

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Мироновой Анны Геннадьевны
«Влияние холестерина на криотолерантность сперматозоидов человека»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.2. Биофизика.

Актуальность работы.

Диссертация Мироновой А.Г. посвящена изучению влияния холестерина и способов целенаправленной модификации его концентрации на криотолерантность сперматозоидов человека — одной из важных проблем современной репродуктивной биологии и криобиологии. Тема является актуальной, поскольку эффективность криоконсервации сперматозоидов остается низкой: после размораживания сохраняется лишь 40-60% подвижных клеток.

Липидный состав мембраны сперматозоидов является критическим фактором, определяющим их устойчивость к повреждениям при криоконсервации. В процессе размораживания и замораживания именно мембрана подвергается максимальному структурному стрессу, что приводит к нарушению ее целостности и снижению жизнеспособности сперматозоидов. Понимание роли липидного состава и механизмов его изменений в условиях криостресса имеет важное значение для разработки эффективных методов повышения качества криоконсервированной спермы и оптимизации репродуктивных технологий.

Научная новизна.

К числу новых научных результатов работы А.Г.Мироновой относятся:

1. Доказана выраженная дозозависимая цитотоксичность метилированных β -циклодекстринов (RAMEB), обусловленная экстракцией холестерина из мембран сперматозоидов человека. Это подтверждено как биохимическими методами, так и на основании анализа свойств мембран сперматозоидов методом ЭПР-спектроскопии с использованием липидорастворимых спиновых зондов.
2. Показано, что предварительная инкубация сперматозоидов с комплексами RAMEB-CHOL приводит к достоверному повышению индекса подвижности и индекса жизнеспособности после криоконсервации — оптимальная концентрация комплекса 2 мг/мл.

3. Установлено дозозависимое повышение содержания холестерина в мембранах сперматозоидов под действием RAMEB-CHOL с последующим выходом на плато и эффектом перенасыщения мембраны холестерином ($\text{Хол/ФЛ} > 3$), что ранее не было описано для сперматозоидов человека.

4. В ходе исследований мембран сперматозоидов и сравнения их с модельных мембранами липосом методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) были получены данные о влиянии холестерина на мембраны сперматозоидов человека. Показано, что холестерин вызывает увеличения микровязкости липидного бислоя мембран сперматозоидов.

Практическая значимость диссертации выражается в следующем:

- Разработана доступная и технологичная методика повышения криотолерантности сперматозоидов посредством модификации мембраны холестерином

- Показана возможность применения RAMEB-CHOL в качестве эффективного криопротекторного агента для увеличения выживаемости сперматозоидов после криоконсервации.

- Определен оптимальный аналитический метод для рутинного определения концентрации холестерина в мембранах сперматозоидов: метод ферментативно-колориметрической детекции (ФКД)

Результаты диссертационной работы могут быть непосредственно внедрены в клиническую практику вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), а также быть использованы в дальнейших исследованиях в области криобиологии.

Структура и объем работы:

Диссертация Миронов А.Г. имеет традиционную и соответствующую требованиям ВАК структуру. Работа включает: введение, обзор литературы, разделы «материалы и методы», «результаты и обсуждение» и «заключение», в котором суммированы основные результаты и выводы. Общий объем диссертации составляет 115 страниц машинописного текста, в том числе иллюстративный материал в виде 14 рисунков и 7 таблиц, а также список литературы, состоящий из 339 отечественных и зарубежных научных источников.

Во **введении** обоснована актуальность темы исследования, раскрыта степень разработанности научной проблемы, сформулированы цель и задачи исследования, определены научная новизна и практическая значимость работы, сформулированы положения выносимые на защиту, а также степень достоверности результатов и личный

вклад автора. В актуальности темы исследования автор рассматривает ключевые аспекты криоповреждений (двухфакторная гипотеза Мазура и уточнения применительно к сперматозоидам) и подчеркивает роль холестерина как одного из ключевых регуляторов стабильности мембран и текучести липидного бислоя.

