

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.

Диссертация А.Г.Мироновой посвящена решению одной из важных научно-прикладных задач биофизики и биологии клетки, связанной с оптимизацией условий криоконсервации сперматозоидов человека и сохранения их физиологической активности.

Актуальность темы исследования. Криоконсервация сперматозоидов является неотъемлемой частью современной репродуктивной медицины и широко используется в программах вспомогательных репродуктивных технологий. Несмотря на значительные достижения криобиологии, эффективность замораживания сперматозоидов остается низкой. Одним из основных факторов, определяющих криотолерантность, является структурно-функциональное состояние мембраны, в частности содержание холестерина, влияющего на ее микровязкость и устойчивость к физико-химическим воздействиям.

Диссертация Мироновой А.Г. посвящена изучению роли холестерина в обеспечении структурной стабильности мембран сперматозоидов человека при криоконсервации и разработке методов направленной модификации липидного состава мембраны с целью повышения выживаемости клеток после размораживания. Тематика работы актуальна, имеет выраженную междисциплинарную направленность, соединяя биофизические, биохимические и прикладные аспекты репродуктивной биологии.

Научная новизна. Диссертация Мироновой А.Г. характеризуется научной новизной. Автором показано, что метилированные β -циклодекстрины обладают выраженной цитотоксичностью по отношению к сперматозоидам человека вследствие экстракции мембранного холестерина, тогда как их комплексы с холестерином демонстрируют значительно меньшую токсичность и обеспечивают дозозависимое повышение содержания холестерина в мембране, что открывает возможность их практического использования как средства направленной модификации липидного состава клеточных мембран. Определена оптимальная концентрация комплексов метил- β -циклодекстрины-холестерин, обеспечивающая максимальное повышение показателей подвижности и жизнеспособности сперматозоидов человека после размораживания. Это имеет непосредственное практическое значение для разработки оптимизированных протоколов криоконсервации.

Структура и содержание диссертации. Настоящая работа имеет традиционную структуру, которая включает следующие разделы: введение, обзор литературы (глава 1), материалы и методы (глава 2), результаты и обсуждения (глава 3), заключение, основные

результаты и выводы, список сокращений и условных обозначений и список литературы. Диссертация изложена на 115 страницах и содержит 7 таблиц и 14 рисунков. Рисунки наглядны и хорошо иллюстрируют полученные результаты. Список литературы включает 339 источников по 2025 год включительно.

Во введении обоснована актуальность темы исследования, дана краткая характеристика состояния проблемы, сформулированы цель и задачи работы, отмечается научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования, сформулированы положения, выносимые на защиту, кратко описаны используемые методы исследования, описывается личный вклад диссертанта, достоверность результатов, перечислены научные конференции, на которых работа прошла апробацию, приводится количество публикаций, объем и структура диссертации.

Глава 1 представляет собой обширный обзор общедоступной научной литературы, состоящий из нескольких тематических подразделов. Рассмотрены особенности сперматозоида как объекта криобиологии. Подробно описана структура липидного бислоя биологических мембран. Особое внимание уделено роли холестерина в латеральной организации липидного бислоя и определении основных физико-химических свойств мембраны. Приведены данные о влиянии холестерина на структурные переходы в липидной мембране и степень кооперативности фазового перехода. Описаны особенности липидного состава мембраны сперматозоидов и функции холестерина в мембране сперматозоидов. Дан обзор литературы, посвященный методам модификации липидного состава мембран сперматозоидов. Подробный и квалифицированный обзор свидетельствует о глубоком знании автором научной литературы, на основе которой логично выстроено исследование, выполненное в ходе работы над диссертацией.

В главе 2, посвященной описанию материалов и методов исследования, в первом разделе приведен список используемых реактивов. Далее изложены методологические подходы, применявшиеся в работе. Приведено описание методов обработки эякулята, оценки подвижности, концентрации и жизнеспособности сперматозоидов. Описан протокол криоконсервации сперматозоидов. Представлен протокол оценки фрагментации ДНК сперматозоидов. Подробно описаны четыре различных аналитических метода определения концентрации холестерина. Даны описания методики приготовления липосом с различным содержанием холестерина и ЭПР-спектроскопии. Методические подходы описаны очень подробно и легко могут быть воспроизведены.

В главе 3 представлены результаты и обсуждения. Раздел 3.1 посвящен анализу степени фрагментации ДНК сперматозоидов в нативных образцах и образцах после криоконсервации с использованием криопротекторной среды и без неё. На основании

