ОТЗЫВ НА АВТОРЕФЕРАТ ДИССЕРТАЦИИ

Мироновой Анны Геннадьевны

«ВЛИЯНИЕ ХОЛЕСТЕРИНА НА КРИОТОЛЕРАНТНОСТЬ СПЕРМАТОЗОИДОВ ЧЕЛОВЕКА», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика.

Актуальность работы. Известно, что технология сохранения биологических объектов путем их охлаждения до температур, при которых прекращаются все биологические процессы, называется криоконсервацией. Впервые криоконсервация сперматозоидов была успешно применена к биологическим материалам человека в 1954 г., когда в результате искусственного оплодотворения предварительно замороженной спермой наступили три беременности. На протяжении 70 лет криоконсервация сперматозоидов стала важной составляющей современной репродуктивной медицины. Основная проблема, возникающая при криоконсервации, заключается в том, чтобы сохранить препарат от разрушения в процессе замораживании до криогенных температур и последующем отогреве. При замораживании клетка попадает в крайне неблагоприятные условия, вызванные замерзанием окружающего водного раствора (которое, как правило, сопровождается образованием льда), обезвоживанием клеток, а также изменением свойств клеточных мембран. Существует своеобразная конкуренция между различными факторами, приводящими к гибели замораживаемых клеток. Наиболее наглядной демонстрацией этой конкуренции служит «двухфакторная гипотеза» американского криобиолога Питера Мазура, предложенная им в 60-х годах XX века. Эта гипотеза гласит, что чрезмерно быстрое охлаждение убивает клетки из-за образования внутриклеточного льда, обезвоживания клеток, а также изменения свойств клеточных мембран. В случае медленного охлаждения клетка успешно обезвоживается, и концентрированный раствор внутриклеточного вещества замерзает в аморфном состоянии. Внутриклеточный лёд при этом не образуется, но клетки могут погибнуть из-за длительного выдерживания в гипертонической среде и дегидратации клеток.

Модификация состава мембранных липидов считается перспективным способом повышения криотолерантности сперматозоидов. Криопротекторные среды, которые используются для криоконсервации сперматозоидов человека, как правило, не содержат компонентов, направленных на стабилизацию клеточных мембран. В то же время в ветеринарной практике накоплен значительный опыт использования яичного желтка (ЯЖ), богатого фосфолипидами, холестерином и липопротеинами, в составе криопротекторных сред. Однако ЯЖ имеет ряд недостатков как продукт животного происхождения: высокая вариабельность состава, риск микробиологической контаминации, сложность стандартизации и, как следствие, ограниченная применимость в клинических протоколах. Научно-практический интерес представляют альтернативные подходы криоконсервации клеток, основанные на использовании растительных аналогов ЯЖ (например, соевого лецитина) или целенаправленной модификации липидного состава мембран сперматозоидов. Такая модификция осуществляется посредством включения экзогенных липидов, таких как холестерин, ненасыщенные фосфолипиды, а также антиоксидантные молекулы липофильной природы.

Целью исследования Мироновой Анны Геннадьевны явилась разработка методов оптимизации технологии криоконсервации сперматозоидов человека, основанная на

изучении механизмов криоповреждений, и создание подходов к повышению криотолерантности сперматозоидов человека с использованием холестерина, как мембраностабилизирующего вещества.

Задачами исследования Мироновой А.Г. стали:

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.

В диссертационной работе *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-циклодектринами и их комплексами с холестерином. Структурные изменения мембран сперматозоидов человека изучали с помощью липидорастворимого спинового 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. Комплексный подход и использование многочисленных современных методов исследования свидетельствуют о высоком профессиональном уровне диссертанта.

Данные, полученные Мироновой А.Г., свидетельствуют о том, что метил-β-циклодекстрины обладают выраженной цитотоксичностью в отношении сперматозоидов человека, связанной с экстракцией мембранного холестерина. Установлено, что комплексы метил-β-циклодекстринов с холестерином характеризуются существенно меньшей цитотоксичностью. Установлено, что инкубация сперматозоидов с комплексами метил-β-циклодекстринов с холестерином вызывает дозозависимое повышение содержания холестерина в мембранах сперматозоидов с последующим выходом на плато. Продемонстрировано 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 спинового 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).

Автореферат написан хорошим литературным языком и свидетельствует о кропотливой и хорошо осмысленной работе, ее новизне, научно-теоретической и практической значимости, значительном объеме проведенных исследований и высокой методической подготовке диссертанта. Выводы диссертации хорошо аргументированы, полностью обоснованы и не вызывают сомнений. 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. 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).

Заключение

На основании анализа автореферата кандидатской диссертации Мироновой Анны Геннадьевны «Влияние холестерина на криотолерантность сперматозоидов человека», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 – Биофизика в диссертационный совет 24.1.038.01 при ФГБУН Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, полностью соответствует требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатским диссертациям согласно разделу II (пп.9-14) Постановления Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842 «О порядке присуждения ученых степеней», а ее автор, бесспорно, заслуживает присуждения искомой степени по указанной выше специальности.

Ведущий научный сотрудник лаборатории функциональной нейроцитологии
ФГБНУ Института высшей нервной деятельностии нейрофизиологии
Российской Академии Наук (ИВНД и НФ РАН),
доктор биологических наук
Реутов Валентин Палладиевич _____ / Реутов В.П./ 03.12.25

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук
Адрес: ул. Бутлерова, 5а, Москва, 115569, Россия;
Телефон: 8-909-659-75-02.
E-mail: vpreutov51@mail.ru; valentinreutov@mail.ru
Подпись Реутова Валентина Палладиевича заверяю.
Ученый секретарь
ФГБНУ ИВНД и НФ РАН,
кандидат биологических наук
Пасикова Наталья Викторовна _____ /Пасикова Н.В./