеспечивает сохранение процента сперматозоидов с фрагментированной ДНК на уровне, сопоставимом с показателями нативных образцов сразу после размораживания, что подтверждает её эффективность в предотвращении первичных повреждений хроматина.

При инкубации сперматозоидов в течение 24 часов наблюдается увеличение процента сперматозоидов с фрагментированной ДНК во всех исследованных группах (в нативных образцах – в 2,3 раза ($p < 0,05$), в группе с SF – в 3,4 раза ($p < 0,05$), в группе без криопротекторной среды – в 3,6 раз ($p < 0,05$)). Характерно, что в образцах, криоконсервированных с применением криопротекторной среды, скорость роста повреждений ДНК была выше, чем в образцах, замороженных без неё и в нативном контроле. Полученные результаты позволяют предположить, что механизмы формирования отсроченных повреждений различаются. В случае отсутствия криопротекторной среды доминируют прямые повреждения ДНК в момент замораживания и оттаивания с последующей постмортальной деградацией хроматина, тогда как при использовании криопротекторной среды первичные повреждения предотвращаются, но, вероятно, возникают сублетальные повреждения клеточных структур, в частности митохондрий. Последствия таких повреждений проявляются в посткриогенном периоде при возобновлении метаболической активности клеток и могут быть связаны с активацией окислительного стресса. Это обстоятельство подчёркивает целесообразность поиска дополнительных подходов, направленных на снижение уровня посткриогенных повреждений, в том числе за счёт применения антиоксидантных компонентов.

Было показано, что добавление яичного желтка в криопротекторную среду SF позволяет статистически значимо повысить (в среднем на 18,9 %) индекс подвижности сперматозоидов после размораживания. Ранее положительный эффект яичного желтка был описан для многих видов млекопитающих. Важно отметить, что оптимальная концентрация яичного желтка (~ 1,1 %) для криоконсервации сперматозоидов человека оказалась значительно ниже, чем

концентрации (10–20 %), традиционно используемые для криоконсервации спермы других видов млекопитающих, что может быть обусловлено разным процентом проникающих криопротекторов и подчёркивает видоспецифичность сперматозоидов, а также необходимость подбора концентрации яичного желтка для каждого вида. Вместе с тем, использование яичного желтка в качестве компонента криопротекторной среды имеет ряд существенных ограничений: желток не является стерильным, а его состав подвержен значительной вариабельности. В этой связи целесообразным направлением дальнейших исследований является выделение и изучение отдельных компонентов яичного желтка, обладающих криопротекторными свойствами, с целью их последующей стандартизации и использования в составе усовершенствованных криопротекторных сред. Такой подход позволит снизить вариабельность результатов и минимизировать риски контаминации.

В связи с тем, что значительная часть диссертационного исследования была посвящена структурно-функциональной роли холестерина в мембранах сперматозоидов, нами были апробированы четыре метода количественного анализа холестерина для оценки концентрации холестерина в мембранах сперматозоидов. Показано, что метод ИК-спектроскопии непригоден для определения концентрации холестерина в сперматозоидах отдельно взятого пациента или донора спермы, поскольку для данного метода требуется количество анализируемого материала, значительно превышающее объём одного эякулята. Кроме того, оказалось, что концентрация холестерина в мембранах сперматозоидов, определённая данным методом, существенно превышает концентрации холестерина, полученные с использованием других методов и значений, которые приводятся в литературе. Методы Либермана-Бурхарда, ВЭЖХ и ФКД обеспечивают сопоставимые результаты, однако в этом случае также имеются существенные методические трудности. Первые два метода требуют сложной пробоподготовки и использования агрессивных реагентов, что ограничивает их применение в условиях лаборатории ВРТ. Метод ФКД обладает значительными преимуществами для рутинной практики: он менее токсичен и позволяет сократить время анализа (для ФКД полное время анализа занимает менее двух часов). Это определяет его как наиболее рациональный метод для оценки уровня холестерина в мембранах сперматозоидов.

Было показано, что произвольно метилированные β -циклодекстрины (RAMEB) обладают выраженной цитотоксичностью в отношении сперматозоидов человека, что обусловлено экстракцией холестерина из мембран сперматозоидов. Комплексы RAMEB с холестерином обладают значительно менее выраженной цитотоксичностью, поскольку не могут экстрагировать холестерин из мембран сперматозоидов, так как полость молекулы циклодекстрина уже заполнена холестерином.

В связи со сказанным выше о возможной структурно-функциональной роли холестерина в сперматозоидах мы уделили специальное внимание изучению свойств липидных мембран в зависимости от содержания в них холестерина. Влияние обогащения мембран холестерином на свойства липидного бислоя было изучено на примере модельных систем – липосом с разным содержанием холестерина. В качестве индикатора состояния мембран (микровязкость липидного бислоя) использовали липидорастворимый спиновый (парамагнитный) зонд 5-ДС. Показано, что спектр ЭПР молекул зонда, погруженных в мембрану, чувствителен к варьированию содержания холестерина в липосомах. Увеличение концентрации холестерина в липосомах вызывает повышение микровязкости липидного окружения зонда. Полученные нами данные согласуются с гипотезой о том, что холестерин приводит к вытягиванию цепей жирных кислот (снижает вероятность *gauche*-конформации углеводородных цепей) и уменьшает амплитуду вращательного движения ацильных цепей липидов.

Мы также изучили, как удаление холестерина из мембран сперматозоидов с помощью циклодекстринов сказывается на свойствах их мембран. Сопоставление спектров ЭПР молекул 5-ДС в контрольных образцах и в клетках, обработанных RAMEB, позволило сделать вывод, что экстракция холестерина вызывает изменения спектра ЭПР зонда 5-ДС, аналогичные тем, которые можно наблюдать в липосомах с разным содержанием холестерина. Было показано, что удаление холестерина из мембран сперматозоидов с помощью RAMEB увеличивает подвижность спинового зонда 5-ДС, локализованного в мембранах сперматозоидов. При этом микровязкость («текучесть») липидного бислоя после удаления холестерина оказывается ниже, чем в контрольных образцах, содержащих сперматозоиды, не подвергавшиеся воздействию RAMEB. Эти данные хорошо согласуются с предположением о том, что биологическая роль холестерина в мембране сперматозоидов заключается в регулировании микровязкости липидных областей этих мембран.

Обработка сперматозоидов человека комплексами RAMEB-CHOL сопровождается дозозависимым увеличением содержания холестерина в мембранах клеток с выходом на плато. При этом соотношение холестерина к фосфолипидам (Хол/ФЛ) при насыщении достигает значений 3,0–3,6, что существенно превышает показатели, характерные для большинства биомембран. Подобные соотношения встречаются лишь в мембранах отдельных специализированных клеток, например клеток хрусталика глаза. Столь высокое соотношение стоит интерпретировать как перенасыщение мембран холестерином, сопровождающееся формированием доменов чистого холестерина и кристаллов холестерина вне бислоя. Инкубация сперматозоидов человека с комплексом RAMEB-CHOL (2 мг/мл) перед криоконсервацией приводит к статистически значимому повышению индекса подвижности сперматозоидов (в среднем на 14,8 %) и индекса жизнеспособности сперматозоидов (в среднем на 13,8 %) после

размораживания по сравнению с контролем. При этом оказалось, что использование RAMEB-CHOL в концентрации 1 мг/мл не приводит к достоверным изменениям этих показателей, тогда как при 4 мг/мл наблюдается статистически значимое снижение подвижности сперматозоидов, в то время как показатели жизнеспособности остаются сопоставимыми с контрольными значениями.

Известно, что высокое содержание холестерина в мембране препятствует резким структурным («фазовым») переходам липидов бислоя, снижает вероятность термоиндуцированных повреждений и обеспечивает большую структурную устойчивость мембраны в условиях воздействия низких температур [247]. Помимо описанного классического криозащитного механизма, можно выделить ещё как минимум два возможных механизма криопротекторного действия холестерина, которые связаны с процессами окислительного стресса. Первый – структурный: холестерин уплотняет бислой, ограничивает подвижность липидов и диффузию кислорода, снижая доступность углеводородных цепей липидов для АФК. Второй, «сакрификационный», механизм реализуется при высокой нагрузке АФК: в этих условиях холестерин может выступать в роли мишени для АФК, препятствуя инициации цепных свободнорадикальных процессов, приводящих к лавинообразному повреждению мембран.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Криопротекторная среда Sperm Freeze на основе глицерола и сахарозы позволяет снизить (в среднем на 6,5 % по сравнению с контролем) уровень прямых повреждений ДНК сперматозоидов на этапе замораживания/оттаивания. Нарастание фрагментации ДНК в посткриогенном периоде указывает на наличие отсроченных механизмов повреждений, связанных, вероятно, с сублетальными повреждениями клеточных структур сперматозоидов и окислительным стрессом.
2. Включение яичного желтка в криопротекторную среду обеспечивает статистически значимое (в среднем на 18,9 %) повышение индекса подвижности сперматозоидов после криоконсервации. Ограничивающим фактором применения яичного является нестандартизованный состав и риск контаминации.
3. Ферментативно-колориметрическим методом может быть использован для измерения концентрации холестерина в сперматозоидах доноров и пациентов в условиях лаборатории вспомогательных репродуктивных технологий.
4. Случайно метилированные β -циклодекстрины обладают выраженной дозозависимой цитотоксичностью по отношению к сперматозоидам человека, что обусловлено экстракцией мембранного холестерина.
5. С увеличением концентрации случайно метилированных β -циклодекстринов в среде подвижность молекул спинного зонда 5-доксил стеарата в мембранах сперматозоидов увеличивается, что подтверждает гипотезу о том, что удаление холестерина сперматозоидов приводит к уменьшению «жесткости» цитоплазматической мембраны.
6. Обработка сперматозоидов человека комплексами случайно метилированных β -циклодекстринов с холестерином сопровождается дозозависимым увеличением содержания холестерина в мембранах клеток с последующим достижением эффекта насыщения.
7. Инкубация сперматозоидов человека с комплексами случайно метилированных β -циклодекстринов с холестерином (2 мг/мл) перед криоконсервацией приводит к статистически значимому повышению индекса подвижности (в среднем на 14,8 %) и индекса жизнеспособности (в среднем на 13,8 %) сперматозоидов после размораживания.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю глубокую признательность и благодарность Тихонову Александру Николаевичу за чуткое и терпеливое руководство работой, за внимательное отношение и неоценимую поддержку. Выражаю огромную благодарность за большую помощь в работе, включавшую планирование работы, проведение экспериментов и обсуждение результатов, сотрудникам кафедры биофизики физического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова – Симоненко Екатерине Юрьевне, Трубицину Борису Вячеславовичу и Яковенко Сергею Александровичу, сотрудникам кафедры высокомолекулярных соединений химического факультета МГУ – Сыбачину Андрею Владимировичу и Спиридонову Василию Владимировичу, а также старшему научному сотруднику лаборатории молекулярной организации фотосинтетического аппарата ИФПБ РАН – Большакову Максиму Александровичу. Хочу поблагодарить Гармаеву С. Б., Григорьеву А. А., Смоленцеву Д. А. и Афанасьеву С. И. за помощь и участие в проведении экспериментов. Выражаю благодарность руководству клиники «Альтравита» в лице Яковенко С. А. и Апрышко В. П. за любезно предоставленные образцы эякулята доноров спермы и неоценимую помощь в работе. Отдельную признательность выражаю эмбриологам клиники «Альтравита» Кириенко К. В., Егорову А. В. и Ровенских У. И. за конструктивные и плодотворные научные дискуссии..