В первой главе представлен подробный обзор отечественной и зарубежной литературы, посвящённой биофизике мембран, роли холестерина, механизмам криоповреждений и современным методам повышения криотолерантности сперматозоидов. Автор демонстрирует глубокое понимание данной области и грамотно формулирует проблематику исследований.

В разделе «материалы и методы» подробно описаны применяемые в работе экспериментальные подходы: обработка сперматозоидов, методы модификации содержания холестерина в мембранах сперматозоидов, различные подходы к количественному определению холестерина, протоколы замораживания и размораживания сперматозоидов, методики оценки концентрации, подвижности и жизнеспособности сперматозоидов. Методики исследования подробны, корректны и соответствуют современным стандартам. Автор использовал колориметрические методы (ФКД, Либермана-Бурхарда), высокоэффективную хроматографию, ИК-Фурье-спектроскопию, ЭПР-спектроскопию, а также методы клинической андрологии, такие как центрифугирование в градиенте плотности, Vital screen и оценка фрагментации ДНК с помощью метода прямого мечения разрывов ДНК TUNEL. Для статистической обработки данных были применены критерии Шапиро-Уилка, t-критерий Стьюдента, критерии Фридмана и Уилкоксона, χ^2 Пирсона, а также метод ранговой корреляции Спирмена.

Третья глава диссертационного исследования посвящена описанию результатов собственного исследования автора диссертации и их обсуждению. В данной главе представлены данные по влиянию криоконсервации на фрагментацию ДНК сперматозоидов. Показано, что использование криопротекторной среды позволяет снизить процент сперматозоидов с фрагментацией ДНК непосредственно на момент размораживания. Однако в динамике скорость нарастания фрагментации ДНК в данной группе превосходит данный показатель в группе, в которой образцы эякулята замораживались без криопротекторной среды. Выдвинута гипотеза о различиях в основных механизмах повреждений ДНК в группе с использованием криопротекторной среды и без нее. Исследована цитотоксичность метил- β -циклодекстринов и их комплексов с холестерином в отношении сперматозоидов человека. Автор приводит количественные данные о цитотоксичности метил- β -циклодекстринов, а так же о дозозависимой экстракции

холестерина из мембран сперматозоидов. Методом спиновых зондов показано, что удаление холестерина из мембран сперматозоидов с помощью метил- β -циклодекстринов приводит к увеличению подвижности молекул зонда 5-доксил стеарата в мембранах сперматозоидов. Установлено, что инкубация сперматозоидов с комплексами метил- β -циклодекстринов с холестерином приводит к дозозависимому повышению концентрации холестерина в мембранах сперматозоидов с выходом на насыщение. Автор отмечает, что аналогичный вид зависимости – монотонный рост с насыщением – наблюдается в работах по насыщению холестерином мембран сперматозоидов жеребцов и быков.

Продемонстрировано, что предварительная инкубация сперматозоидов человека с комплексами метил- β -циклодекстринов с холестерином приводит к повышению криотерантности сперматозоидов, выражающемуся в достоверном повышении индекса подвижности и индекса жизнеспособности сперматозоидов после размораживания. Определена оптимальная концентрация комплексов метил- β -циклодекстринов с холестерином. Методом рентгеноструктурного анализа показано, что добавление метил- β -циклодекстринов и их комплексом с холестерином к криопротекторной среде не приводит к изменению среднего размера кристаллов, образующихся в процессе криоконсервации, на основании чего автором сделан вывод, что 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.

Результаты сопоставлены с литературными данными, обоснованы выявленные закономерности, рассмотрены механизмы действия холестерина и циклодекстринов.

Заключения и выводы отражают основные достижения работы и подтверждают выполнение поставленных задач. Структура диссертации логична, последовательна и обеспечивает ясность представленных результатов. Достоверность полученных результатов обеспечивается: воспроизводимостью экспериментов, использованием нескольких независимых аналитических методов, статистической обработкой по современным стандартам, согласованием результатов с литературными данными. Автореферат в полной мере отражает основные методы и результаты диссертационной работы.

Достоинства работы

Глубокая проработка литературы по криобиологии, особенностям сперматозоида как объекта криобиологии, биофизике мембран и роли холестерина в мембране сперматозоидов; использование широкого спектра современных методов; практическая применимость полученных результатов для ВРТ.

