

УТВЕРЖДАЮ

И.о. генерального директора
ФГБУ «НМИЦ АГП
им. В.И. Кулакова»
Минздрава России
академик РАН, профессор



Г.Т. Сухих
2025 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации на диссертацию Мироновой Анны Геннадьевны «Влияние холестерина на криотолерантность сперматозоидов», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика

Актуальность проблемы

Диссертационная работа Мироновой Анны Геннадьевны, представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, посвящена чрезвычайно важной проблеме криобиологии и репродуктивной медицины — повышению эффективности криоконсервации сперматозоидов человека. Актуальность исследования обусловлена низкой выживаемостью сперматозоидов после криоконсервации (40-60% подвижных клеток), необходимостью разработки новых мембраностабилизирующих технологий и потребностью клинической практики в оптимизации протоколов криоконсервации мужских половых клеток.

Одним из ключевых факторов, определяющих устойчивость гамет к воздействию низких температур, является липидный состав мембраны. Модификация содержания холестерина рассматривается как перспективный способ повышения криотолерантности сперматозоидов, однако для сперматозоидов человека данные о влиянии таких изменений липидного состава ограничены. Изучение возможности целенаправленного изменения состава мембранных липидов имеет теоретическую и практическую ценность и может стать основой для разработки новых криопротекторных сред с направленным мембранопротекторным действием.

Целью исследования является разработка методов оптимизации технологии криоконсервации сперматозоидов человека, основанная на изучении

механизмов криповреждений, и создание подходов к повышению криотолерантности сперматозоидов человека с использованием мембраностабилизирующих компонент.

Содержание работы. Диссертация Мироновой Анны Геннадьевны построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, главы с описанием результатов работы, заключения, раздела с выводами, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы (339 источников). Работа изложена на 115 страницах машинописного текста, содержит 7 таблиц и 14 рисунков. В автореферате изложены все основные положения диссертации.

Во **введении** обоснована актуальность выбранного направления исследования. Формируются цель и задачи работы. Охарактеризована научная новизна, практическая значимость работы, методология исследования, а также положения, выносимые на защиту. Отмечен личный вклад автора и обоснована степень достоверности результатов. Дана информация об апробации результатов исследования.

В **первой главе** представлен обзор литературы, в котором рассмотрены основные представления современной криобиологии и особенности сперматозоида как объекта криобиологии. Подробно описаны строение и свойства липидного бислоя клеточной мембраны. На примере модельных систем показана роль холестерина в упорядочении фосфолипидных цепей липидов, регулировании текучести и гидрофобности мембран. Рассмотрено влияние холестерина на фазовые переходы в липидных бислоях, а также особенности липидного состава мембран сперматозоидов и функции холестерина в их мембранах. Отдельно описаны способы модификации липидного состава мембран, что логично подводит к экспериментальной части исследования.

Вторая глава посвящена экспериментальным методам, на которых базируется диссертационная работа. Представлены методы обработки эякулята, оценки концентрации, подвижности, жизнеспособности и фрагментации ДНК сперматозоидов. Описан протокол криоконсервации сперматозоидов, а также протоколы модификации криопротекторной среды яичным желтком и комплексами метил- β -циклодекстринов с холестерином. Развернуто представлены методы количественного определения холестерина (метод Либермана-Бурхарда, высокоэффективная жидкостная хроматография, ИК-спектроскопия, ферментативно-колориметрическая детекция). Подробно описан классический подход к изучению физических свойств липидных мембран – метод спиновых зондов.

В **третьей главе** представлено описание полученных результатов и их обсуждение. Исследовано влияние криоконсервации на целостность ДНК сперматозоидов. Показано, что применение криопротекторной среды на основе глицерола и сахарозы позволяет снизить (в среднем на 6,5 %) уровень прямых повреждений ДНК сперматозоидов на этапе замораживания/оттаивания по сравнению с соответствующим показателем в образцах, замороженных без криопротекторной среды. Выдвинута научная гипотеза, что нарастание фрагментации ДНК в посткриогенном периоде указывает на наличие отсроченных