Особые слова признательности выражаю своей семье и академику РАН Сергею Никифоровичу Пузину – за терпение, понимание и поддержку на всем пути моей работы над диссертацией.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода

БДХ – бислойные домены холестерина

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ВРТ – вспомогательные репродуктивные технологии

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ДМФХ – димиристоилфосфатидилхолин

ДПФХ – дипальмитоилфосфатидилхолин

ЗП – зона пеллюцида

КСЭМ – криосканирующая электронная микроскопия

ЛПНП – липопротеины низкой плотности

НЖК – ненасыщенные жирные кислоты

ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты,

СЛ – соевый лецитин

ТдТ – терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза

ФКД – ферментативно-колориметрическая детекция

Хол/ФЛ – холестерин/фосфолипиды

цАМФ-ПКА – циклическая аденозинмонофосфат – протеинкиназа А

ЦД – циклодекстрин

ЭПР – электронный парамагнитный резонанс

ЯЖ – яичный желток

DAD – диодноматричный спектрофотометрический детектор

DFI – фрагментация ДНК

DPBS – Dulbecco's Phosphate Buffered Saline

HUVEC – human umbilical vein endothelial cells

IC₅₀ – half-maximal inhibitory concentration

LOEC – Lowest Observed Effect Concentration

NOEC – No Observed Effect Concentration

PBS – Phosphate buffered saline

RAMEB – случайно- метилированные β-циклодекстрины

RAMEB-CHOL – комплексы RAMEB с холестерином

SF – Sperm Freeze

TUNEL – Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labeling

Мβ-ЦД – метил-бета-циклодекстрин;

М β -ЦД-Х – комплексы метил-бета-циклодекстринов с холестерином;

СТС – сверхтонкая структура

α -ЦД – α циклодекстрин;

β -ЦД – β циклодекстрин;

γ -CD – γ циклодекстрин;

2 АГ – 2-арахидоноилглицерол

5-ДС – 5-доксил стеарат

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Grin L., Girsh E., Harlev A. Male Fertility Preservation-Methods, Indications and Challenges // *Andrologia*. – 2021. – Vol. 53. – № 2. – e13635.
2. Abram McBride J., Lipshultz L.I. Male Fertility Preservation // *Current Urology Reports*. – 2018. – Vol. 19. – № 7.
3. Rodriguez-Wallberg K. A., Waterstone M., Anastácio A. Ice Age: Cryopreservation in Assisted Reproduction – An Update // *Reproductive Biology*. – 2019. – Vol. 19. – № 2. – Pp. 119–126.
4. Ozimic S., Ban-Frangez H., Stimpfel M. Sperm Cryopreservation Today: Approaches, Efficiency, and Pitfalls // *Current Issues in Molecular Biology*. – 2023. Vol. 45. – № 6. – Pp. 4716–4734.
5. Pariz J. R., Monteiro R. A. C., Hallak J. Long-term Sperm Cryopreservation Does not Affect Post-Thaw Survival Rates // *Jornal Brasileiro de Reproducao Assistida*. SBRA. – 2020. – Vol. 24. – № 1. – Pp. 3–8.
6. Mazur P., Leibo S. P., Chu E. H. Y. A Two-Factor Hypothesis of Freezing Injury. Evidence from Chinese Hamster Tissue-Culture Cells // *Experimental Cell Research*. – 1972. – Vol. 71. – № 2. – Pp. 345–355.
7. John Morris G., Acton E., Murray B. J., Fonseca F. Freezing Injury: The Special Case of the Sperm Cell // *Cryobiology*. – 2012. – Vol. 64 – № 2. – Pp. 71–80.
8. Williams W. P. Cold-Induced Lipid Phase Transitions // *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. – 1990. – Vol. 326. – № 1237. – Pp. 555–570.
9. Quinn P. J. A Lipid-Phase Separation Model of Low-Temperature Damage to Biological Membranes // *Cryobiology*. – 1985. – Vol. 22. – № 2. – Pp. 128–146.
10. Seeger H. M., Bortolotti C. A., Alessandrini A., Facci P. Phase-Transition-Induced Protein Redistribution in Lipid Bilayers // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2009. – Vol. 113. – № 52. – Pp. 16654–16659.
11. Mazur P. Freezing of Living Cells: Mechanisms and Implications // *The American Journal of Physiology*. – 1984. – Vol. 247. – № 3 Pt 1. – Pp. 125–142.
12. Giraud M. N., Motta C., Boucher D., Grizard G. Membrane Fluidity Predicts the Outcome of Cryopreservation of Human Spermatozoa // *Human Reproduction*. – 2000. – Vol. 15. – № 10. – Pp. 2160–2164.
13. Tomás C., Blanch E., Cebrián B., Mocé E. Use of Cholesterol in Sperm Cryopreservation: Present Moment and Perspectives to Future // *Reproduction in Domestic Animals*. – 2010. – Vol. 45. – № SUPPL. 2. – Pp. 57–66.
14. Amstislavsky S., Mokrousova V., Brusentsev E., Okotrub K., Comizzoli P. Influence of Cellular Lipids on Cryopreservation of Mammalian Oocytes and Preimplantation Embryos: A Review // *Biopreservation and Biobanking*. – 2019. – Vol. 17. – № 1. Pp. 76–83.
15. Elliott G. D., Wang S., Fuller B. J. Cryoprotectants: A Review of the Actions and Applications of Cryoprotective Solutes that Modulate Cell Recovery from Ultra-Low Temperatures // *Cryobiology*. – 2017. – Vol. 76. – Pp. 74–91.
16. Hazel J. R. Thermal Adaptation in Biological Membranes: is Homeoviscous Adaptation the Explanation? // *Annual Review of Physiology*. – 1995. – Vol. 57. – Pp. 19–42.

17. Erimban S., Daschakraborty S. Cryostabilization of the Cell Membrane of a Psychrotolerant Bacteria via Homeoviscous Adaptation // *Journal of Physical Chemistry Letters*. – 2020. – Vol. 11. – № 18. – Pp. 7709–7716.
18. Hazel J. R., Eugene Williams E. The Role of Alterations in Membrane Lipid Composition in Enabling Physiological Adaptation of Organisms to their Physical Environment // *Progress in Lipid Research*. – 1990. – Vol. 29. – № 3. – Pp. 167–227.
19. Dong Q., Vandevoort C. A. Effect of Egg Yolk on Cryopreservation of Rhesus Monkey Ejaculated and Epididymal Sperm // *Journal of Andrology*. – 2009. – Vol. 30. – № 3. – Pp. 309–316.
20. Corcini C. D., Goularte K. L., Bongalhardo D. C., Lucia T. Jr., Jardim R. D., Varela Junior A. S. Effect of Egg Yolk Plasma on Dog Sperm Cryopreservation // *Andrologia*. – 2016. – Vol. 48. – № 1. – Pp. 114–115.
21. Bergeron A., Manjunath P. New Insights towards Understanding the Mechanisms of Sperm Protection by Egg Yolk and Milk // *Molecular Reproduction and Development*. – 2006. – Vol. 73. – № 10. – Pp. 1338–1344.
22. Dong Q. X., Rodenburg S. E., Hill D., Vandevoort C. A. The Role of Low-Density Lipoprotein (LDL) and High-Density Lipoprotein (HDL) in Comparison with Whole Egg Yolk for Sperm Cryopreservation in Rhesus Monkeys // *Asian Journal of Andrology*. – 2011. – Vol. 13. – № 3. – Pp. 459–464.
23. Alvarez-Rodríguez M., Alvarez M., Anel-López L., Martínez-Rodríguez C., Martínez-Pastor F., Borragan S., Anel L., and de Paz P. The Antioxidant Effects of Soybean Lecithin- or Low-Density Lipoprotein-Based Extenders for the Cryopreservation of Brown-Bear (*Ursus arctos*) Spermatozoa // *Reproduction, Fertility and Development*. – 2013. – Vol. 25. – № 8. – Pp. 1185–1193.
24. Róg T., Pasenkiewicz-Gierula M. Cholesterol Effects on the Phospholipid Condensation and Packing in the Bilayer: A Molecular Simulation Study // *FEBS Letters*. – 2001. – Vol. 502. – № 1–2. – PpC. 68–71.
25. Yeagle P. L. Cholesterol and the Cell Membrane // *Biochim Biophysica Acta*. – 1985. Vol. 822. – № 3–4. – Pp. 267–287.
26. de Las Mercedes Carro M, Peñalva D. A., Antollini S. S., Hozbor F. A., and Buschiazzi J. Cholesterol and Desmosterol Incorporation into Ram Sperm Membrane before Cryopreservation: Effects on Membrane Biophysical Properties and Sperm Quality // *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*. – 2020. – Vol. 1862. – № 9.
27. Combes G. B., Varner D. D., Schroeder F., Burghardt R. C. and Blanchard T. L. Effect of Cholesterol on the Motility and Plasma Membrane Integrity of Frozen Equine Spermatozoa after Thawing // *Journal of reproduction and fertility. Supplement*. – 2000. Vol. 56. – Pp.127-132.
28. Mocé E., Purdy P. H., Graham J. K. Treating Ram Sperm with Cholesterol-Loaded Cyclodextrins Improves Cryosurvival // *Animal Reproduction Science*. – 2010. – Vol. 118. – № 2–4. Pp. 236–247.
29. Mocé E., Graham J. K. Cholesterol-Loaded Cyclodextrins Added to Fresh Bull Ejaculates Improve Sperm Cryosurvival // *Journal of Animal Science*. – 2006. – Vol. 84. – № 4. – Pp. 826–833.
30. Moore A. I., Squires E. L., Graham J. K. Adding Cholesterol to the Stallion Sperm Plasma Membrane Improves Cryosurvival // *Cryobiology*. – 2005. – Vol. 51. – № 3. – Pp. 241–249.
31. Murphy C., English A. M., Holden S. A., and Fair S. Cholesterol-Loaded-Cyclodextrins Improve the Post-Thaw Quality of Stallion Sperm // *Animal Reproduction Science*. – 2014. – Vol. 145. – № 3–4. – Pp. 123–129.

32. Karlsson J. O. M., Toner M. Long-Term Storage of Tissues by Cryopreservation: Critical Issues // *Biomaterials*. – 1996. – Vol. 17. – № 3. – Pp. 243–256.
33. Fuller B. J. Cryoprotectants: the Essential Antifreezes to Protect Life in the Frozen State // *Cryo Letters*. – 2004. – Vol. 25. – № 6. – Pp. 375–388.
34. Rajan R., Matsumura K. Development and Application of Cryoprotectants // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2018. – Vol. 1081. – Pp. 339–354.
35. Kuwayama M. Highly Efficient Vitrification for Cryopreservation of Human Oocytes and Embryos: The Cryotop Method // *Theriogenology*. – 2007. – Vol. 67. – № 1. – Pp. 73–80.
36. Shaw P. W., Bernard A. G., Fuller B. J., Hunter J. H. and Shaw, R. W. Vitrification of Mouse Oocytes: Improved Rates of Survival, Fertilization, and Development to Blastocysts // *Molecular Reproduction and Development*. – 1991. – Vol. 29. – № 4. – Pp. 373–378.
37. Gao D., Critser J. K. Mechanisms of Cryoinjury in Living Cells // *ILAR Journal*. – 2000. – Vol. 41. – № 4. – Pp. 187–196.
38. Hai E., Li B., Zhang J. and Zhang J. Sperm freezing Damage: the Role of Regulated Cell Death // *Cell Death Discovery*. – 2024. – Vol. 10. – № 1. – Pp. 239.
39. Henry M. A., Noiles E. E., Gao D., Mazur P., and Critser J. K. Cryopreservation of Human Spermatozoa. IV. The Effects of Cooling Rate and Warming Rate on the Maintenance of Motility, Plasma Membrane Integrity, and Mitochondrial Function // *Fertility and Sterility*. – 1993. – Vol. 60. – № 5. – Pp. 911–918.
40. Zhao G., Luo D., Gao D. Universal Model for Intracellular Ice Formation and its Growth // *AIChE Journal*. – 2006. – Vol. 52. – № 7. – Pp. 2596–2606.
41. Noiles E. E., Mazur P., Watson P. F., Kleinhans F. W. and Critser J. K. Determination of Water Permeability Coefficient for Human Spermatozoa and its Activation Energy // *Biology of Reproduction*. – 1993. – Vol. 48. – № 1. – Pp. 99–109.
42. Curry M. R., Millar J. D., Watson P. F. Calculated Optimal Cooling Rates for Ram and Human Sperm Cryopreservation Fail to Conform with Empirical Observations // *Biology of Reproduction*. – 1994. – Vol. 51. – № 5. – Pp. 1014–1021.
43. Morris G. J. Rapidly Cooled Human Sperm: No Evidence of Intracellular Ice Formation // *Human Reproduction*. – 2006. – Vol. 21. – № 8. – Pp. 2075–2083.
44. Hammerstedt R. H., Graham J. K., Nolan J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive // *Journal of andrology*. – 1990. – Vol 11. – № 1. – Pp.73–88.
45. Curry M. R., Millar J. D., Tamuli S. M. and Watson P. F. Surface Area and Volume Measurements for Ram and Human Spermatozoa // *Biology of Reproduction*. – 1996. – Vol. 55. – № 6. – Pp. 1325–1332.
46. Morris G. J. A New Development in the Cryopreservation of Sperm // *Human Fertility*. – 2002. – Vol. 5. – № 1. – C. 23–29.
47. Watson P. F., Kunze E., Cramer P. and Hammerstedt R. H. A Comparison of Critical Osmolality and Hydraulic Conductivity and Its Activation Energy in Fowl and Bull Spermatozoa // *Journal of Andrology*. – 1992. – Vol. 13. – № 2. – Pp. 131–138.
48. Hunter J. E., Bernard A., Fuller B. J., McGrath J. J. and Shaw R. W. Plasma Membrane Water Permeabilities of Human Oocytes: the Temperature Dependence of Water Movement in Individual Cells // *Journal of Cellular Physiology*. – 1992. – Vol. 150. – № 1. – Pp. 175–179.

