

На правах рукописи



МИРОНОВА АННА ГЕННАДЬЕВНА

**ВЛИЯНИЕ ХОЛЕСТЕРИНА НА КРИОТОЛЕРАНТНОСТЬ  
СПЕРМАТОЗОИДОВ ЧЕЛОВЕКА**

Специальность 1.5.2. Биофизика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, г. Москва.

**Научный руководитель:** Тихонов Александр Николаевич,  
доктор физико-математических наук, профессор

**Официальные оппоненты:** 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» (ФИЦ Биотехнологии РАН)

Горин Дмитрий Александрович, доктор химических наук, профессор, профессор лаборатории биофотоники Центра фотоники и фотонных технологий Сколковского института науки и технологий (Сколтех)

**Ведущая организация:** 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»)

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2025 г. в \_\_ ч. \_\_ минут на заседании диссертационного совета 24.1.038.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук по адресу: 119334, Москва, ул. Косыгина, д. 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра химической физики им. Н.Н. Семёнова Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, Ленинский проспект, д. 38 и на сайте:

<https://biochemphysics.ru/ru/odissertaci/Диссертация%20Мироновой%20Анны%20Геннадьевны/>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2025 года

Ученый секретарь  
диссертационного совета 24.1.038.01,  
кандидат химических наук

Мазалецкая Л.И.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Криоконсервация сперматозоидов является важной составляющей современной репродуктивной медицины, широко применяемой в программах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) для 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 значительное количество сперматозоидов утрачивают свою подвижность и жизнеспособность, что является особенно критичным при заморозке малого числа клеток [1].

В соответствии с классической двухфакторной гипотезой, гибель клеток при замораживании обусловлена двумя альтернативными механизмами: образованием внутриклеточного льда при высокой скорости охлаждения и дегидратацией – при низкой [2]. Методом криосканирующей электронной микроскопии было показано, что независимо от скорости заморозки в сперматозоидах не образуется внутриклеточный лед [3]. Это позволяет предположить, что механизм криоповреждений связан преимущественно с деструктивными осмотическими и структурными эффектами в мембранах. При понижении температуры может изменяться структура липидного бислоя мембранны. При этом могут существовать области, в которых липиды находятся в жидкокристаллической и гелевой фазах, что может приводить к возникновению микродефектов и нарушению липид-белковых взаимодействий, обеспечивающих функциональную активность мембран. Степень криоповреждений зависит от скорости замораживания-оттаивания, типа и концентрации криопротекторов, фосфолипидного состава мембранны, степени гидратации, а также от содержания холестерина в мембране [4]. Осмотические процессы также могут приводить к повреждению мембран клеток.

Модификация состава мембранных липидов считается перспективным способом повышения криотолерантности сперматозоидов. Криопротекторные среды, которые используются для криоконсервации сперматозоидов человека, как правило, не содержат компонентов, направленных на стабилизацию клеточных мембран. В то же время в ветеринарной практике накоплен значительный опыт использования яичного желтка (ЯЖ), богатого фосфолипидами, холестерином и липопротеинами, в составе криопротекторных сред [5]. Однако ЯЖ имеет ряд недостатков как продукт животного происхождения: высокая вариабельность состава, риск микробиологической контаминации, сложность стандартизации и, как следствие, ограниченная применимость в клинических протоколах. Научно-практический интерес представляют альтернативные подходы криоконсервации клеток, основанные на использовании растительных аналогов ЯЖ (например, соевого лецитина) или целенаправленной модификации липидного состава мембран сперматозоидов посредством включения экзогенных липидов, таких как холестерин, ненасыщенные фосфолипиды, а также антиоксидантные молекулы липофильной природы.

Увеличение содержания холестерина в мембране до замораживания рассматривается как один из способов повышения криотолерантности сперматозоидов. Известно, что холестерин влияет на упаковку и подвижность липидов в мембране (скорость вращения и латеральную диффузию). Содержание холестерина в мембране влияет на её толщину, микровязкость («текучесть» молекул липидов), проницаемость для воды и других молекул, а также на температуру и степень кооперативности структурных переходов в мембране [6].

### **Степень разработанности темы.**

В ряде исследований, проведённых на сперматозоидах разных видов млекопитающих [7], было установлено, что предварительная инкубация сперматозоидов с холестерин-циклогексстриновыми 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 циклогексстрины-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.

