

УТВЕРЖДАЮ:

Заместитель директора по науке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им.

Н.М. Эмануэля

Российской академии наук,

д.х.н. Трофимов А.В.



А. Трофимов

«09» октября 2025 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук

Диссертация «Влияние холестерина на криотолерантность сперматозоидов человека» выполнена Мироновой Анной Геннадьевной в лаборатории фото- и хемилюминесцентных процессов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук (ИБХФ РАН).

В период подготовки диссертации с 03.02.2014 по 11.02.2025 соискатель Миронова Анна Геннадьевна работала эмбриологом в ООО «ЭКО ЦЕНТР» (03.02.2014–01.06.2017 – эмбриолог; 01.06.2017–01.02.2018 – старший эмбриолог; 01.02.2018–11.02.2025 – ведущий эмбриолог), 10.03.2025 – по настоящее время Миронова А. Г. работает эмбриологом в ООО «МЕДИЦИНА БУДУЩЕГО».

В 2013 году Миронова А. Г. окончила Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», физический факультет, кафедру биофизики. С 16 октября 2017 года по 15 октября 2021 года обучалась в аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук по специальности 1.5.2. Биофизика.

Справка № 168 о сдаче кандидатских экзаменов выдана «15» сентября 2025 года Федеральным государственным бюджетным учреждением науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук.

Научный руководитель: Тихонов Александр Николаевич, доктор физико-математических наук, профессор кафедры биофизики Физического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.

Ломоносова»; главный научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук (по совместительству).

Тема диссертационной работы и научный руководитель утверждены на заседании Ученого совета ИБХФ РАН 28 июня 2018 года, протокол №32.

По результатам рассмотрения диссертации «Влияние холестерина на криотолерантность сперматозоидов человека» принято следующее заключение.

Оценка выполненной работы

Диссертация Мироновой А. Г. является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании полученных автором результатов исследований разработаны положения, имеющие научное и практическое значение. Диссертационная работа соответствует требованиям, предъявляемым ВАК РФ к диссертациям на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.2. Биофизика.

Актуальность работы

Криоконсервация сперматозоидов является важной составляющей современной репродуктивной медицины, широко применяемой в программах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) при необходимости долгосрочного хранения гамет, а также для создания банков донорской спермы. Несмотря на значительный прогресс в области криобиологии в целом, эффективность криоконсервации сперматозоидов остаётся довольно низкой. После размораживания 40–60 % сперматозоидов от изначального количества подвижных клеток в нативном образце утрачивают свою подвижность, что является особенно критичным при заморозке малого числа клеток. Классическая двухфакторная гипотеза, сформулированная П. Мазуром, предполагает, что гибель клеток при замораживании обусловлена двумя альтернативными механизмами: образованием внутриклеточного льда при высокой скорости охлаждения и дегидратацией — при низкой. Однако для сперматозоидов данная модель требует уточнения. С использованием криосканирующей электронной микроскопии Д. Моррис и соавторы показали, что независимо от скорости заморозки в сперматозоидах не образуется внутриклеточный лед. Фактическое отсутствие внутриклеточного льда делает преимущественным механизм повреждения, связанный с деструктивными осмотическими и структурными («фазовыми») эффектами в мембранах.

В ряде исследований, проведённых на сперматозоидах разных видов млекопитающих, было установлено, что предварительная инкубация сперматозоидов с холестерин-циклодекстриновыми комплексами способствует увеличению доли жизнеспособных и доли прогрессивно подвижных сперматозоидов после криоконсервации. Однако в отношении сперматозоидов человека проблема

модификации липидного состава мембран изучена менее полно, что препятствует широкому внедрению данных технологий в клиническую практику. Для повышения эффективности криоконсервации сперматозоидов человека необходимо было детальнее изучить возможность использования ЯЖ и комплексов циклодекстрины-холестерин в качестве модификаторов липидного состава мембран сперматозоидов, а также оценить структурные изменения мембран сперматозоидов при варьировании содержания в них холестерина. Эти данные необходимы для создания нового поколения криопротекторных сред, обладающих направленным мембранопротекторным действием и обеспечивающих более высокие показатели выживаемости сперматозоидов человека после криоконсервации.

Личный вклад автора

Изложенные в диссертации результаты исследования получены соискателем самостоятельно или при его непосредственном участии. Соискатель принимал участие в приготовлении образцов, исследовании их характеристик, осуществлял обработку и анализ термоаналитических данных, совместно с научным руководителем занимался постановкой задач, интерпретацией полученных результатов, формулированием положений и выводов и подготовкой материалов публикаций.

Степень достоверности полученных 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.

Научная новизна и практическая значимость работы

Проведено сравнительное исследование методов количественного определения холестерина в мембранах сперматозоидов и обоснована целесообразность применения ферментативно-колориметрического метода в условиях лаборатории ВРТ. Показано, что метил- β -циклодекстрины обладают выраженной цитотоксичностью в отношении сперматозоидов человека, связанной с экстракцией мембранного холестерина. 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. На модельной системе (липосомы с различным содержанием холестерина) было показано, что присутствие холестерина в липосомах влияет на спектры ЭПР спинового зонда 5-доксил стеарата (5-ДС), растворённого в липидном бислое, вызывая увеличение микровязкости мембраны. 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.