49. Mazur P. Principles of Cryobiology. In: Fuller B. J., Lane N. and Benson E. E. (eds.) *Life in the Frozen State*, CRC Press, Boca Raton, 2004. Pp. 3–65.
50. Santiani A., Juárez J., Allauca P., Roman B., Ugarelli A. and Evangelista-Vargas S. Cryopreservation Effect on Sperm Viability, Mitochondrial Membrane Potential, Acrosome Integrity and Sperm Capacitation of Alpaca Spermatozoa Detected by Imaging Flow Cytometry // *Reproduction in Domestic Animals*. 2023. – Vol. 58. – № 4. – Pp. 560–563.
51. Arjun V., Kumar P., Dutt R., Kumar A., Bala R., Verma N. and Yadav P. S. Effect of Mitochondria-Targeted Antioxidant on the Regulation of the Mitochondrial Function of Sperm During Cryopreservation // *Andrologia*. – 2022. – Vol. 54. – № 7.
52. Devireddy R. V., Swanlund D. J., Olin T., Vincente W., Troedsson M. H., Bischof J. C. and Roberts K. P. Cryopreservation of Equine Sperm: Optimal Cooling Rates in the Presence and Absence of Cryoprotective Agents Determined Using Differential Scanning Calorimetry // *Biology of Reproduction*. – 2002. – Vol. 66, – № 1. – Pp. 222–231.
53. Akhoondi M., Oldenhof H., Stoll C., Sieme H. and Wolkers W. F. Membrane Hydraulic Permeability Changes During Cooling of Mammalian Cells // *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*. – 2011. – Vol. 1808. – № 3. – Pp. 642–648.
54. Brindley D. N., Abousalham A., Kikuchi Y., Wang C. N. and Waggoner D. W. "Cross talk" Between the Bioactive Glycerolipids and Sphingolipids in Signal Transduction // *Biochemistry and Cell Biology*. – 1996. – Vol. 74. – № 4. – Pp. 469–476.
55. Van Meer G., Voelker D. R., Feigenson G. W. Membrane Lipids: Where they are and How they Behave // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2008. – Vol. 9. – № 2. – Pp. 112–124.
56. Vance D. E., Vance J. E. (eds) *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins, and Membranes*. Elsevier, 1991.
57. Exton J. H. Phosphatidylcholine Breakdown and Signal Transduction // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) / Lipids and Lipid Metabolism*. – 1994. – Vol. 1212. – № 1. – Pp. 26–42.
58. Huwiler A., Kolter T., Pfeilschifter J. and Sandhoff K. Physiology and Pathophysiology of Sphingolipid Metabolism and Signaling // *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular and Cell Biology of Lipids*. – 2000. – Vol. 1485. – № 2–3. – Pp. 63–99.
59. Hannun Y. A. *Sphingolipid-Mediated Signal Transduction*. – Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1997.
60. Linardic C. M., Hannun Y. A. Identification of a Distinct Pool of Sphingomyelin Involved in the Sphingomyelin Cycle // *The Journal of biological chemistry*. – 1994. – Vol. 269. – № 38. – Pp. 23530–23537.
61. Levade T., Andrieu-Abadie N., Ségui B., Augé N., Chatelut M., Jaffrézou J. P. and Salvayre R. Sphingomyelin-Degrading Pathways in Human Cells: Role in Cell Signalling // *Chemistry and Physics of Lipids*. – 1999. – Vol. 102. – № 1–2. – Pp. 167–178.
62. Perry D. K., Hannun Y. A. The Role of Ceramide in Cell Signaling // *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular and Cell Biology of Lipids*. – 1998. Vol. 1436. – № 1–2. – Pp. 233–243.
63. Zhang Y., Mattjus P., Schmid P. C., Dong Z., Zhong S., Ma W. Y., Brown R. E., Bode A. M., Schmid H. H. and Dong, Z. Involvement of the Acid Sphingomyelinase Pathway in Uva-Induced Apoptosis // *Journal of Biological Chemistry*. – 2001. – Vol. 276. – № 15. – Pp. 11775–11782.
64. Brown R. E. Sphingolipid Organization in Biomembranes: What Physical Studies of Model Membranes Reveal // *Journal of Cell Science*. – 1998. – Vol. 111. – № 1. – Pp. 1–9.

65. Koval M., Pagano R. E. Intracellular Transport and Metabolism of Sphingomyelin // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) / Lipids and Lipid Metabolism*. – 1991. – Vol. 1082. – № 2. – Pp. 113–125.
66. Van Meer G., Holthuis J. C. Sphingolipid Transport in Eukaryotic Cells // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids*. – 2000. – Vol. 1486. – № 1. – Pp. 145–170.
67. Lange Y., Swaisgood M. H., Ramos B. V. and Steck T. L. Plasma Membranes Contain Half the Phospholipid and 90 % of the Cholesterol and Sphingomyelin in Cultured Human Fibroblasts // *Journal of Biological Chemistry*. – 1989. – Vol. 264. – № 7. – Pp. 3786–3793.
68. Verkleij A. J., Zwaal R. F., Roelofsen B., Comfurius P., Kastelijn D. and van Deenen L. L. The Asymmetric Distribution of Phospholipids in the Human Red Cell Membrane. A Combined Study Using Phospholipases and Freeze-Etch Electron Microscopy // *BBA – Biomembranes*. – 1973. – Vol. 323. – № 2. – Pp. 178–193.
69. Rawyler A. J., Roelofsen B., Den Kamp J. O. and Van Deenen L. L. M. Isolation and Characterization of Plasma Membranes from Friend Erythroleukaemic Cells. A Study with Sphingomyelinase C // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. – 1983. – Vol. 730. – № 1. – Pp. 130–138.
70. Barenholz Y., Thompson T. E. Sphingomyelins in Bilayers and Biological Membranes // *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*. – 1980. – Vol. 604. – № 2. – Pp. 129–158.
71. Ramstedt B., Leppimäki P., Axberg M. and Slotte J. P. Analysis of Natural and Synthetic Sphingomyelins Using High-Performance Thin-Layer Chromatography // *European Journal of Biochemistry*. – 1999. – Vol. 266. – № 3. – Pp. 997–1002.
72. Clejan S. Analysis of Molecular Species of Cellular Sphingomyelins and Ceramides // *Methods in Molecular Biology*. – 1998. – Vol. 105. – Pp. 275–285.
73. Yechiel E., Barenholz Y., Henis Y. I. Lateral Mobility and Organization of Phospholipids and Proteins in Rat Myocyte Membranes. Effects of Aging and Manipulation of Lipid Composition // *The Journal of biological chemistry*. – 1985. – Vol. 260. – № 16. – Pp. 9132–9136.
74. Haest C. W. M. Interactions Between Membrane Skeleton Proteins and the Intrinsic Domain of the Erythrocyte Membrane // *BBA – Reviews on Biomembranes*. – 1982. – Vol. 694. – № 4. – Pp. 331–352.
75. Bevers E. M., Comfurius P., Dekkers D. W. and Zwaal R. F. Lipid Translocation Across the Plasma Membrane of Mammalian Cells // *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular and Cell Biology of Lipids*. – 1999. – Vol. 1439. – № 3. – Pp. 317–330.
76. Daleke D. L., Lyles J. V. Identification and Purification of Aminophospholipid Flippases // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids*. – 2000. – Vol. 1486. – № 1. – Pp. 108–127.
77. Yeagle P. *Biology of cholesterol*. Boca Raton, Fla: CRC Press, 1988. – 242 p.
78. Finegold L. X. *Cholesterol in Membrane Models*. CRC Press, 1992. – 298 p.
79. Hannich J. T., Umebayashi K., Riezman H. Distribution and Functions of Sterols and Sphingolipids // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2011. – Vol. 3. – № 5. – Pp. 1–14.
80. Bretscher M. S., Munro S. Cholesterol and the Golgi Apparatus // *Science*. – 1993. – Vol. 261. – № 5126. – Pp. 1280–1281.
81. Schroeder F., Frolov A. A., Murphy E. J., Atshaves B. P., Jefferson J. R., Pu L. and Kier A. B. Recent Advances in Membrane Cholesterol Domain Dynamics and Intracellular Cholesterol Trafficking

- // Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. – 1996. – Vol. 213. – № 2. – Pp. 150–177.
82. Spector A. A., Yorek M. A. Membrane Lipid Composition and Cellular Function // Journal of lipid research. – 1985. – Vol. 26. – № 9. – Pp. 1015–1035.
 83. Shinitzky M., Barenholz Y. Fluidity Parameters of Lipid Regions Determined by Fluorescence Polarization // Biochim Biophys Acta. – 1978. – Vol. 515. – № 4. – Pp. 367–394.
 84. Mainali L., Raguz M., Subczynski W. K. Formation of Cholesterol Bilayer Domains Precedes Formation of Cholesterol Crystals in Cholesterol/Dimyristoylphosphatidylcholine Membranes: EPR and DSC Studies // Journal of Physical Chemistry B. – 2013. – Vol. 117. – № 30. – Pp. 8994–9003.
 85. Raguz M., Mainali L., Widomska J. and Subczynski W. K. Using Spin-Label Electron Paramagnetic Resonance (EPR) to Discriminate and Characterize the Cholesterol Bilayer Domain // Chemistry and Physics of Lipids. Chem Phys Lipids, 2011. T. 164, № 8. C. 819–829.
 86. Li L.K., So L., Spector A. Age-dependent Changes in the Distribution and Concentration of Human Lens Cholesterol and Phospholipids // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) / Lipids and Lipid Metabolism. – 1987. – Vol. 917. – № 1. – Pp. 112–120.
 87. Truscott R. J. W. Age-Related Nuclear Cataract: A Lens Transport Problem // Ophthalmic Research. – 2000. – Vol. 32. – № 5. – Pp. 185–194.
 88. Li L. K., So L., Spector A. Membrane Cholesterol and Phospholipid in Consecutive Concentric Sections of Human Lenses // Journal of lipid research. – 1985. – Vol. 26. – № 5. – Pp. 600–609.
 89. Mason R. P., Jacob R. F. Membrane Microdomains and Vascular Biology: Emerging Role in Atherogenesis // Circulation. – 2003. – Vol. 107. № 17. – Pp. 2270–2273.
 90. Mason R. P., Tulenko T. N., Jacob R. F. Direct Evidence for Cholesterol Crystalline Domains in Biological Membranes: Role in Human Pathobiology // Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes. – 2003. – Vol. 1610. – № 2. – Pp. 198–207.
 91. Jacob R. F., Cenedella R. J., Mason R. P. Direct Evidence for Immiscible Cholesterol Domains in Human Ocular Lens Fiber Cell Plasma Membranes // The Journal of biological chemistry. – 1999. – Vol. 274. – № 44. – Pp. 31613–31618.
 92. Marquardt D., Kučerka N., Wassall S. R., Harroun T. A. and Katsaras J. Cholesterol's Location in Lipid Bilayers // Chemistry and Physics of Lipids. – 2016. – Vol. 199. – Pp. 17–25.
 93. Rose I. A., Hanson K. R., Wilkinson K. D. and Wimmer M. J. A Suggestion for Naming Faces of Ring Compounds // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 1980. – Vol. 77. – № 5. – Pp. 2439–2441.
 94. Fantini J., Barrantes F.J. How Cholesterol Interacts with Membrane Proteins: an Exploration of Cholesterol-Binding Sites Including CRAC, CARC, and Tilted Domains // Frontiers in Physiology. – 2013. – Vol. 4. – C. 31.
 95. Subczynski W. K., Pasenkiewicz-Gierula M., Widomska J., Mainali L. and Raguz M. High Cholesterol/Low Cholesterol: Effects in Biological Membranes: A Review // Cell Biochemistry and Biophysics. – 2017. – Vol. 75. – № 3–4. – Pp. 369–385.
 96. Kessel A., Ben-Tal N., May S. Interactions of cholesterol with lipid bilayers: The Preferred Configuration and Fluctuations // Biophysical Journal. – 2001. – Vol. 81. – № 2. – Pp. 643–658.
 97. Harroun T.A., Katsaras J., Wassall S. R. Cholesterol is Found to Reside in the Center of a Polyunsaturated Lipid Membrane // Biochemistry. – 2008. – Vol. 47. – № 27. – Vol. 7090–7096.

