

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

О соответствии диссертационной работы «Влияние холестерина на криотолерантность сперматозоидов человека» Мироновой Анны Геннадьевны профилю диссертационного совета 24.1.038.01 и требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям.

Комиссия в составе д.б.н., проф. Пальминой Надежды Павловны, д.б.н., проф. Розенфельда Марка Александровича и д.б.н. Донцова Александра Евгеньевича констатирует, что диссертационная работа «Влияние холестерина на криотолерантность сперматозоидов» по теме, постановке задач, методам исследования и полученным результатам соответствует специальности 1.5.2. Биофизика (биологические науки).

Комиссия отмечает следующие **основные научные результаты** диссертационной работы и ее **новизну**:

Исследование Мироновой А.Г. направлено на разработку методов оптимизации технологии криоконсервации сперматозоидов человека, основанную на изучении механизмов криоповреждений и создании подходов к повышению криотолерантности сперматозоидов человека с использованием мембраностабилизирующих компонент. 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 Sperm Freeze обеспечивает сохранение более высокого (статистически значимого) индекса подвижности криоконсервированных сперматозоидов по сравнению с контрольными образцами (в отсутствие яичного желтка). Продemonстрировано 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.

В работе Мироновой А.Г. впервые показано, что инкубация сперматозоидов человека 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. Впервые 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. Впервые продемонстрировано, что инкубация сперматозоидов человека с метил- β -циклодекстринами приводит к изменению их морфологии: хвосты сперматозоидов закручиваются. С помощью метода спиновых зондов исследовано влияние холестерина на структурные свойства мембраны сперматозоидов. Впервые 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. Продemonстрировано, что интерпретация полученных данных подтверждается опытами с использованием модельной системы (липосомы с различным содержанием холестерина).

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 спиновых 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.

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.

Основные результаты диссертационной работы изложены в статьях автора, опубликованных в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК РФ:

1. Симоненко, Е.Ю. Влияние температуры хранения и условий криоконсервации на степень фрагментации ДНК сперматозоидов человека / Е.Ю. Симоненко, С.Б. Гармаева, С.А. Яковенко, А.А. Григорьева, В.А. Твердислов, А.Г. Миронова, В.П. Апрышко // Биофизика. – 2016. – Т. 61, № 2. – С. 201-208;

2. Миронова, А.Г. Использование комплексов включения холестерина на основе произвольно метилированных бета-циклодекстринов для повышения криотолерантности сперматозоидов человека / А.Г. Миронова, С.И. Афанасьева, С.А. Яковенко, А.Н. Тихонов, Е.Ю. Симоненко // Биофизика. – 2024. – Т. 69, № 6. – С. 1390-1401;

3. Миронова, А.Г. Сравнение методов определения концентрации холестерина в мембране сперматозоидов человека для экспресс-анализа в условиях клинической лаборатории / А.Г. Миронова, С.И. Афанасьева, А.В. Сыбачин, В.В. Спиридонов, М.А. Большаков, Е.Ю. Симоненко // Биоорганическая химия. – 2025. – Т. 51, № 1. – С. 43-50;

4. Миронова, А.Г. Влияние холестерина на мембраны сперматозоидов: исследование с помощью спиновых зондов / А.Г. Миронова, Б.В. Трубицин, Е.Ю. Симоненко, А.В. Сыбачин, С.А. Яковенко, А.Н. Тихонов // – Биофизика – 2025 – Т. 70, № 4. – С. 704-714.

Помимо данных публикаций, автором опубликованы 2 статьи в сборниках трудов научных конференций, 3 работы в сборниках тезисов научных конференций.

Публикации основных научных результатов диссертации соответствуют требованиям пунктов 11 и 13 «Положения о присуждении ученых степеней» (утверждено

Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 с изменениями Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335, в ред. Постановления Правительства РФ от 01.10.2018 г. № 1168).

Диссертация Мироновой А.Г. отвечает требованиям пунктов 9, 14 «Положения о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, в ред. Постановления Правительства РФ от 01.10.2018 г. № 1168).

Диссертация не содержит заимствованных материалов и результатов без ссылок на авторов и источники заимствования. В диссертации даны ссылки на результаты работ, выполненных Мироновой А.Г. в соавторстве с д.ф.-м.н.Тихоновым А.Н., д.ф.-м.н. Твердисловым В.А., к.ф.-м.н. Симоненко Е.Ю., к.ф.-м.н. Яковенко С.А., к.ф.-м.н. Трубициным Б.В., к.х.н. Сыбачиным А.В., к.х.н. Спиридоновым В.В., к.б.н. Большаковым М.А., к.б.н. Апрышко В.П., к.б.н. Кириенко К.В., Григорьевой А.А., Гармаевой С.Б., Смоленцевой Д.А. и Афанасьевой С.И.

На основании выше изложенного комиссия рекомендует диссертационному совету 24.1.038.01 принять к защите диссертационную работу Мироновой Анны Геннадьевны «Влияние холестерина на криотолерантность сперматозоидов человека» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика.

Комиссия рекомендует утвердить в качестве официальных оппонентов:

— доктора биологических наук **Шумаева Константина Борисовича**, старшего научного сотрудника лаборатории биохимии азотфиксации и метаболизма азота Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН)

— доктора химических наук, профессора **Горина Дмитрия Александровича**, руководителя лаборатории биофотоники Центра фотоники и фотонных технологий Сколковского института науки и технологий (Сколтех).

В качестве ведущей организации – Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова»).

Председатель комиссии:

д.б.н., профессор

Пальмина Н.П.

Члены комиссии:

д.б.н., профессор

Розенфельд М. А.

д.б.н.

Донцов А.Е.