**Целью исследования является** является разработка методов оптимизации технологии криоконсервации сперматозоидов человека, основанная на изучении механизмов криоповреждений, и создание подходов к повышению криотолерантности сперматозоидов человека с использованием мембраностабилизирующих компонент.

### **Задачи исследования:**

1. Разработать методику оптимизации криопротекторной среды на основании сравнения выживаемости сперматозоидов при их инкубации в присутствии а) яичного желтка или б) холестерина.
2. Провести сравнительный анализ методов определения концентрации холестерина в мембранах сперматозоидов, имеющий целью выбор оптимальных способов криоконсервации сперматозоидов в лабораторных условиях в клинической практике.
3. Изучить, как удаление холестерина из мембран сперматозоидов с помощью метил-β-циклогексстринов влияет на микровязкость липидного бислоя мембранны.
4. Выяснить, как инкубация сперматозоидов человека с комплексами метил-β-циклогексстринов с холестерином перед криоконсервацией влияет на индексы подвижности и жизнеспособности сперматозоидов после размораживания.

### **Научная гипотеза**

Сделано предположение о различии в механизмах повреждения ДНК сперматозоидов при криоконсервации с использованием и без использования криопротекторной среды.

### **Научная новизна работы**

Показано, что метил-β-циклогексстрины обладают выраженной цитотоксичностью в отношении сперматозоидов человека, связанной с экстракцией мембранного холестерина. Установлено, что комплексы метил-β-циклогексстринов с холестерином характеризуются существенно меньшей цитотоксичностью. Показано, что инкубация сперматозоидов с комплексами метил-β-циклогексстринов с холестерином вызывает дозависимое повышение содержания холестерина в мембранах сперматозоидов с последующим выходом на плато. Продемонстрировано дозависимое улучшение криотолерантности сперматозоидов человека при обработке комплексами метил-β-циклогексстринов с холестерином, определена оптимальная концентрация комплексов для повышения доли прогрессивно подвижных и жизнеспособных сперматозоидов. Исследование, выполненное на сперматозоидах человека, показало, что экстракция из них холестерина с помощью метил-β-циклогексстринов сопровождается увеличением подвижности спинового зонда 5-ДС, свидетельствующим, что

удаление холестерина способствует уменьшению микровязкости липидного бислоя мембран сперматозоидов. Интерпретация полученных данных подтверждается опытами с использованием модельной системы (липосомы с различным содержанием холестерина).

### **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- $\beta$ -циклодекстринов открывает перспективы для повышения криотолерантности клеток, а также для экспериментального изменения липидного состава мембранны с целью последующего изучения роли холестерина в функциональной активности сперматозоидов.

### **Методология и методы исследования**

Для определения содержания холестерина в мембранах сперматозоидов в работе были использованы четыре метода количественного определения холестерина (реакция Либермана-Бурхарда, высокоэффективная жидкостная хроматография, ИК-спектроскопия и ферментативно-колориметрический анализ). Для модификации содержания холестерина в мемbrane сперматозоиды инкубировали с метилированными  $\beta$ -циклодектринами и их комплексами с холестерином. Структурные изменения мембран сперматозоидов человека изучали с помощью липидорастворимого спинового зонда 5-ДС. Липосомы с различным содержанием холестерина были использованы в качестве модельной системы, на примере которой было показано, как извлечение холестерина из липидных мембран влияет на их структурные свойства. Для оптимизации криопротекторной среды проводилось сравнение выживаемости сперматозоидов при добавлении в криопротекторную среду яичного желтка и инкубации сперматозоидов с комплексами метилированных  $\beta$ -циклодекстринов с холестерином перед криоконсервацией. Жизнеспособность клеток оценивали с применением набора Vital Screen, процент сперматозоидов с фрагментированной ДНК – с использованием набора TUNEL.

### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Включение яичного желтка в криопротекторную среду обеспечивает сохранение более высокого (статистически значимого) индекса подвижности криоконсервированных сперматозоидов по сравнению с контрольными образцами (в отсутствие яичного желтка).

2. Случайно метилированные  $\beta$ -циклодекстрины обладают дозозависимой цитотоксичностью по отношению к сперматозоидам человека, что обусловлено экстракцией мембранных холестерина.

3. С увеличением концентрации случайно метилированных  $\beta$ -циклодекстринов в среде, содержащей сперматозоиды, подвижность молекул спинового зонда 5-доксил стеарата в мембране увеличивается. Этот результат подтверждает гипотезу о том, что удаление холестерина из мембран сперматозоидов приводит к уменьшению «жесткости» цитоплазматической мембраны.