98. Léonard A., Escribe C., Laguerre M., Pebay-Peyroula E., Néri W., Pott T. and Dufourc E. J. Location of Cholesterol in DMPC Membranes. A Comparative Study by Neutron Diffraction and Molecular Mechanics Simulation // *Langmuir*. – 2001. – Vol. 17. – № 6. – Pp. 2019–2030.
99. De Bernard L. Molecular Associations Between Lipids. II. Lecithin and Cholesterol // *Bull Soc Chim Biol (Paris)*. – 1958. – Vol. 40. – № 1. – Pp. 161–170.
100. Leathes J. B. Condensing Effect of Cholesterol on Monolayers // *Lancet*. – 1925. – Vol. 208. – Pp. 853–856.
101. Marsh D., Smith I.C.P. An Interacting Spin Label Study of the Fluidizing and Condensing Effects of Cholesterol on Lecithin Bilayers // *BBA – Biomembranes*. – 1973. – Vol. 298. – № 2. – Pp. 133–144.
102. Schreier-Muccillo S., Butler K. W., Smith I. C. P. Structural Requirements for the Formation of Ordered Lipid Multibilayers – A Spin Probe Study // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1973. – Vol. 159. – № 1. – Pp. 297–311.
103. Butler K. W., Smith I. C. P., Schneider H. Sterol Structure and Ordering Effects in Spin-Labelled Phospholipid Multibilayer Structures // *BBA – Biomembranes*. – 1970. – Vol. 219. – № 2. – Pp. 514–517.
104. Boggs J. M., Hsia J. C. Structural Characteristics of Hydrated Glycerol and Sphingo Lipids. A Spin Label Study // *Canadian Journal of Biochemistry*. – 1973. Vol. 51. – № 11. – Pp. 1451–1459.
105. Marsh D. Electron Spin Resonance: Spin Labels // *Membrane Spectroscopy*. – 1981. – Vol. 31. – Pp. 51–142.
106. Devaux P. F. ESR and NMR Studies of Lipid-Protein Interactions in Membranes // *Biological Magnetic Resonance*. – 1983. – Pp. 183–299.
107. Schreier S., Polnaszek C. F., Smith I. C. Spin Labels in Membranes. Problems in Practice // *Biochim Biophys Acta*. – 1978. – Vol. 515. – № 4. – Pp. 395–436.
108. Róg T., Pasenkiewicz-Gierula M. Cholesterol Effects on the phosphatidylcholine Bilayer Nonpolar Region: a Molecular Simulation Study // *Biophysical journal*. – 2001. – Vol. 81. – № 4. – Pp. 2190–2202.
109. Mainali L., Feix J. B., Hyde J. S. and Subczynski W. K. Membrane Fluidity Profiles as Deduced by Saturation-Recovery EPR Measurements of Spin-Lattice Relaxation Times of Spin Labels // *Journal of Magnetic Resonance*. – 2011. – Vol. 212. – № 2. – Pp. 418–425.
110. Róg T., Pasenkiewicz-Gierula M., Vattulainen I. and Karttunen M. What Happens if Cholesterol is Made Smoother: Importance of Methyl Substituents in Cholesterol Ring Structure on Phosphatidylcholine-Sterol Interaction // *Biophysical Journal*. – 2007. – Vol. 92. – № 10. – Pp. 3346–3357.
111. Róg T., Pasenkiewicz-Gierula M. Non-Polar Interactions between Cholesterol and Phospholipids: a Molecular Dynamics Simulation Study // *Biophysical chemistry*. – 2004. – Vol. 107. – № 2. – Pp. 151–164.
112. Róg T., Pasenkiewicz-Gierula M. Cholesterol Effects on the Phospholipid Condensation and Packing in the Bilayer: a Molecular Simulation Study // *FEBS letters*. – 2001. – Vol. 502. – № 1–2. – Pp. 68–71.
113. Griffith O. H., Dehlinger P. J., Van S. P. Shape of the Hydrophobic Barrier of Phospholipid Bilayers (Evidence for Water Penetration in Biological Membranes) // *The Journal of Membrane Biology*. – 1974. – Vol. 15. – № 1. – Pp. 159–192.

114. Griffith O. H., Jost P. C. Lipid spin labels in biological membranes // Spin labeling. – 1976. – Pp 453-523.
115. Subczynski W. K., Wisniewska A., Yin J. J., Hyde J. S., Kusumi A. Hydrophobic Barriers of Lipid Bilayer Membranes Formed by Reduction of Water Penetration by Alkyl Chain Unsaturation and Cholesterol // Biochemistry. – 1994. – Vol. 33. – № 24. – Pp. 7670–7681.
116. Wisniewska A., Subczynski W. K. Effects of Polar Carotenoids on the Shape of the Hydrophobic Barrier of Phospholipid Bilayers // Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes. – 1998. – Vol. 1368. – № 2. – Pp. 235–246.
117. Chapman D. The Effect of Heat on Membranes and Membrane Constituents // Thermobiology. – 1967. – Pp. 123–146.
118. Ipsen J. H., Jørgensen K., Mouritsen O. G. Density fluctuations in saturated phospholipid bilayers increase as the acyl-chain length decreases // Biophysical journal. Elsevier. – 1990. – Vol. – 58. – № 5. – Pp. 1099–1107.
119. Heimburg T. Mechanical aspects of membrane thermodynamics. Estimation of the mechanical properties of lipid membranes close to the chain melting transition from calorimetry // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes. – 1998. – Vol. – 1415. – № 1. – Pp. 147–162.
120. Singer S. J., Nicolson G. L. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes: Cell membranes are viewed as two-dimensional solutions of oriented globular proteins and lipids // Science. – 1972. – Vol. – 175. – № 4023. – Pp. 720–731.
121. Lentz B. R. Membrane "fluidity" as detected by diphenylhexatriene probes // Chemistry and Physics of Lipids. – 1989. – Vol. 50. – № 3–4. – Pp. 171–190.
122. Cevc G., Marsh D. Phospholipid bilayers: physical principles and models // Wiley-Interscience. – 1987. – Vol. 5.
123. Mabrey S., Sturtevant J.M. Investigation of Phase Transitions of Lipids and Lipid Mixtures by Sensitivity Differential Scanning Calorimetry // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1976. – Vol. 73. – № 11. – Pp. 3862–3866.
124. Marsh D. Handbook of Lipid Bilayers // CRC press. – 2013.
125. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Walter P. The lipid bilayer // Molecular Biology of the Cell. – 2002.
126. Lee T. H., Charchar P., Separovic F., Reid G. E., Yarovsky I. and Aguilar M. I. The Intricate Link Between Membrane Lipid Structure and Composition and Membrane Structural Properties in Bacterial Membranes // Chemical Science. – 2024. – Vol. 15. – № 10. – Pp. 3408–3427.
127. Róg T., Murzyn K., Gurbiel R., Takaoka Y., Kusumi A. and Pasenkiewicz-Gierula M. Effects of phospholipid unsaturation on the bilayer nonpolar region: a molecular simulation study // Journal of Lipid Research. – 2004. Vol. 45. – № 2. – Pp. 326–336.
128. Ballweg S., Sezgin E., Doktorova M., Covino R., Reinhard J., Wunnicke D. and Ernst R. Regulation of Lipid Saturation Without Sensing Membrane Fluidity // Nature Communications. – 2020. – Vol. 11. – Pp. 756.
129. Wu G., Baumeister R., Heimbucher T. Molecular Mechanisms of Lipid-Based Metabolic Adaptation Strategies in Response to Cold // Cells. – 2023. – Vol. 12. – № 10. – Pp. 1353.
130. Chapman D., Williams R. M., Ladbroke B. Physical Studies of Phospholipids. VI. Thermotropic and Lyotropic Mesomorphism of Some 1, 2-diacyl-phosphatidylcholines (lecithins) // Chemistry and Physics of Lipids. – 1967. – Vol. 1. – № 5. – Pp. 445–475.

131. Seelig A., Seelig J. Dynamic Structure of Fatty Acyl Chains in a Phospholipid Bilayer Measured by Deuterium Magnetic Resonance // *Biochemistry*. – 1974. – Vol. 13. – № 23. – Pp. 4839–4845.
132. Tardieu A., Luzzati V., Reman F.C. Structure and Polymorphism of the Hydrocarbon Chains of Lipids: a Study of Lecithin-Water Phases // *Journal of Molecular Biology*. – 1973. – Vol. 75. – № 4. – Pp. 711–733.
133. Janiak M. J., Small D.M., Shipley G.G. Nature of the Thermal Pretransition of Synthetic Phospholipids: Dimyristoyl- and Dipalmitoyllecithin // *Biochemistry*. – 1976. – Vol. 15. – № 21. – Pp. 4575–4580.
134. Nagle J. F., Tristram-Nagle S. Structure of Lipid Bilayers // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*. – 2000. – Vol. 1469. – № 3. – Pp. 159–195.
135. Sinensky M. Homeoviscous Adaptation – A Homeostatic Process that Regulates the Viscosity of Membrane Lipids in *Escherichia coli* // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1974. – Vol. 71. – № 2. – Pp. 522–525.
136. Cossins A. R., Prosser C. L. Evolutionary Adaptation of Membranes to Temperature // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1978. – Vol. 75. – № 4. – Pp. 2040–2043.
137. Bloom M., Evans E., Mouritsen O.G. Physical Properties of the Fluid Lipid-Bilayer Component of Cell Membranes: a Perspective // *Quarterly Reviews of Biophysics*. – 1991. – Vol. 24. – № 3. – Pp. 293–397.
138. Lee A. G. How Lipids Affect the Activities of Integral Membrane Proteins // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. – 2004. – Vol. 1666. – № 1–2. – Pp. 62–87.
139. Demel R. A., De Kruyff B. The Function of Sterols in Membranes // *Biochimica Et Biophysica Acta*. – 1976. – Vol. 457. – № 2. – Pp. 109–132.
140. Vist M. R., Davis J. H. Phase Equilibria of Cholesterol/Dipalmitoylphosphatidylcholine Mixtures: Deuterium Nuclear Magnetic Resonance and Differential Scanning Calorimetry // *Biochemistry*. – 1990. – Vol. 29. – № 2. – Pp. 451–464.
141. Ipsen J. H., Karlström G., Mouritsen O. G., Wennerström H. and Zuckermann M. J. Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. – 1987. – Vol. 905. – № 1. – Pp. 162–172.
142. Ipsen J. H., Mouritsen O. G., Bloom M. Relationships Between Lipid Membrane Area, Hydrophobic Thickness, and Acyl-chain Orientational Order. The Effects of Cholesterol // *Biophysical Journal*. – 1990. – Vol. 57. – № 3. – Pp. 405–412.
143. Simons K., Ikonen E. Functional Rafts in Cell Membranes // *Nature*. – 1997. – Vol. 387. – № 6633. – Pp. 569–572.
144. Brown D. A., London E. Functions of Lipid Rafts in Biological Membranes // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* – 1998. – Vol. 14. – № 1. – Pp. 111–136.
145. Lingwood D., Simons K. Lipid Rafts as a Membrane-Organizing Principle // *Science*. – 2010. – Vol. 327. – № 5961. – Pp. 46–50.
146. Luchini A., Vitiello G. Mimicking the Mammalian Plasma Membrane: An Overview of Lipid Membrane Models for Biophysical Studies // *Biomimetics*. – 2020. – Vol. 6. – № 1. – Pp. 3.
147. Redondo-Morata L., Giannotti M. I., Sanz F. Influence of Cholesterol on the Phase Transition of Lipid Bilayers: A Temperature-Controlled Force Spectroscopy Study // *Langmuir*. – 2012. – Vol. 28. – № 35. – Pp. 12851–12860.