механизмов повреждений, связанных с сублетальными повреждениями клеточных структур сперматозоидов (в частности, митохондрий) и окислительным стрессом. Представлены данные по использованию яичного желтка и комплексов метил- β -циклодекстринов с холестерином для повышения криотолерантности сперматозоидов. Установлено, что включение яичного желтка (в концентрации 5,6 мг/мл) в криопротекторную среду на основе глицерола и сахарозы обеспечивает сохранение более высокого (статистически значимого) индекса подвижности криоконсервированных сперматозоидов по сравнению с контрольными образцами (в отсутствии яичного желтка). Продемонстрировано дозозависимое улучшение криотолерантности сперматозоидов человека при обработке комплексами метил- β -циклодекстринов с холестерином, определена оптимальная концентрация комплексов (2 мг/мл) для повышения доли прогрессивно подвижных и жизнеспособных сперматозоидов. Показано, что инкубация сперматозоидов с комплексами метил- β -циклодекстринов с холестерином вызывает дозозависимое повышение содержания холестерина в мембранах сперматозоидов с последующим выходом на плато. Проведена оценка цитотоксичности метил- β -циклодекстринов и их комплексов с холестерином.

Показано, что метил- β -циклодекстрины обладают выраженной дозо- и времязависимой цитотоксичностью в отношении сперматозоидов человека, связанной с экстракцией мембранного холестерина. Установлено, что комплексы метил- β -циклодекстринов с холестерином характеризуются существенно меньшей цитотоксичностью. Продемонстрировано, что инкубация сперматозоидов с метил- β -циклодекстринами приводит к изменению морфологии сперматозоидов: хвосты сперматозоидов закручиваются. С помощью метода спиновых зондов исследовано влияние холестерина на структурные свойства мембраны сперматозоидов. Установлено, что экстракция холестерина из мембран сперматозоидов человека с помощью метил- β -циклодекстринов сопровождается увеличением подвижности спинового зонда 5-ДС, свидетельствующим, что удаление холестерина способствует уменьшению микровязкости липидного бислоя мембран сперматозоидов. Продемонстрировано, что интерпретация полученных данных подтверждается опытами с использованием модельной системы (липосомы с различным содержанием холестерина). Проведено тестовое определение концентрации холестерина в мембранах сперматозоидов с использованием четырех различных методов количественного определения холестерина (метод Либермана-Бурхарда, высокоэффективная жидкостная хроматография, ИК-спектроскопия, ферментативно-колориметрическая детекция). Установлено, что средняя концентрация холестерина в мембранах сперматозоидов человека, определенная с помощью ИК-спектроскопии, значительно превышает значения, полученные с использованием других методов, а также противоречит данным научной литературы. Кроме того, было показано, что данный метод не может использоваться в клинической практике, так как он требует большого объема образца (около 20 мл при среднем объеме одного эякулята, равном ~3,5 мл).

Завершают работу заключение и основные результаты и выводы, в которых изложены основные результаты работы. Представленные выводы

полностью соответствуют полученным результатам и подтверждают выдвинутые автором предположения.

Научная новизна исследований и полученных результатов

В представленной диссертационной работе автором получены новые данные, имеющие существенное значение для понимания механизмов взаимодействия метил- β -циклодекстринов с мембраной сперматозоидов человека. Показано, что метил- β -циклодекстрины обладают выраженной цитотоксичностью, связанной с экстракцией мембранного холестерина, тогда как их комплексы с холестерином характеризуются значительно меньшей цитотоксичностью. Автором впервые продемонстрировано, что инкубация сперматозоидов человека с комплексами метил- β -циклодекстринов с холестерином приводит к дозозависимому увеличению содержания холестерина в мембранах, сопровождающемуся последующим повышением криотолерантности клеток. Определена оптимальная концентрация комплексов, обеспечивающая повышение доли прогрессивно подвижных и жизнеспособных сперматозоидов после размораживания. Экспериментальные исследования, выполненные на сперматозоидах человека, показали, что экстракция холестерина из мембран клеток при помощи метил- β -циклодекстринов сопровождается увеличением подвижности спинного зонда 5-ДС, что свидетельствует о снижении микровязкости липидного бислоя мембраны сперматозоидов. Интерпретация полученных результатов подтверждается опытами с использованием модельной системы (липосом с различным содержанием холестерина), что повышает достоверность выводов автора.