полученных результатов автором выдвинута научная гипотеза о различии в механизмах повреждения ДНК сперматозоидов при криоконсервации с использованием и без использования криопротекторной среды. Раздел 3.2 посвящен модификации криопротекторной среды яичным желтком. Установлено, что добавление яичного желтка в криопротекторную среду позволяет статистически значимо повысить индекс подвижности сперматозоидов после размораживания. Раздел 3.3 посвящен определению концентрации холестерина в мембранах сперматозоидов. Для определения концентрации холестерина в мембранах сперматозоидов проведено сравнение четырех методов количественного анализа холестерина (Либермана-Бурхарда, ИК-спектроскопия, ВЭЖХ и ФКД) на предмет возможности и удобства их использования в лаборатории вспомогательных репродуктивных технологий. Раздел 3.4 посвящен оценке цитотоксичности случайно метилированных β -циклодекстринов и их комплексов с холестерином в отношении сперматозоидов человека. Показано, что случайно метилированные β -циклодекстрины обладают выраженной цитотоксичностью в отношении сперматозоидов человека. С увеличением концентрации метил-бета-циклодекстринов в среде наблюдалось пропорциональное возрастание уровня «свободного» (не мембранного) холестерина, что свидетельствует о его экстракции из мембраны. На основании полученных данных был сделан обоснованный вывод о том, что токсическое действие циклодекстринов связано преимущественно с их способностью извлекать холестерин из клеточных мембран. Раздел 3.6 посвящен исследованию модельной системы (липосомы с различным содержанием холестерина). В этой системе было изучено, как холестерин влияет на спектры ЭПР зонда 5-доксил стеарата (5-ДС), включенного в липидный бислой липосом. Установлено, что повышение концентрации холестерина в мембране приводит к снижению скорости вращения зонда. В разделе 3.7 исследовано влияние случайно метилированных β -циклодекстринов на спектры ЭПР зонда 5-ДС в мембране сперматозоидов человека. Продemonстрировано, что уменьшение содержания холестерина в мембранах сперматозоидов под действием случайно метилированных β -циклодекстринов приводит к увеличению подвижности молекул спинного зонда. Раздел 3.8 посвящен насыщению мембраны сперматозоидов холестерином с помощью комплексов метилированных β -циклодекстринов с холестерином. Показано, что по мере увеличения концентрации комплексов метилированных β -циклодекстринов с холестерином в среде инкубации содержание холестерина в мембранах сперматозоидов возрастает и выходит на насыщение. Следующий раздел (3.10.) посвящен определению оптимальной концентрации комплексов метилированных β -циклодекстринов с холестерином для повышения криотолерантности сперматозоидов человека. Установлено, что инкубация сперматозоидов человека с

комплексами метилированных β -циклодекстринов с холестерином для (2 мг/мл) перед криоконсервацией приводит к статистически значимому повышению индекса подвижности сперматозоидов и индекса жизнеспособности сперматозоидов после размораживания по сравнению с контролем. Основным механизмом криопротекторного действия холестерина в мембране клеток традиционно считается стабилизация липидного бислоя: холестерин уменьшает вероятность появления структурных дефектов мембраны при охлаждении и нагревании, снижает ее проницаемость для воды и ионов. Помимо описанного классического криозащитного механизма, автор на основании литературных данных предполагает 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 активных форм кислорода (АФК). Второй, «сакрификационный», механизм реализуется при высоком уровне АФК: в этих условиях холестерин может выступать в качестве мишени для АФК, препятствуя инициации цепных свободнорадикальных процессов, приводящих к лавинообразному повреждению мембран. И, наконец, в последней части третьей главы (3.11.) методом рентгеноструктурного анализа проведена оценка кристаллообразования в криопротекторной среде после добавления метилированных β -циклодекстринов и их комплексов с холестерином. Продемонстрировано, что добавление метилированных β -циклодекстринов и их комплексов с холестерином в криопротекторную среду не оказывает влияния на средний размер образующихся кристаллов льда. На основании полученных результатов 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.

Заключение и выводы, представленные в тексте диссертации, соответствуют цели и задачам исследования, отражают полученные автором результаты, основываются на достаточном экспериментальном материале и не противоречат литературным данным по соответствующей тематике.

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.

Достоверность, новизна, теоретическая и практическая значимость представленных результатов не вызывают сомнений. Работа производит хорошее впечатление. Диссертация написана ясным и грамотным языком, аккуратно оформлена. Принципиальных замечаний

к работе Мироновой Анны Геннадьевны нет, однако имеются минорные комментарии и вопросы дискуссионного характера.

1. В разделе, посвященном влиянию метилированных β -циклодекстринов (гл. 3.4), автор отмечает дозозависимую цитотоксичность циклодекстринов в отношении сперматозоидов человека. Было бы целесообразно уточнить диапазон «безопасных» концентраций, что было бы полезно для практического применения.

2. Хотя в диссертации отражена роль АФК в повреждении сперматозоидов при криоконсервации, а также обсуждаются антиоксидантное действие холестерина, однако в литобзоре было бы желательно сравнить это действие с другими антиоксидантами.

3. Было бы целесообразно дополнить обсуждение структурных изменений в мембранах сперматозоидов при варьировании содержания холестерина. Возможно, стоит привлечь данные дифференциально сканирующей калориметрии или флуоресцентных зондов для верификации переходов «жидкий кристалл-гель».

4. Автор отмечает улучшение показателей подвижности и жизнеспособности сперматозоидов, но в диссертации не приведены данные об изменениях функциональной активности клеток (способности к капацитации и акросомальной реакции). Известно, что высокая концентрация холестерина ингибирует капацитацию и, как следствие, акросомальную реакцию, что может привести к утрате оплодотворяющего потенциала сперматозоидов.

Отмеченные выше вопросы и комментарии носят уточняющий и дискуссионный характер, они не ставят под сомнение обоснованность научных положений и выводов и не влияют на общую положительную оценку работы.

Не сомневаюсь, что диссертационная работа А.Г.Мироновой «Влияние холестерина на криотолерантность сперматозоидов человека» 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 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

« 4 » декабря 2025 г. *Шумаев*

Шумаев Константин Борисович

Доктор биологических наук, старший научный сотрудник
Лаборатории биохимии азотфиксации и метаболизма азота
Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального
государственного учреждения «Федеральный исследовательский
центр «Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук»

Подпись д.б.н. Шумаева К.Б. заверяю,
Учёный секретарь ФИЦ Биотехнологии РАН
кандидат биологических наук



Орловский Орловский А.Ф.

Контактные данные:

Тел.: +7(916)642-14-19, e-mail: tomorov@mail.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена докторская диссертация: 03.01.04. Биохимия

Адрес места работы:

119071 Российская Федерация, г. Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2