148. Sankaram M. B., Thompson T. E. Interaction of Cholesterol with Various Glycerophospholipids and Sphingomyelin // *Biochemistry*. – 1990. – Vol. 29 – № 47. – Pp. 10670–10675.
149. Sankaram M. B., Thompson T. E. Cholesterol-induced Fluid-Phase Immiscibility in Membranes. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1991. – Vol. – 88. – № 19. – Pp. 8686–8690.
150. Mainali L., Raguz M., Subczynski W. K. Formation of Cholesterol Bilayer Domains Precedes Formation of Cholesterol Crystals in Cholesterol/Dimyristoylphosphatidylcholine Membranes: EPR and DSC Studies // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2013. – Vol. 117. – № 30. – Pp. 8994–9003.
151. McMullen T. P., McElhaney R. N. New Aspects of the interaction of Cholesterol with Dipalmitoylphosphatidylcholine Bilayers as Revealed by High-Sensitivity Differential Scanning Calorimetry // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. – 1995. – Vol. 1234. – № 1. – Pp. 90–98.
152. McMullen T. P., McElhaney R. N. Physical Studies of Cholesterol-phospholipid Interactions // *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. – 1996. – Vol. 1. – № 1. – Pp. 83–90.
153. Gautier C., Aurich C. “Fine Feathers Make Fine Birds” – The Mammalian Sperm Plasma Membrane Lipid Composition and Effects on Assisted Reproduction // *Animal Reproduction Science*. – 2022. – Vol. 246. – Pp. 106884.
154. Shan S., Xu F., Hirschfeld M. and Brenig B. Sperm Lipid Markers of Male Fertility in Mammals // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22. – № 16. – Pp. 8767.
155. Yanagimachi R. Fertility of Mammalian Spermatozoa: its Development and Relativity // *Zygote*. – 1994. – Vol. 2. – № 4. – Pp. 371–372.
156. Tapia J. A., Macias-Garcia B., Miro-Moran A., Ortega-Ferrusola C., Salido G. M., Pena F. J. and Aparicio I. M. The Membrane of the Mammalian Spermatozoa: Much More Than an Inert Envelope // *Reproduction of Domestic Animals*. – 2012. – Vol. 47. – № 3. – Pp. 65–75.
157. Henkel R. R. Leukocytes and Oxidative Stress: Dilemma for Sperm Function and Male Fertility // *Asian Journal of Andrology*. – 2010. – Vol. 13. – № 1. – Pp. 43.
158. Furland N. E., Oresti G. M., Antollini S. S., Venturino A., Maldonado E. N. and Aveladano M. I. Very Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids are the Major Acyl Groups of Sphingomyelins and Ceramides in the Head of Mammalian Spermatozoa // *Journal of Biological Chemistry*. – 2007. – Vol. 282. – № 25. – Pp. 18151–18161.
159. Furland N. E., Oresti G. M., Antollini S. S., Venturino A., Maldonado E. N. and Aveladano M. I. Very Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids Are the Major Acyl Groups of Sphingomyelins and Ceramides Located in the Head of Bull and Rat Spermatozoa // *American Society for Biochemistry and Molecular Biology*. – 2007. – Vol. 282. № 25. – Pp. 18151–18161.
160. Oresti G. M., Luquez J. M., Furland N. E., & Aveladano M. I. Uneven Distribution of Ceramides, Sphingomyelins and Glycerophospholipids Between Heads and Tails of Rat Spermatozoa // *Lipids*. – 2011. – Vol. 46. – № 12. – Pp. 1081–1090.
161. Aitken R. J., Jones K. T., Robertson S. A. Reactive Oxygen Species and Sperm Function – In Sickness and In Health // *Journal of Andrology*. – 2012. – Vol. 33. – № 6. – Pp. 1096–1106.
162. Sandhoff K., Kolter T. Biosynthesis and Degradation of Mammalian Glycosphingolipids // *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. – 2003. – Vol. 358. – № 1433. – Pp. 847–861.
163. Di Nisio A., De Toni L., Sabovic I., Vignoli A., Tenori L., Dall’Acqua S. et. al. Lipidomic Profile of Human Sperm Membrane Identifies a Clustering of Lipids Associated with Semen Quality and Function // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 25. – № 1. – Pp. 297.

164. Gadella B. M., Lopes-Cardozo M., Golde L. V., Colenbrander B. and Gadella Jr. T. W. J. Glycolipid Migration from the Apical to the Equatorial Subdomains of the Sperm Head Plasma Membrane Precedes the Acrosome Reaction: Evidence for a Primary Capacitation Event in Boar Spermatozoa // *Journal of Cell Science*. – 1995. – Vol. 108. – № 3. – Pp. 935–946.
165. Lee S. G., Vahdati L., Morelli L., Panza L., Compostella F. and Tanphaichitr N. A Short-Chain Analogue of Seminolipid: Synthesis and Inhibitory Effect on Mouse Fertilization // *Pharmaceuticals*. – 2025. – Vol. 18. – № 5. – Pp. 611.
166. Sanocka D., Kurpisz M. Reactive Oxygen Species and Sperm Cells // *Reproductive Biology Endocrinology*. – 2004. – Vol. 2. – № 1. – Pp. 12.
167. Zalata A., Hassan A., Christophe A., Comhaire F., and Mostafa T. Cholesterol and Desmosterol in Two Sperm Populations Separated on Sil-Select Gradient // *International Journal of Andrology*. – 2010. – Vol. 33. – № 3. – Pp. 528–535.
168. Zalata A. A., Christophe A. B., Depuydt C. E., Schoonjans F. and Comhaire F. H. White Blood Cells Cause Oxidative Damage to the Fatty Acid Composition of Phospholipids of Human Spermatozoa // *International Journal of Andrology*. – 1998. – Vol. 21. – № 3. – Pp. 154–162.
169. Zalata A. A., Christophe A. B., Depuydt C. E., Schoonjans F. and Comhaire F. H. The Fatty Acid Composition of Phospholipids of Spermatozoa from Infertile Patients. // *Molecular Human Reproduction*. – 1998. – Vol. 4. – № 2. – Pp. 111–118.
170. Yeagle P.L. Modulation of Membrane Function by Cholesterol // *Biochimie*. – 1991. – Vol. 73. – № 10. – Pp. 1303–1310.
171. Jafurulla Md., Chattopadhyay A. Structural Stringency of Cholesterol for Membrane Protein Function Utilizing Stereoisomers as Novel Tools: A Review // *Cholesterol Homeostasis*. – 2017. – Vol. 1583. – Pp. 21–39.
172. Grouleff J., Irudayam S. J., Skeby K. K. and Schiøtt B. The Influence of Cholesterol on Membrane Protein Structure, Function, And Dynamics Studied by Molecular Dynamics Simulations // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. – 2015. – Vol. 1848. – № 9. – Pp. 1783–1795.
173. Epand R. M. Role of Membrane Lipids in Modulating the Activity of Membrane-Bound Enzymes // *The Structure of Biological Membranes*. 2005. Pp. 499.
174. Reichow S. L., Gonen T. Lipid–protein Interactions Probed by Electron Crystallography // *Current Opinion in Structural Biology*. – 2009. – Vol. 19. – № 5. – Pp. 560–565.
175. Tong J., Briggs M. M., McIntosh T.J. Water Permeability of Aquaporin-4 Channel Depends on Bilayer Composition, Thickness, And Elasticity // *Biophysical journal*. – 2012. – Vol. 103. – № 9. – Pp. 1899–1908.
176. Tong J., Canty J. T., Briggs M. M. and McIntosh T. J. The Water Permeability of Lens Aquaporin-0 Depends on its Lipid Bilayer Environment // *Experimental Eye Research*. – 2013. – Vol. 113. – Pp. 32–40.
177. Fantini J., Epand R.M., Barrantes F.J. Cholesterol-Recognition Motifs in Membrane Proteins // *Direct Mechanisms in Cholesterol Modulation of Protein Function*. – 2019. – Vol. 1135. – Pp. 3–25.
178. Fantini J., Di Scala C., Baier C. J. and Barrantes F. J. Molecular Mechanisms of Protein-Cholesterol Interactions in Plasma Membranes: Functional Distinction Between Topological (Tilted) And Consensus (CARC/CRAC) Domains // *Chemistry and physics of lipids*. – 2016. – Vol. 199. – Pp. 52–60.
179. Phillips M. C. Molecular Mechanisms of Cellular Cholesterol Efflux // *Journal of Biological Chemistry*. – 2014. – Vol. 289. – № 35. – Pp. 24020–24029.

180. Cheng X., Xie H., Xiong Y., Sun P., Xue Y. and Li K. Lipidomics Profiles of Human Spermatozoa: Insights Into Capacitation And Acrosome Reaction Using UPLC-MS-based Approach. // *Frontiers in Endocrinology*. – 2023. – Vol. 14. – Pp. 1273878.
181. Cohen R., Mukai C., Travis A. J. Lipid Regulation of Acrosome Exocytosis // *Advances in Anatomy, Embryology, And Cell Biology*. – 2016. – Vol. 220. – Pp. 107–127.
182. Hwang J. Y. A Comparative Study of Capacitation-Mediated Changes in Whole Mouse Sperm Proteome // *Animal Cells and Systems*. – 2025. – Vol. 29. – № 1. – Pp. 556–569.
183. Balbach M., Ghanem L., Violante S., Kyaw A., Romarowski A., Cross J. R. et. al. Capacitation Induces Changes in Metabolic Pathways Supporting Motility of Epididymal And Ejaculated Sperm // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2023. – Vol. 11. – Pp. 1160154.
184. Abou-haila A., Tulsiani D. R. P. Signal Transduction Pathways That Regulate Sperm Capacitation and the Acrosome Reaction // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2009. – Vol. 485. – № 1. – Pp. 72–81.
185. Stival C., Puga Molina L. D. C., Paudel B., Buffone M. G., Visconti P. E. and Krapf D. Sperm Capacitation and Acrosome Reaction in Mammalian Sperm // *Sperm Acrosome Biogenesis and Function During Fertilization*. – 2016. – Vol. 220. – Pp. 93–106.
186. Abou-haila A., Tulsiani D. R. Signal Transduction Pathways That Regulate Sperm Capacitation and the Acrosome Reaction // *Archives of biochemistry and biophysics*. – 2009. – Vol. 485. – № 1. – Pp. 72–81.
187. Benko F., Urminská D., Ďuračka M. and Tvrdá E. Signaling Roleplay Between Ion Channels During Mammalian Sperm Capacitation // *Biomedicines*. – 2023. – Vol. 11. – № 9. – Pp. 2519.
188. Visconti P. E., Krapf D., De La Vega-beltrán J. L., Acevedo J. J. and Darszon A. Ion Channels, Phosphorylation and Mammalian Sperm Capacitation // *Asian Journal of Andrology*. – 2011. – Vol. 13. – № 3. – Pp. 395.
189. Gadella B. M., Tsai P. S., Boerke A. and Brewis, I. A. Sperm Head Membrane Reorganisation During Capacitation // *The International Journal of Developmental Biology*. – 2008. – Vol. 52. – № 5–6. – Pp. 473–480.
190. Langlais J., Roberts K. D. A Molecular Membrane Model of Sperm Capacitation and the Acrosome Reaction of Mammalian Spermatozoa // *Gamete Research*. – 1985. – Vol. 12. – № 2. – Pp. 183–224.
191. Ickowicz D., Finkelstein M., Breitbart H. Mechanism of Sperm Capacitation and the Acrosome Reaction: Role of Protein Kinases // *Asian Journal of Andrology*. – 2012. – Vol. 14. – № 6. – Pp. 816.
192. Travis A. J., Kopf G. S. The Role of Cholesterol Efflux in Regulating the Fertilization Potential of Mammalian Spermatozoa // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2002. – Vol. 110. – № 6. – Pp. 731–736.
193. Alfaiate M. I. R. Role of Cholesterol in Male Fertility: PhD Thesis. Universidade de Coimbra. – 2025.
194. De Toni L., Sabovic I., De Filippis V., Acquasaliente L., Peterle D., Guidolin D. et. al. Sperm Cholesterol Content Modifies Sperm Function and TRPV1-Mediated Sperm Migration // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22. – № 6. – Pp. 3126.
195. De Toni L., Cosci I., Sabovic I., Di Nisio A., Guidolin D., Pedrucci F. et. al. Membrane Cholesterol Inhibits Progesterone-Mediated Sperm Function Through the Possible Involvement of ABHD2 // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24. – № 11. – Pp. 9254.