4. Инкубация сперматозоидов человека с комплексами случайно метилированных  $\beta$ -циклодекстринов с холестерином (2 мг/мл) перед криоконсервацией приводит к статистически значимому повышению индекса подвижности и индекса жизнеспособности сперматозоидов после размораживания.

**Личный вклад автора.** Все изложенные в диссертации результаты получены соискателем самостоятельно или при его непосредственном участии. Личный вклад соискателя состоял в участии в биохимических и биофизических экспериментах, а также в обработке и анализе полученных данных, формулировании положений и выводов, подготовке статей к печати и участии в конференциях. Постановка задач, интерпретация полученных результатов и формулировка выводов исследования осуществлялись совместно с научным руководителем и другими соавторами публикаций.

**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.

**Апробация работы.** Материалы диссертации были представлены на следующих научных конференциях: V Съезд биофизиков России (Ростов-на-Дону, 2015); XV Ежегодная международная молодёжная конференция ИБХФ РАН-ВУЗы (Москва, 2016); конференция «Новейшие достижения и успехи развития естественных и математических наук» (Краснодар, 2016); The 10<sup>th</sup> Leiden International (Bio)Medical Student Conference (Leiden, 2017); VI Съезд биофизиков России (Сочи, 2019).

**Публикации.** 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.

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа изложена на 115 страницах, содержит 7 таблиц и 14 иллюстраций. Работа состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждения, заключение, основные результаты и выводы, благодарности, список сокращений и условных обозначений и список литературы (339 источников).

**Сокращения, принятые в работе:** ВРТ – вспомогательные репродуктивные технологии; ЯЖ – яичный желток; RAMEB – рандомно метилированный  $\beta$ -циклодекстрин; 5-ДС – 5-доксил стеарат; ЭПР – электронный парамагнитный резонанс; ВОЗ – всемирная организация здравоохранения; SF – Sperm Freeze; DPBS – Dulbecco's Phosphate Buffered Saline; DAD – диодно-матричный спектрофотометрический детектор; RAMEB-CHOL – комплексы RAMEB с холестерином; DFI – процент сперматозоидов с фрагментацией ДНК; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; Хол/ФЛ – холестерин/фосфолипиды;  $\beta$ -ЦД –  $\beta$ -циклодекстрин; АФК – активные формы кислорода.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность темы диссертационного исследования, степень ее разработанности, сформулированы цель и задачи работы, научная новизна, теоретическая и практическая значимость результатов исследования и положения, выносимые на защиту.

**ГЛАВА 1** содержит обзор литературы, в котором рассмотрены двухфакторная гипотеза в криобиологии и особенности сперматозоида как объекта криобиологии. Даны характеристика

структуры и свойств липидного бислоя биологических мембран. На примере модельной системы димиристоилфосфатидилхолин/холестерин описана роль холестерина в упорядочении ацильных цепей фосфолипидов, текучести и профиле гидрофобности липидной мембраны. Описано влияние холестерина на фазовые переходы в модельных мембранах. Отражены особенности липидного состава мембранны сперматозоидов и функции холестерина в сперматозоидах. Описаны способы модификации липидного состава мембранны.

**ГЛАВА 2** описывает материалы и методы, использованные при выполнении работы. Даны сведения об объектах и методах их исследования. В работе использовали образцы эякулята доноров с нормозооспермией (по критериям 6-го издания руководства всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) [8]). Образцы спермы доноров были предоставлены клиникой «Альтравита», г. Москва. Оценку концентрации и подвижности сперматозоидов проводили с помощью камеры Маклера. Оценку жизнеспособности сперматозоидов проводили с использованием коммерческого набора VitalScreen (FertiPro, Бельгия) в соответствии с протоколом производителя. Фрагментацию ДНК сперматозоидов определяли методом TUNEL (Promega, США) в соответствии с протоколом производителя. Криоконсервацию сперматозоидов выполняли с использованием криопротекторной среды Sperm Freeze (Fertipro, Бельгия) в соответствии с протоколом фирмы-производителя.

**Обработка сперматозоидов.** Для того чтобы отмыть сперматозоиды от семенной плазмы, к эякуляту добавляли раствор DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) в соотношении 1:2 (по объему) и центрифугировали при 300 г в течение 10 мин. Отбирали супернатант, осадок ресуспендировали в 2 мл DPBS и повторно центрифугировали при 300 г в течение 10 мин. Для выделения подвижной фракции сперматозоидов применяли метод центрифugирования в градиенте плотности.