Теоретическая и практическая значимость работы

Среди различных подходов к повышению выживаемости сперматозоидов при криоконсервации особый интерес представляют компоненты, способные стабилизировать плазматическую мембрану. В данном диссертационном исследовании показано, что изменение содержания холестерина в мембранах сперматозоидов человека с использованием комплексов метил- β -циклодекстринов с холестерином позволяет повысить устойчивость клеток к повреждениям, вызванным замораживанием и оттаиванием. Полученные результаты создают основу для разработки новых криопротекторных сред, содержащих компоненты, направленные на стабилизацию плазматической мембраны сперматозоидов, и оптимизации протоколов криоконсервации сперматозоидов в клинической практике вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). Особое внимание привлекает продемонстрированная возможность управлять содержанием холестерина в мембранах сперматозоидов, что открывает перспективы не только для повышения их устойчивости к низким температурам, но и для экспериментального изучения роли липидного состава мембран в регуляции функциональной активности клеток. Материалы диссертации представлены в виде устных и стендовых докладов на российских и международных конференциях. Основные положения диссертационного исследования отражены в 9 научных публикациях: 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 полученных результатов не вызывает сомнений, поскольку работа выполнена с применением общепринятых физико-химических, биофизических и клинических методов. В ходе исследования использованы стандартные методики определения концентрации холестерина, классические подходы к изучению физических свойств липидных мембран (метод спиновых зондов), а также вспомогательные репродуктивные технологии. Обработка эякулята, его криоконсервация и последующий анализ параметров подвижности, концентрации и жизнеспособности сперматозоидов проводились с соблюдением методических требований. Результаты описаны детально, сопровождаются иллюстративным материалом. Достоверность результатов подтверждается статистической обработкой данных и соответствием полученных данным сведениям, представленным в современной научной литературе по теме исследования. Автореферат и опубликованные работы полностью отражают основные результаты, изложенные в диссертации.

Общие комментарии по работе

Диссертация и автореферат написаны грамотным научным языком и оформлены в соответствии с требованиями. В диссертации содержится обширный список литературы (339 источников), который свидетельствует о хорошем знакомстве с предметом и высоком профессионализме автора.

Замечания по работе носят в основном стилистический характер — в тексте диссертации иногда встречаются опечатки или неточности. Так, например, на стр. 6 и 7 допущены опечатки в словах «характеризуются» и «подтверждается». Желательно также было бы подробнее объяснить физический смысл параметра порядка S , используемый в работе для описания подвижности и ориентированности молекул зонда в мембране.

При этом, обозначенные выше замечания не имеют принципиального характера для оценки научной значимости работы Мироновой Анны Геннадьевны и не снижают общего положительного впечатления от работы, не умаляют ее достоинств и не ставят под сомнение обоснованность научных положений и выводов.

Содержание диссертации Мироновой Анны Геннадьевны «Влияние холестерина на криотолерантность сперматозоидов человека» соответствует паспорту специальности 1.5.2. Биофизика.

Заключение

Диссертационная работа Мироновой Анны Геннадьевны «Влияние холестерина на криотолерантность сперматозоидов» представляет собой законченную научно-квалификационную работу, в которой содержится решение задачи, имеющей важное научное и практическое значение для биологии и медицины. Диссертация отвечает требованиям п. 9–14 «Положения о присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства РФ от 24

сентября 2013 г. № 842 с изменениями Постановления Правительства РФ от 21 апреля 2016 г. № 335, в ред. Постановления Правительства РФ от 01 октября 2018 г. № 1168), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Миронова Анна Геннадьевна заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2-Биофизика.

Отзыв подготовлен ведущим научным сотрудником отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова института репродуктивной медицины ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России, доктором биологических наук (03.03.04. – клеточная биология, цитология, гистология; 03.03.05. Биология развития, эмбриология) Макаровой Натальей Петровной.

Отзыв обсужден и одобрен на совместном заседании институтов репродуктивной медицины и трансляционной медицины ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России 11 ноября 2025 г., протокол № 58.

Доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник
отделения вспомогательных технологий
в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова
института репродуктивной медицины
ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова»
Минздрава России


Наталья Петровна Макарова

Подпись д.б.н. Н.П. Макаровой заверяю:
Ученый секретарь
ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова»
Минздрава России,
кандидат медицинских наук, доцент



Станислав Владиславович Павлович

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Почтовый адрес: 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4

Телефон: +7 (495) 531 44 44;

Адрес электронной почты: secretariat@oparina4.ru; <https://ncagp.ru>