196. Han S., Chu X. P., Goodson R., Gamel P., Peng S., Vance J. and Wang S. Cholesterol Inhibits Human Voltage-Gated Proton Channel hHv1 // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2022. – Vol. 119. – № 36. – Pp. e2205420119.
197. Cherny V. V., DeCoursey T. E. pH-dependent Inhibition of Voltage-Gated H⁺ Currents in Rat Alveolar Epithelial Cells by Zn²⁺ and Other Divalent Cations // *The Journal of General Physiology.* – 1999. – Vol. 114. – № 6. – Pp. 819–838.
198. Musset B., Smith S. M., Cherny V. V., Morgan D., Rajan S. and DeCoursey T. E. Zinc Inhibition of Monomeric and Dimeric Proton Channels Suggests Cooperative Gating // *Biophysical Journal.* – 2010. – Vol. 98. – № 3. – Pp. 313a–314a.
199. Chaves G., Bungert-Plümke S., Franzen A., Mahorivska I. and Musset B. Zinc Modulation of Proton Currents in a New Voltage-Gated Proton Channel Suggests a Mechanism of Inhibition // *The FEBS Journal.* – 2020. – Vol. 287. – № 22. – Pp. 4996–5018.
200. Keshtgar S., Ghanbari H., Ghani E. and Moosavi S. M. S. Effect of CatSper and Hv1 Channel Inhibition on Progesterone Stimulated Human Sperm // *Journal of Reproduction & Infertility.* – 2018. – Vol. 19. – № 3. – Pp. 133.
201. Lishko P. V., Kirichok Y. The Role of Hv1 and CatSper Channels in Sperm Activation: Hv1 and CatSper Channels in Sperm Activation // *The Journal of Physiology.* – 2010. – Vol. 588. – № 23. – Pp. 4667–4672.
202. Lishko P. V., Botchkina I. L., Kirichok Y. Progesterone Activates the Principal Ca²⁺ Channel of Human Sperm // *Nature.* – 2011. – Vol. 471. – № 7338. – Pp. 387–391.
203. Lishko P. V., Mannowetz N. CatSper: a Unique Calcium Channel of the Sperm Flagellum // *Current Opinion in Physiology.* – 2018. – Vol. 2. – Pp. 109–113.
204. Vaquer C. C., Suhaiman L., Pavarotti M. A., Arias R. J., Pacheco Guiñazú A. B., De Blas G. A. and Belmonte S. A. The Pair Ceramide 1-phosphate/ceramide Kinase Regulates Intracellular Calcium and Progesterone-Induced Human Sperm Acrosomal Exocytosis // *Frontiers in Cell and Developmental Biology.* – 2023. – Vol. 11. – Pp. 1148831.
205. Vicente-Carrillo A., Álvarez-Rodríguez M., Rodríguez-Martínez H. The Cation/Calcium Channel of Sperm (CatSper): a Common Role Played Despite Inter-Species Variation? // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2023. – Vol. 24. – № 18. – Pp. 13750.
206. De Toni L., Cosci I., Sabovic I., Di Nisio A., Guidolin D., Pedrucci F. Membrane Cholesterol Inhibits Progesterone-Mediated Sperm Function Through the Possible Involvement of ABHD2 // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2023. – Vol. 24. – № 11. – Pp. 9254.
207. Chamberlain L. H., Burgoyne R. D., Gould G. W. SNARE Proteins are Highly Enriched in Lipid Rafts in PC12 Cells: Implications for the Spatial Control of Exocytosis // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 2001. – Vol. 98 – № 10. – Pp. 5619–5624.
208. Lang T. SNARE Proteins and ‘Membrane Rafts’ // *The Journal of Physiology.* – 2007. – Vol. 585. – № 3. – Pp. 693–698.
209. Lang T. SNAREs are Concentrated in Cholesterol-Dependent Clusters that Define Docking and Fusion Sites for Exocytosis // *The EMBO Journal.* – 2001. – Vol. 20. – № 9. – Pp. 2202–2213.
210. Weisgerber A. W., Otruba Z., Knowles M. K. Syntaxin Clusters and Cholesterol Affect the mobility of Syntaxin1a // *Biophysical Journal.* – 2025. – Vol. 124. – № 11. – Pp. 1753–1762.
211. Gadella B. M. Sperm Membrane Physiology and Relevance for Fertilization // *Animal Reproduction Science.* – 2008. – Vol. 107. – № 3–4. – Pp. 229–236.

212. Gamboa S., Ramalho-Santos J. SNARE Proteins and Caveolin-1 in Stallion Spermatozoa: Possible Implications for Fertility // *Theriogenology*. – 2005. – Vol. 64. – № 2. – Pp. 275–291.
213. Nixon B., Aitken R. J. The Biological Significance of Detergent-Resistant Membranes in Spermatozoa // *Journal of Reproductive Immunology*. – 2009. – Vol. 83. – № 1–2. – Pp. 8–13.
214. Zitranski N., Borth H., Ackermann F., Meyer D., Vieweg L., Breit A. et. al. The “acrosomal synapse”: Subcellular Organization by Lipid Rafts and Scaffolding Proteins Exhibits High Similarities in Neurons and Mammalian Spermatozoa // *Communicative & Integrative Biology*. – 2010. – Vol. 3. – № 6. – Pp. 513–521.
215. Belmonte S. A., Lopez C. I., Roggero C. M., De Blas G. A., Tomes C. N. and Mayorga L. S. Cholesterol Content Regulates Acrosomal Exocytosis by Enhancing Rab3A Plasma Membrane Association // *Developmental Biology*. – 2005. – Vol. 285. – № 2. – Pp. 393–408.
216. Belmonte S. A., Mayorga L. S., Tomes C. N. The Molecules of Sperm Exocytosis // *Sperm Acrosome Biogenesis and Function During Fertilization* / Ed. by Buffone M. G. Cham: Springer International Publishing, 2016. – Vol. 220. – Pp. 71–92.
217. Aboagla E. M.-E., Terada T. Effects of Egg Yolk During the Freezing Step of Cryopreservation on the Viability of Goat Spermatozoa // *Theriogenology*. – 2004. – Vol. 62. – № 6. – Pp. 1160–1172.
218. Aires V. A., Hinsch K. D., Mueller-Schloesser F., Bogner K., Mueller-Schloesser S. and Hinsch E. In Vitro and in Vivo Comparison of Egg Yolk-Based and Soybean Lecithin-Based Extenders for Cryopreservation of Bovine Semen // *Theriogenology*. – 2003. – Vol. 60. – № 2. – Pp. 269–279.
219. Pace M. M., Graham E. F. Components in Egg Yolk which Protect Bovine Spermatozoa During Freezing // *Journal of Animal Science*. – 1974. – Vol. 39. – № 6. – Pp. 1144–1149.
220. Burris C., Webb G. Effects of Egg Yolk Source on the Cryopreservation of Stallion Semen // *Journal of Equine Veterinary Science*. – 2009. – Vol. 29. – № 5. – Pp. 336–337.
221. Айбазов А. М., Шевченко А. Н., Селионова М. И., Мамонтова Т. В. Сравнительная характеристика спермы барана, замороженной в разных экстендерах // *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*. – 2021. – Т. 4. – С. 63-78.
222. Kampschmidt R. F., Mayer D. T., Herman H. A. Lipid and Lipoprotein Constituents of Egg Yolk in the Resistance and Storage of Bull Spermatozoa // *Journal of Dairy Science*. – 1953 – Vol. 36. – Pp. 733–742.
223. Watson P. F. The Protection of Ram and Bull Spermatozoa by the Low Density Lipoprotein Fraction of Egg Yolk During Storage at 5 deg C and Deep Freezing // *Journal of Thermal Biology*. – 1976 – Vol. 1. – Pp. 137–141.
224. Foulkes J. A. The Separation of Lipoproteins from Egg Yolk and their Effect on the Motility and Integrity of Bovine Spermatozoa // *Reproduction*. – 1977. – Vol. 49. – № 2. – Pp. 277–284.
225. Bergeron A., Manjunath P. New Insights towards Understanding the Mechanisms of Sperm Protection by Egg Yolk and Milk // *Molecular Reproduction Devel.* – 2006. – Vol. 73. – № 10. – Pp. 1338–1344.
226. Amirat L., Tainturier D., Jeanneau L., Thorin C., Gérard O., Courtens J. L. and Anton M. Bull Semen in-vitro Fertility after Cryopreservation Using Egg Yolk LDL: a Comparison with Optidyl, a Commercial Egg Yolk Extender // *Theriogenology*. – 2004. – Vol. 61. – № 5. – Pp. 895–907.
227. Moussa M., Martinet V., Trimeche A., Tainturier D. and Anton M. Low Density Lipoproteins Extracted from Hen Egg Yolk by an Easy Method: Cryoprotective Effect on frozen-Thawed Bull Semen // *Theriogenology*. – 2002. – Vol. 57. – № 6. – Pp. 1695–1706.

228. Foulkes J. A., Sweasey D., Goodey R. G. Fertility of Bull Spermatozoa in Egg-Yolk Diluents of Varied Lipid Fatty Acid Composition // *Reproduction*. – 1980. – Vol. 60. – № 1. – Pp. 165–169.
229. Benesch M. G., Lewis R. N., McElhaney R. N. A Calorimetric and Spectroscopic Comparison of the Effects of Cholesterol and its Sulfur-Containing Analogs Thiocholesterol and Cholesterol Sulfate on the Thermotropic Phase Behavior and Organization of Dipalmitoylphosphatidylcholine Bilayer Membranes // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. – 2016. – Vol. 1858. – № 2. Pp. 168–180.
230. Dalal J., Chandolia R. K., Pawaria S., Kumar A., Kumar D., Selokar N. L. et. al. Low-Density Lipoproteins Protect Sperm During Cryopreservation in Buffalo: Unraveling Mechanism of Action // *Molecular Reproduction and Development*. – 2020. – Vol. 87. – № 12. – Pp. 1231–1244.
231. Graham J. K., Foote R. H. Effect of Several Lipids, Fatty Acyl Chain Length, and Degree of Unsaturation on the Motility of Bull Spermatozoa after Cold Shock and Freezing // *Cryobiology*. – 1987. – Vol. 24. – № 1. – Pp. 42–52.
232. Hu J. H., Jiang Z. L., Lv R. K., Li Q. W., Zhang S. S., Zan L. S. et. al. The Advantages of Low-Density Lipoproteins in the Cryopreservation of Bull Semen // *Cryobiology*. – 2011. – Vol. 62. – № 1. – Pp. 83–87.
233. Perumal P. Low Density Lipoprotein in Cryopreservation of Semen // *Asian Pacific Journal of Reproduction*. – 2018. – Vol. 7. – № 3. – Pp. 103–116.
234. Layek S. S., Mohanty T. K., Kumaresan A. and Parks J. E. Cryopreservation of Bull Semen: Evolution from Egg Yolk Based to Soybean Based Extenders // *Animal Reproduction Science*. – 2016. – Vol. 172. – Pp. 1–9.
235. Aires V. A., Hinsch K. D., Mueller-Schloesser F., Bogner K., Mueller-Schloesser S., and Hinsch E. In Vitro and in Vivo Comparison of Egg Yolk-Based and Soybean Lecithin-Based Extenders for Cryopreservation of Bovine Semen // *Theriogenology*. – 2003. – Vol. 60. – № 2. – Pp. 269–279.
236. Orthoefer F. T., List G. R. Phospholipids/Lecithin: a Class of Nutraceutical Lipids // *Nutraceutical and Specialty Lipids and their Co-Products*. – 2006. – Pp. 523–544.
237. Khaledi S., Towhidi A., Movahedin M., Nikkhah M. and Halvaei I. Evaluation of the Effect of Lecithin and Nanolecithin in Repairing Membrane Damage, Maintaining Membrane Integrity, and Improving Human Sperm Function in the Freezing–Thawing Process // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. – 2024. – Vol. 41. – № 11. – Pp. 3133–3146.
238. Андрушко А. Б., Шаран Н. М., Яремчук И. М., Корбецкий А. Р., Панич А. П. и Атаманюк И. С. Физиолого-биохимические характеристики спермы быков при использовании разбавителей на яичном желтке и соевом лецитине для криокосервации // *Біологія Тварин*. – 2012. – Т. 14. – № 1–2. – С. 574–579.
239. Андреев А. А., Садикова Д. Г., Лабе К., Ананьев В. И. и Курников А. Л. Влияние липидов на образование льда при заморзании криозащитных растворов // *Биофизика*. 2008. – Т. 53. – № 4. – С. 598–601.
240. Шишова Н. В., Комбарова Н. А., Давыдова Г. А., Серая О. Ю., Миронова Е. А., Абилов А. И. и др. Исследование криозащитного действия лецитинов растительного происхождения ЛециПРО-С и ЛециПРО-90 // *Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии*. – 2017. – Т. 34. – № 3. – С. 223–230.
241. Forouzanfar M., Sharafi M., Hosseini S. M., Ostadhosseini S., Hajian M., Hosseini L. et. al.. In Vitro Comparison of Egg Yolk–Based and Soybean Lecithin–Based Extenders for Cryopreservation of Ram Semen // *Theriogenology*. – 2010. – Vol. 73. – № 4. – Pp. 480–487.