**Определение концентрации холестерина в мембранах сперматозоидов ферментативно-колориметрическим методом.** Для экстракции холестерина сперматозоиды инкубировали в 1 %-м растворе Triton X-100 в течение 1 ч при 37 °C. Концентрацию холестерина в образце определяли с помощью набора «Холестерин ФКД» («Агат», Россия) в соответствии с протоколом производителя.

**Определение концентрации холестерина в мембранах сперматозоидов методом Либермана-Бурхарда.** Экстракцию липидов проводили методом Фолча. Высушенные экстракти липидов растворяли в реактиве Либермана-Бурхарда (смесь хлороформа, уксусного ангидрида и серной кислоты в соотношении 3:2:0,1 по объему).

**Спектрофотометрическое исследование.** Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре ПЭ-5400УФ (ЭКРОСХИМ, Россия) в диапазоне длин волн 300–700 нм с шагом 1 нм, используя кюветы с длиной оптического пути 10 мм.

**Определение концентрации холестерина в мембранах сперматозоидов методом высокоеффективной жидкостной хроматографии.** Высушенные экстракти липидов растворяли в смеси изопропанола, ацетонитрила и воды (соотношение 60:30:10 по объему). Хроматографический анализ выполняли с использованием системы Agilent 1100 (Agilent, США) и колонки с обращенной фазой Agilent Zorbax XDB-C18 (4,6 × 150 мм, 5 мкм). Температура колонки 28 °C; элюент – смесь изопропанол:ацетонитрил:вода (60:30:10, по объему); скорость потока – 1 мл/мин. Детекцию проводили с помощью диодно-матричного спектрофотометрического детектора (DAD) при  $\lambda = 205$  нм.

**Определение концентрации холестерина в мембранах сперматозоидов методом инфракрасной спектроскопии.** Полученный после центрифугирования осадок сперматозоидов высушивали в сушильном шкафу при 60 °C в течение 48 ч до полного удаления

влаги. Подготовку проб для регистрации ИК-спектров проводили методом взвесей в бромиде калия. Регистрацию ИК-спектров проводили на спектрометре Specord M80 (Carl Zeiss, Германия) в диапазоне частот 400–4000 см<sup>-1</sup>.

**Приготовление комплексов циклодекстрины-холестерин.** Комплексы RAMEB с холестерином (RAMEB-CHOL) готовили в соответствии с методикой, описанной в работе [9].

**Приготовление липосом с холестерином.** Моноламеллярные смешанные липосомы, содержащие диолеилфосфатидилхолин и холестерин, получали методом озвучивания. Полученные липосомы отделяли от титановой пыли центрифугированием на ультрацентрифуге J-11 (Beckman, США) 5 мин при 12 000 об/мин. Средний размер липосом от партии к партии варьировался в диапазоне 80–100 нм.