Вопросы и замечания по работе.

- 1) С.14 Автор пишет: "Фактическое отсутствие внутриклеточного льда в сперматозоидах в широком диапазоне скоростей охлаждения..." Есть ли причина отсутствия внутриклеточного льда в сперматозоидах в широком диапазоне скоростей охлаждения?
- 2) С.36 Автор пишет: "Добавление яичного желтка приводит к увеличению размера и значительному изменению формы кристаллов льда, образующихся при замерзании раствора [239]." Если размер кристаллов льда возрастает, то это повышает вероятность повреждения клетки по причине первого фактора, в гипотезе, предложенной П. Мазуром? Как это согласуется с тем, что желток используется в криоконсервации спермы животных? Как меняется форма кристаллов льда при добавлении яичного желтка?
- 3) С.40, Есть ли информация по составу криопротекторной среды Sperm Freeze (SF)?
- 4) С.70, Рисунок 8, С.76, Рисунок 11 –отсутствуют доверительные интервалы.
- 5) С.88, Автор пишет: "увеличение концентрации холестерина в липосомах вызывает повышение микровязкости липидного окружения зонда." Было бы интересно узнать мнение автора о возможности использования Бриллюэновской микроскопии [Handler, C., Zanini, G., Smith, I.M. et al. Cellular mechanical properties in response to environmental viscosity imaged by Brillouin Microscopy. Commun Biol 8, 1645 (2025)] и флуоресцентной время-разрешенной микроскопии для измерения микровязкости [Paez-Perez, M., & Kuimova, M. K. (2024). Molecular rotors: fluorescent sensors for microviscosity and conformation of biomolecules. Angewandte Chemie, 136(6), e202311233.] для измерения микровязкости и сравнить данный подход с применяемым в работе анализом ЭПР спектров спиновых зондов.

Указанные Выше вопросы и замечания не снижают положительного впечатления о работе и носят характер пожеланий на будущее.

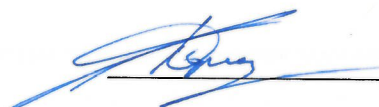
Диссертация Мироновой Анны Геннадьевны «Влияние холестерина на криотолерантность сперматозоидов человека» представляет собой законченную научно-квалификационную работу, содержащую решение актуальной научной задачи и обладающую научной новизной и практической значимостью. По содержанию, структуре, уровню экспериментальной проработки и научной значимости результатов диссертационная работа Мироновой А.Г. соответствует требованиям ВАК РФ к кандидатским диссертациям по специальности 1.5.2 – Биофизика.

Диссертационная работа А.Г.Мироновой «Влияние холестерина на криотолерантность сперматозоидов человека» несомненно полностью соответствует всем требованиям («Положение о порядке присуждения ученых степеней» Постановления Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. N 842 в действующей редакции от 01 октября 2018 г.), предъявляемым к научным диссертациям, а ее автор, Миронова Анна Геннадьевна, заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности по специальности 1.5.2. Биофизика.

Даю согласие на обработку моих персональных данных, а именно, совершение действий, предусмотренных Федеральным законом от 27 июля 2006 года № 152-ФЗ «О персональных данных».

Официальный оппонент:

Горин Дмитрий Александрович

 / Горин Д.А.
28.11.2025

Доктор химических наук, профессор,
профессор лаборатории фотоники
Центра фотоники и фотонных технологий
Сколковского института науки и технологий.

Подпись сотрудника Центра фотоники
и фотонных технологий Сколтеха
Горина Дмитрия Александровича заверяю.

Контактные данные:

Тел.: +7 (495) 280-14-81,
e-mail: d.gorin@skoltech.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом

защищена диссертация: 02.00.04. Физическая химия

Адрес места работы:

121205, Российская Федерация, г. Москва, Большой бульвар д. 30, стр. 1


РУКОВОДИТЕЛЬ ОТДЕЛА
КАДРОВОГО АДМИНИСТРИРОВАНИЯ
Гук О.С.