242. Zhang S., Hu J., Li Q., Jiang Z. and Zhang X. The Cryoprotective Effects of Soybean Lecithin on Boar Spermatozoa Quality // *African Journal of Biotechnology*. – 2009. – Vol. 8. – № 22.
243. Смоленцева Д. А., Миронова А. Г., Сыбачин А. В., Афанасьева С. И. и Симоненко, Е. Ю. Модификация криопротекторной среды компонентами яичного желтка для повышения выживаемости сперматозоидов человека после криоконсервации // *Актуальные Вопросы Биологической Физики И Химии*. – 2020. – Т. 5. – № 2. – С. 291–295.
244. Papa F. O., Felício G. B., Melo-Oña C. M., Alvarenga M. A., De Vita B., Trínque C. et. al. Replacing Egg Yolk with Soybean Lecithin in the Cryopreservation of Stallion Semen // *Animal Reproduction Science*. – 2011. – Vol. 129 – № 1–2. – Pp. 73–77.
245. Yang S. X., Adams G. P., Zwiefelhofer E. M., Rajapaksha K. and Anzar M. Cholesterol-Cyclodextrin Complex as a Replacement for Egg Yolk in Bull Semen Extender: Sperm Characteristics Post-Thawing and *in Vivo* Fertility // *Animal Reproduction Science*. – 2021. – Vol. 225. – Pp. 106691.
246. Mutalik S., Salian S. R., Avadhani K., Menon J., Joshi H., Hegde A. R. et. al. Liposome Encapsulated Soy Lecithin and Cholesterol Can Efficiently Replace Chicken Egg Yolk in Human Semen Cryopreservation Medium // *Systems Biology in Reproductive Medicine*. – 2014. – Vol. 60. – № 3. – Pp. 183–188.
247. Mocé E., Blanch E., Tomás C., & Graham J. K. Use of Cholesterol in Sperm Cryopreservation: Present Moment and Perspectives to Future // *Reproduction of Domestic Animals*. – 2010. – Vol. 45. – № 2. – Pp. 57–66.
248. Wilhelm K. M., Graham J. K., Squires E. L. Effects of Phosphatidylserine and Cholesterol Liposomes on the Viability, Motility, and Acrosomal Integrity of Stallion Spermatozoa Prior to and after Cryopreservation // *Cryobiology*. – 1996. – Vol. 33. – № 3. – Pp. 320–329.
249. Uekama K., Hirayama F., Irie T. Cyclodextrin Drug Carrier Systems // *Chemical Reviews*. – 1998. – Vol. 98. – № 5. – Pp. 2045–2076.
250. Huang Z., London E. Effect of Cyclodextrin and Membrane Lipid Structure upon Cyclodextrin–Lipid Interaction // *Langmuir*. – 2013. – Vol. 29. – № 47. – Pp. 14631–14638.
251. Lipkowitz K. B. Applications of Computational Chemistry to the Study of Cyclodextrins // *Chemical Reviews*. – 1998. – Vol. 98. – № 5. – Pp. 1829–1874.
252. Davis M. E., Brewster M. E. Cyclodextrin-based Pharmaceuticals: Past, Present and Future // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2004. – Vol. 3 – № 12. – Pp. 1023–1035.
253. Szente L., Fenyvesi É. Cyclodextrin-Lipid Complexes: Cavity Size Matters // *Structural Chemistry*. – 2017. Vol. 28, № 2. Pp. 479–492.
254. Ohtani Y., Irie T., Uekama K., Fukunaga K. and Pitha, J. Differential Effects of α -, β - and γ -cyclodextrins on Human Erythrocytes // *European Journal of Biochemistry*. – 1989. – Vol. 186. – № 1–2. – Pp. 17–22.
255. Tsamaloukas A., Szadkowska H., Slotte P. J. and Heerklotz H. Interactions of Cholesterol with Lipid Membranes and Cyclodextrin Characterized By Calorimetry // *Biophysical journal*. – 2005. – Vol. 89. – № 2. – Pp. 1109–1119.
256. Christoforides E., Papaioannou A., Bethanis K. Crystal Structure of the Inclusion Complex of Cholesterol in β -cyclodextrin and Molecular Dynamics Studies // *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. – 2018. – Vol. 14. – № 1. – Pp. 838–848.
257. Jozwiakowski M. J., Connors K. A. Aqueous Solubility Behavior of three Cyclodextrins // *Carbohydrate Research*. – 1985. – Vol. 143. – Pp. 51–59.

258. Szente L., Szejtli J. Highly Soluble Cyclodextrin Derivatives: Chemistry, Properties, and Trends in Development // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 1999. – Vol. 36. – № 1. – Pp. 17–28.
259. Szejtli J. Dimethyl- β -Cyclodextrin as Parenteral Drug Carrier // *Journal of Inclusion Phenomena*. – 1983. – Vol. 1. – № 2. – Pp. 135–150.
260. Spencer C. M., Stoddart J. F., Zarzycki R. Structural Mapping of an Unsymmetrical Chemically Modified Cyclodextrin by High-Field Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy // *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*. – 1987. – № 9. – Pp. 1323–1336.
261. Wimmer T. Process for the Preparation of Alkylated Cyclodextrin Derivatives, Methylated Cyclodextrin Derivatives Which Can Be Prepared by the Process and the Use of the Products: патент: DE4333598A1 USA. 1995.
262. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen // *Who Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*. – 2021.
263. Folch J., Lees M., Stanley G.S. A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides From Animal Tissues // *Journal of Biological Chemistry*. – 1957. – Vol. 226. – № 1. – Pp. 497–509.
264. Purdy P. H., Graham J. K. Effect of Cholesterol-Loaded Cyclodextrin on the Cryosurvival of Bull Sperm // *Cryobiology*. – 2004. – Vol. 48. – № 1. – Pp. 36–45.
265. Schorn K., Marsh D. Extracting Order Parameters from Powder EPR Lineshapes for Spin-Labelled Lipids in Membranes // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 1997. – Vol. 53. – № 12. – Pp. 2235–2240.
266. Кузнецов А.Н. Метод спинового зонда: Основы и применение. Москва: Наука. – 1976. – С. 209.
267. Симоненко Е. Ю., Гармаева С. Б., Яковенко С. А., Григорьева А. А., Твердислов В. А., Миронова А. Г. и Апрышко В. П. Влияние температуры хранения и условий криоконсервации на степень фрагментации ДНК сперматозоидов человека // *Биофизика*. – 2016. – Т. 61. – № 2. – С. 316–320.
268. Ribas-Maynou J., Fernández-Encinas A., García-Peiró A., Prada E., Abad C., Amengual M. J. et. al. Human Semen Cryopreservation: A Sperm DNA Fragmentation Study with Alkaline and Neutral Comet Assay // *Andrology*. – 2014. – Vol. 2. – № 1. – Pp. 83–87.
269. Thomson L. K., Fleming S. D., Aitken R. J., De Iuliis G. N., Zieschang J. A. and Clark A. M. Cryopreservation-Induced Human Sperm DNA Damage is Predominantly Mediated by Oxidative Stress Rather than Apoptosis // *Human Reproduction*. – 2009. – Vol. 24. – № 9. – Pp. 2061–2070.
270. Gosalvez J., de la Torre J., Lopez-Fernandez C., Perez-Gutierrez L., Ortega L., Caballero P. and Nunez R. DNA Fragmentation Dynamics in Fresh Versus Frozen Thawed Plus Gradient-Isolated Human Spermatozoa // *Systems Biology in Reproductive Medicine*. – 2010. – Vol. 56. – № 1. – Pp. 27–36.
271. Shi H., Li Q. Y., Li H., Wang H. Y., Fan C. X., Dong Q. Y. et. al. ROS-Induced Oxidative Stress is a Major Contributor to Sperm Cryoinjury // *Human Reproduction*. – 2024. – Vol. 39. – № 2. – Pp. 310–325.
272. Aitken R. J. Reactive Oxygen Species as Mediators of Sperm Capacitation and Pathological Damage // *Molecular Reproduction Devel.* – 2017. – Vol. 84. – № 10. – Pp. 1039–1052.
273. Shi H., Li Q. Y., Li H., Wang H. Y., Fan C. X., Dong Q. Y. et. al. ROS-Induced Oxidative Stress is a Major Contributor to Sperm Cryoinjury // *Human Reproduction*. – 2024. – Vol. 39. – № 2. – Pp. 310–325.

274. Lourenço M. L., de Moura G. A., Rocha Y. M., Rodrigues J. P. V. and Monteiro, P. B. Impact of Sperm DNA Fragmentation on the Clinical Outcome of Assisted Reproduction Techniques: a Systematic Review of the Last Five Years // *JBRA Assisted Reproduction*. – 2023. – Vol. 27. – № 2. – Pp. 282–291.
275. Григорьева А. А., Гармаева С. Б., Яковенко С. А., Симоненко Е. Ю., Твердислов В. А., Кириенко К. В. и др. Криоконсервация гамет человека в присутствии криопротекторов, модифицированных яичным желтком // *Новейшие достижения и успехи развития естественных и математических наук*. – 2016. – С. 28–32.
276. Salmani H., Towhidi A., Zhandi M., Bahreini M. and Sharafi M. In Vitro Assessment of Soybean Lecithin and Egg Yolk Based Diluents for Cryopreservation of Goat Semen // *Cryobiology*. – 2014. – Vol. 68. – № 2. – Pp. 276–280.
277. Aires V. A., Hinsch K. D., Mueller-Schloesser F., Bogner K., Mueller-Schloesser S. and Hinsch E. In Vitro and In Vivo Comparison of Egg Yolk-Based and Soybean Lecithin-Based Extenders for Cryopreservation of Bovine Semen // *Theriogenology*. – 2003. – Vol. 60. – № 2. – Pp. 269–279.
278. Grigorieva A., Simonenko E., Garmaeva S., Mironova A. and Yakovenko S. Human Gametes Cryopreservation with Cryoprotectant Modified by Egg Yolk // *CryoLetters*. – 2019. – Vol. 40. – № 3. – Pp. 187–192.
279. Bandularatne E., Bongso A. Evaluation of Human Sperm Function After Repeated Freezing and Thawing // *Journal of Andrology*. – 2002. – Vol. 23. – № 2. – Pp. 242–249.
280. Mostafa A. A., El-Belely M. S., Ismail S. T., El-Sheshtawy R. I. and Shahba M. I. Impact of Replacing Egg Yolk with Lecithin on Quality of Pre-Freeze and Post-Thaw Buffalo Spermatozoa // *Asian Pacific Journal of Reproduction*. – 2018. – Vol. 7. – № 6. – Pp. 254–260.
281. Nath M. C., Chakravorty M. K., Chowdhury S. R. Liebermann-Burchard Reaction for Steroids // *Nature*. – 1946. – Vol. 157. – № 3978. – Pp. 103–104.
282. Миронова А. Г., Афанасьева С. И., Сыбачин А. В., Спиридонов В. В., Большаков М. А., Симоненко Е. Ю. Сравнение методов определения концентрации холестерина в мембране сперматозоидов человека для экспресс-анализа в условиях клинической лаборатории // *Биоорганическая химия*. 2025. – Том 51. – № 1. – С. 43-50.
283. Lippel K., Ahmed S., Albers J. J., Bachorik P., Cooper G., Helms R. and Williams J. Analytical Performance and Comparability of the Determination of Cholesterol by 12 Lipid-Research Clinics. // *Clinical chemistry*. – 1977. – Vol. 23. – № 9. – Pp. 1744–1752.
284. Espinosa J. R., Wand C. R., Vega C., Sanz E. Frenkel D. Calculation of the Water-Octanol Partition Coefficient of Cholesterol for SPC, TIP3P, and TIP4P Water // *The Journal of Chemical Physics*. – 2018. – Vol. 149. – № 22. Pp. 224501.
285. Kolarič L., Šimko P. The comparison of HPLC and Spectrophotometric Method for Cholesterol Determination // *Slovak Journal of Food Sciences / Potravinárstvo*. – 2020. – Vol. 14 – № 1.
286. Sugkraroek P., Kates M., Leader A. and Tanphaichitr N. Levels of Cholesterol and Phospholipids in Freshly Ejaculated Sperm and Percoll-gradient-pelleted Sperm from Fertile and Unexplained Infertile Men // *Fertility and sterility*. – 1991. – Vol. 55. – № 4. – Pp. 820–827.
287. Force A., Grizard G., Giraud M. N., Motta C., Sion B. and Boucher D. Membrane Fluidity and Lipid Content of Human Spermatozoa Selected by Swim-up Method // *International Journal of Andrology*. – 2001. – Vol. 24. – № 6. – Pp. 327–334.