Ценность научной работы заключается в создании основы 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.

Апробация работы

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. Основные результаты диссертационного исследования достаточно полно изложены в опубликованных работах.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, включенных в перечень ВАК:

1. Симоненко Е.Ю. Влияние температуры хранения и условий криоконсервации на степень фрагментации ДНК сперматозоидов человека / Симоненко Е.Ю., Гармаева С.Б., Яковенко С.А. Григорьева А.А., Твердислов В.А., Миронова А.Г., Апрышко В.П. // Биофизика. – 2016. – Т. 61, № 2. – С. 1–9;

Simonenko E.Y. Influence of Storage Temperature and Cryopreservation Conditions on the Extent of Human Sperm DNA Fragmentation / Simonenko E.Y., Garmaeva S.B., Yakovenko S.A., Grigorieva A.A., Tverdislov V.A., Mironova A.G., Aprishko V.P. // Biophysics. – 2016. – Vol. 61, №2. – Pp. 316–320;

2. Миронова А.Г. Использование комплексов включения холестерина на основе произвольно метилированных бета-циклодекстринов для повышения криотолерантности сперматозоидов человека / Миронова А.Г., Афанасьева С.И.,

Яковенко С.А., Тихонов А.Н., Симоненко Е.Ю. // Биофизика. – 2024. – Т. 69, № 6, С. 1390-1401;

Mironova, A.G. The use of cholesterol inclusion complexes based on randomly methylated beta-cyclodextrins to improve human sperm cryotolerance / Mironova A. G., Afanasyeva S. I., Yakovenko S. A., Tikhonov A. N., Simonenko E. Yu. // Biophysics. – 2024. – Т. 69. – Рр. 1202–1212.

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

Mironova A.G. Comparison of methods for rapid determination of cholesterol concentration in human sperm membrane in clinical laboratory practice / Mironova A.G., Afanasyeva S.I., Sybachin A.V., Spiridonov V.V., Bolshakov M.A., Simonenko E.Yu // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. – 2025. – Vol. 51, № 1, Рр. 137-144;

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

Публикации в трудах конференций и съездов:

1. Криоконсервация гамет человека в присутствии криопротекторов, модифицированных яичным желтком / Григорьева А.А., Гармаева С.Б., Яковенко С.А., Симоненко Е.Ю., Твердислов В.А., Кириенко К.В., Миронова А.Г., Апрышко В.П. // Материалы конференции «Новейшие достижения и успехи развития естественных и математических наук» – 2016. – С. 28-32 (Краснодар);

2. Влияние температурных режимов на целостность ДНК сперматозоидов человека / Гармаева С.Б., Миронова А.Г., Симоненко Е.Ю., Яковенко С.А., Григорьева А.А., Твердислов В.А., Апрышко В.П. // статья в сборнике трудов конференции: «Труды XV ежегодной международной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы, Биохимическая физика» – 2016. – С. 34-37;

3. Влияние температуры хранения и условий криоконсервации на степень фрагментации ДНК и сперматозоидов человека / С.А. Яковенко, С.Б.Гармаева, А.Г.Миронова, Е.Ю.Симоненко, А.А.Григорьева, В.А.Твердислов, В.П.Апрышко // тезисы в сборнике трудов конференции: «V Съезд биофизиков России». – 2015. – Т.1, С.135 – 135; (Ростов-на-Дону);

4. Human gamets cryopreservation with cryoprotectant modified by egg yolk / A.A. Grigoreva., S.B. Garmaeva, E.Yu.Simonenko, A.G. Mironova, S.A. Yakovenko // материалы конференции «Book of abstracts of the 10th Leiden International (Bio)Medical Student Conference». – 2017. – P. 223;(Leiden);

5. Влияние добавления холестерина на выживаемость сперматозоидов после криоконсервации / Смоленцева Д.А., Миронова А.Г., Симоненко Е.Ю., Яковенко С.А.

// в сборнике трудов конференции: «VI съезд биофизиков России». – 2019. – Т. 1, С. 191-192. (Сочи);

Диссертационная работа «Влияние холестерина на криотолерантность сперматозоидов человека» Мироновой Анны Геннадьевны является законченным научно-квалификационным исследованием и соответствует требованиям пп. 9–14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года, с последующими изменениями. Диссертация рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика.

Заключение принято на заседании расширенного семинара по биофизике ИБХФ РАН 8 октября 2025 года.

Присутствовало на заседании 14 человек, из них 7 докторов наук, в том числе 5 докторов наук по специальности 1.5.2. Биофизика.

Результаты голосования: «за» – 14 чел., «против» – 0 чел., «воздержалось» – 0 чел., протокол № 1 от 8 октября 2025 года.

Председатель заседания:

доктор биологических наук, профессор,
главный научный сотрудник лаб.
физико-химических основ регуляции
биологических систем

Пальмина Надежда Павловна