288. Osman H., Yap K. C. Comparative Sensitivities of Cholesterol Analysis Using GC, HPLC and Spectrophotometric Methods // *Malaysian Journal of Analytical Sciences*. – 2006. – Vol. 10. – № 2. – Pp. 205–210.
289. Allain C. C., Poon L. S., Chan C. S., Richmond W. F. P. C. and Fu P. C. Enzymatic Determination of Total Serum Cholesterol // *Clinical Chemistry*. – 1974. – Vol. 20. – № 4. – Pp. 470–475.
290. Shogomori H., Brown D. A. Use of Detergents to Study Membrane Rafts: The Good, the Bad, and the Ugly // *Biological Chemistry*. – 2003. – Vol. 384. – № 9. – Pp. 1259–1263.
291. Gupta U., Singh V. K., Kumar V. and Khajuria Y. Spectroscopic Studies of Cholesterol: Fourier Transform Infra-Red and Vibrational Frequency Analysis // *Mater. Focus*. – 2014. – Vol. 3. – № 3. – Pp. 211–217.
292. Coates J. Interpretation of Infrared Spectra, a Practical Approach // *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. – 2000. – Vol. 12. – Pp. 10815–10837.
293. Миронова А. Г., Афанасьева С. И., Яковенко С. А., Тихонов А. Н., Симоненко Е. Ю. использование комплексов включения холестерина на основе произвольно метилированных бета-циклодекстринов для повышения криотолерантности сперматозоидов человека // *Биофизика*. – 2024. – Т. 69. – № 6. – С. 1390–1401.
294. Mahammad S., Parmryd I. Cholesterol Depletion Using Methyl- β -cyclodextrin // *Methods in Membrane Lipids*. – 2015. – Vol. 1232. – Pp. 91–102.
295. Kiss T., Fenyvesi F., Bácskay I., Váradi J., Fenyvesi E., Iványi R. Evaluation of the Cytotoxicity of Beta-Cyclodextrin Derivatives: Evidence for the role of Cholesterol Extraction // *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. – 2010. – Vol. 40. – № 4. – Pp. 376–380.
296. Holmes E., Björndahl L., Kvist U. Hypotonic Challenge Reduces Human Sperm Motility through Coiling and Folding of the Tail // *Andrologia*. – 2020. Vol. 52. – № 11.
297. Hao S. J., Hou J. F., Jiang N. and Zhang G. J. Loss of Membrane Cholesterol Affects Lysosomal Osmotic Stability // *General Physiology and Biophysics*. – 2008. – Vol. 27. – № 4. – Pp. 278.
298. Rudenko S. V. Erythrocyte Morphological States, Phases, Transitions And Trajectories // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. – 2010. – Vol. 1798. – № 9. – Pp. 1767–1778.
299. Motoyama K., Toyodome H., Onodera R., Irie T., Hirayama F., Uekama K. and Arima H. Involvement of Lipid Rafts of Rabbit Red Blood Cells in Morphological Changes Induced by Methylated β -Cyclodextrins // *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. – 2009. – Vol. 32. – № 4. – Pp. 700–705.
300. Kiss T., Fenyvesi F., Bácskay I., Váradi J., Fenyvesi E., Iványi R. et. al. Evaluation of the Cytotoxicity of β -Cyclodextrin Derivatives: Evidence for the Role of Cholesterol Extraction // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2010. – Vol. 40. – № 4. – Pp. 376–380.
301. Castagne D., Fillet M., Delattre L., Evrard B., Nussgens B. and Piel G. Study of the Cholesterol Extraction Capacity of β -Cyclodextrin and its Derivatives, Relationships with their Effects on Endothelial Cell Viability and on Membrane Models // *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. – 2009. Vol. 63. – № 3–4. – Pp. 225–231.
302. Fenyvesi É., Szemán J., Csabai K., Malanga M. and Szente L. Methyl-beta-cyclodextrins: the Role of Number and Types of Substituents in Solubilizing Power // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2014. – Vol. 103. – № 5. – Pp. 1443–1452.

303. Szente L., Fenyvesi É. Cyclodextrin-Lipid Complexes: Cavity Size Matters // *Struct Chem*. 2017. – Vol. 28. – № 2. – Pp. 479–492.
304. Jozwiakowski M. J., Connors K. A. Aqueous Solubility Behavior of Three Cyclodextrins // *Carbohydrate Research*. – 1985. – Vol. 143. – Pp. 51–59.
305. McConnell H. M., McFarland B. G. Physics and Chemistry of Spin Labels // *Quarterly Reviews of Biophysics*. – 1970. – Vol. 3. – № 1. – Pp. 91–136.
306. Jost P., Libertini L. J., Hebert V. C. and Griffith O. H. Lipid Spin Labels in Lecithin Multilayers. A Study of Motion Along Fatty Acid Chains // *Journal of Molecular Biology*. – 1971. – Vol. 59. – № 1. – Pp. 77–98.
307. Keith A. D., Sharnoff M., Cohn G. E. A Summary and Evaluation of Spin Labels Used as Probes for Biological Membrane Structure // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. – 1973. – Vol. 300 – № 4. – Pp. 379–419.
308. McConnell H. M., Hubbell W. L. Molecular Motion in Spin-Labeled Phospholipids and Membranes // *Journal of the American Chemical Society*. – 1971. – Vol. 93. – № 2. – Pp. 314–326.
309. Seelig J. Spin Label Studies of Oriented Smectic Liquid Crystals (a Model System for Bilayer Membranes) // *Journal of the American Chemical Society*. – 1970. – Vol. 92. – № 13. – Pp. 3881–3887.
310. Hubbell W. L., McConnell H. M. Orientation and Motion of Amphiphilic Spin Labels in Membranes // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1969. – Vol. 64. – № 1. – Pp. 20–27.
311. Tikhonov A. N., Subczynski W. K. Application of Spin Labels to Membrane Bioenergetics // *Biomedical EPR, Part A: Free Radicals, Metals, Medicine, and Physiology* / Ed. by Eaton S. R., Eaton G. R., Berliner L. J. – 2005. – Vol. 23. – Pp. 147–194.
312. Hsia J.-C., Schneider H., Smith I. C. P. A Spin Label Study of the Influence of Cholesterol on Phospholipid Multibilayer Structures // *Canadian Journal of Biochemistry*. – 1971. – Vol. 49. – № 5. – Pp. 614–622.
313. Миронова А.Г., Трубицин Б.В., Симоненко Е.Ю., Сыбачин А.В., Яковенко С.А., Тихонов А.Н. Влияние Холестерина на Мембраны Сперматозоидов: Исследование с Помощью Спиновых Зондов // *Биофизика*. – 2025. – Т. 70. – № 4. – С. 704–714.
314. Lapper R. D., Paterson S. J., Smith I. C. P. A Spin Label Study of the Influence of Cholesterol on Egg Lecithin Multibilayers // *Canadian Journal of Biochemistry*. – 1972. – Vol. 50. – № 9. – Pp. 969–981.
315. Schreier-Muccillo S., Butler K. W., Smith I. C. Structural Requirements for the Formation of Ordered Lipid Multibilayers – a Spin Probe Study // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1973. – Vol. 159. – № 1. Pp. 297–311.
316. Smith I. C. A Spin Label Study of the Organization and Fluidity of Hydrated Phospholipid Multibilayers – a Model Membrane System // *Chimia*. – 1971. Vol. 25, № 11. Pp. 349–349.
317. Mailer C., Taylor C. P. S., Schreier-Muccillo S. and Smith I. C. The Influence of Cholesterol on Molecular Motion in Egg Lecithin Bilayers – a Variable-Frequency Electron Spin Resonance Study of a Cholestane Spin Probe // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1974. – Vol. 163. – № 2. – Pp. 671–678.
318. McIntosh T. J. The Effect of Cholesterol on the Structure of Phosphatidylcholine Bilayers // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. – 1978. – Vol. 513. – № 1. – Pp. 43–58.

319. Дзюба С. А. Изучение структуры биологических мембран с помощью ESEEM спектроскопии спиновых меток и дейтериевого замещения // Журнал структурной химии. – 2013. Т. 54, № S1. С. 5–18.
320. Jianjun P., Tristram-Nagle S., Nagle J. F. Effect of Cholesterol on Structural and Mechanical Properties of Membranes Depends on Lipid Chain Saturation // Physical Review. – 2009. – Vol. 80. – № 2.
321. Saad H. Y., Higuchi W. I. Water Solubility of Cholesterol // Journal of Pharmaceutical Sciences. – 1965. – Vol. 54. – № 8. – Pp. 1205–1206.
322. Christoforides E., Papaioannou A., Bethanis K. Crystal Structure of the Inclusion Complex of Cholesterol in β -cyclodextrin and Molecular Dynamics Studies // Beilstein Journal of Organic Chemistry. – 2018. – Vol. 14. – Pp. 838–848.
323. Fenyvesi F., Kiss T., Fenyvesi É., Szenté L., Veszéka S., Deli M. A. et.al. Randomly Methylated β -cyclodextrin Derivatives Enhance Taxol Permeability Through Human Intestinal Epithelial Caco-2 Cell Monolayer // Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2011. – Vol. 100. – № 11. – Pp. 4734–4744.
324. Hamamah S., Lanson M., Barthelemy C., Garrigue M. A., Muh J. P., Royere D., and Lansac J. Analysis of the Lipid Content and the Motility of Human Sperm after Follicular Fluid Treatment // Andrologia. – 2009. – Vol. 27. – № 2. – Pp. 91–97.
325. Feki N. C., Therond P., Couturier M., Limea G., Legrand A., Jouannet P. and Auger J. Human Sperm Lipid Content is Modified after Migration into Human Cervical Mucus // Molecular Human Reproduction. – 2004. – Vol. 10. – № 2. – Pp. 137–142.
326. Li L.-K., So L., Spector A. Age-Dependent Changes in the Distribution and Concentration of Human Lens Cholesterol and Phospholipids // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Lipids and Lipid Metabolism. – 1987. – Vol. 917. – № 1. – Pp. 112–120.
327. Preston Mason R., Tulenko T. N., Jacob R. F. Direct Evidence for Cholesterol Crystalline Domains in Biological Membranes: Role in Human Pathobiology // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes. – 2003. – Vol. 1610. – № 2. – Pp. 198–207.
328. Joset A., Grammenos A., Hoebeke M. and Leyh B. Investigation of the Interaction between a β -cyclodextrin and DMPC Liposomes: a Small Angle Neutron Scattering Study // Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry. – 2015. – Vol. 83. – № 3–4. – Pp. 227–238.
329. Joset A., Grammenos A., Hoebeke M. and Leyh B. Small-Angle Neutron Scattering Investigation of Cholesterol-Doped DMPC Liposomes Interacting with β -cyclodextrin // Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry. – 2016. – Vol. 84. – № 1–2. – Pp. 153–161.
330. Moce E., Graham J. K. Cholesterol-Loaded Cyclodextrins Added to Fresh Bull Ejaculates Improve Sperm Cryosurvival // Journal of Animal Science. – 2006. – Vol. 84. – № 4. – Pp. 826–833.
331. Subczynski W. K., Hopwood L. E., Hyde J. S. Is the Mammalian Cell Plasma Membrane a Barrier to Oxygen Transport? // The Journal of General Physiology. – 1992. – Vol. 100. – № 1. – Pp. 69–87.
332. Zhang X., Barraza K. M., Beauchamp J. L. Cholesterol Provides Nonsacrificial Protection of Membrane Lipids from Chemical Damage at Air – Water Interface // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2018. – Vol. 115. – № 13. – Pp. 3255–3260.
333. Khandelia H., Loubet B., Olżyńska A., Jurkiewicz P. and Hof M. Pairing of Cholesterol with Oxidized Phospholipid Species in Lipid Bilayers // Soft Matter. Royal Society of Chemistry. – 2014. – Vol. 10. – № 4. – Pp. 639–647.

334. Balakrishnan M., Kenworthy A. K. Lipid Peroxidation Drives Liquid–Liquid Phase Separation and Disrupts Raft Protein Partitioning in Biological Membranes // *Journal of the American Chemical Society*. – 2024. – Vol. 146. – № 2. – Pp. 1374–1387.
335. Saito Y., Noguchi N., Niki E. Cholesterol is More Readily Oxidized than Phospholipid Linoleates in Cell Membranes to Produce Cholesterol Hydroperoxides // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2024. – Vol. 211. – Pp. 89–95.
336. Olkkonen V. M., Béaslas O., Nissilä E. Oxysterols and Their Cellular Effectors // *Biomolecules*. – 2012. – Vol. 2. – № 1. – Pp. 76–103.
337. Kritharides L., Kus M., Brown A. J., Jessup W. and Dean R. T. Hydroxypropyl- β -cyclodextrin-mediated Efflux of 7-Ketocholesterol from Macrophage Foam Cells // *Journal of Biological Chemistry*. – 1996. – Vol. 271. – № 44. – Pp. 27450–27455.
338. Solocinski J., Osgood Q., Wang M., Connolly A., Menze M. A. and Chakraborty N. Effect of Trehalose as an Additive to Dimethyl Sulfoxide Solutions on Ice Formation, Cellular Viability, and Metabolism // *Cryobiology*. – 2017. – Vol. 75. – Pp. 134–143.
339. Wang G. M., Haymet A. D. J. Trehalose and Other Sugar Solutions at Low Temperature: Modulated Differential Scanning Calorimetry (MDSC) // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 1998. – Vol. 102. – № 27. – Pp. 5341–5347.