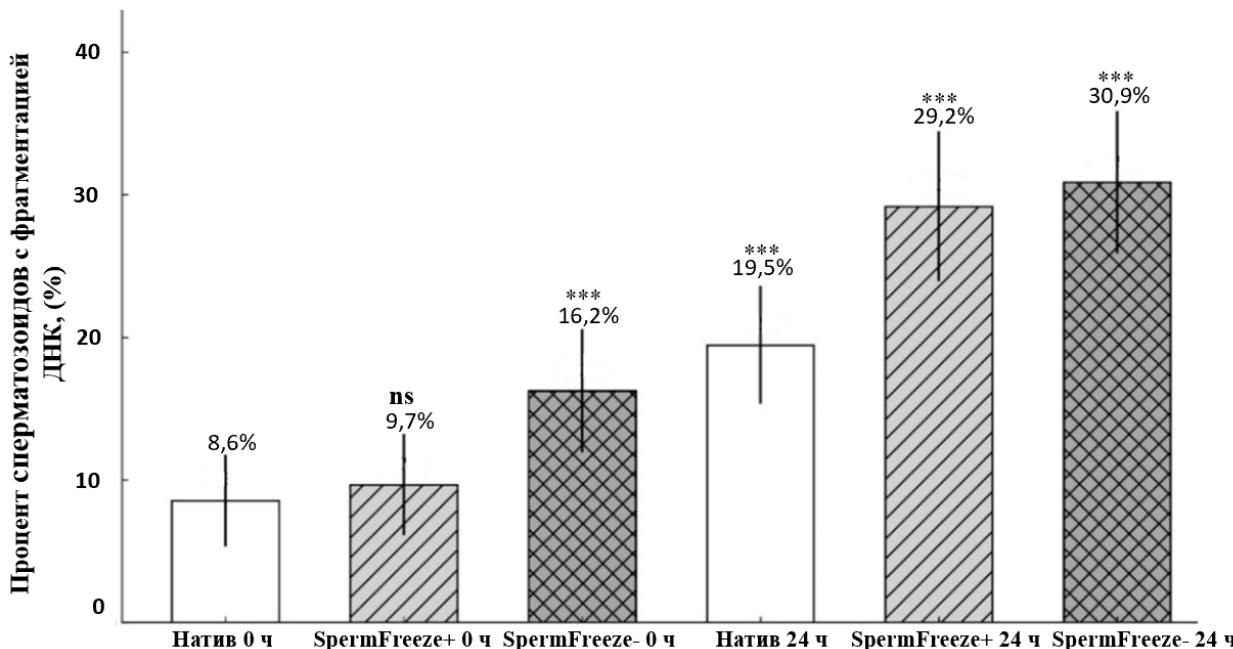
**ЭПР-исследование.** К липосомам или сперматозоидам добавляли концентрированный спиртовой раствор 5-ДС (конечная концентрация спинового зонда в образце составляла 0,4 мМ), тщательно перемешивали и затем инкубировали 5 мин при 23 °C. Образцы объемом 25 мкл помещали в пластиковый капилляр, пропускающий кислород (TFE-трубочки от Zeus Inc., США). Спектры ЭПР регистрировали с помощью спектрометра 3 см диапазона модели E-4 (Varian, США) при температуре 23 °C. Условия регистрации спектров: мощность СВЧ 10 мВт, амплитуду ВЧ модуляции магнитного поля  $H_m$  варьировали в интервале от 1 до 4 Гс.

**Рентгеноструктурный анализ.** Дифракционные картины для исследуемых растворов были получены на пучке P 11 синхротронного источника PETRA III. Измерения были выполнены в центре DESY (Гамбург, Германия).

**ГЛАВА 3** посвящена описанию полученных результатов и их обсуждению.

### 3.1. Фрагментация ДНК сперматозоидов до и после криоконсервации

Оценку фрагментации ДНК в нативных образцах проводили методом TUNEL после обработки (0 ч); в криоконсервированных образцах – непосредственно после разморозки (0 ч). Повторные измерения проводили через 24 ч инкубации при 21 °C (Рисунок 1).



**Рисунок 1** – Процент сперматозоидов с фрагментацией ДНК (Mean ± SD; n = 19) в нативных образцах и после криоконсервации с использованием среды SpermFreeze+ или без нее (SpermFreeze-) – сразу после размораживания (0 ч) и через 24 ч инкубации при 21 °C. На графике представлены различия по сравнению с контрольным образцом (натив в 0 ч; \*\*\* $p < 0,05$ ; парный t-критерий Стьюдента с поправкой Холма на множественные сравнения)

Из Рисунка 1 видно, что после размораживания (0 ч) процент сперматозоидов с фрагментацией ДНК (DFI) в образцах, криоконсервированных с использованием криопротекторной среды SF, статистически значимо не отличается от нативного контроля ( $9,7 \pm 3,5$  против  $8,6 \pm 3,2$ ,  $p = 0,67$ ). В образцах, замороженных без криопротекторной среды, значение DFI было почти в 1,9 раза выше по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ). Через 24 ч инкубации при  $21^{\circ}\text{C}$  во всех исследованных группах наблюдается статистически значимое увеличение DFI по сравнению с нативной группой в 0 ч: в нативных образцах – в 2,3 раза ( $p < 0,05$ ), в группе с SF – в 3,4 раза ( $p < 0,05$ ), в группе без криопротекторной среды – в 3,6 раз ( $p < 0,05$ ) (Таблица 1). Между группами с использованием и без использования SF на этом этапе статистически значимых различий выявлено не было ( $p = 0,54$ ). При этом в обеих криогруппах значения DFI достоверно превышают соответствующий показатель для нативных образцов после 24-часовой инкубации ( $p < 0,05$ ).

**Таблица 1** – Процент сперматозоидов с фрагментацией ДНК (Mean  $\pm$  SD;  $n = 19$ ) в нативных образцах и после криоконсервации с использованием криопротекторной среды (SpermFreeze+) или без нее (SpermFreeze-) через 24 ч инкубации; парный t-критерий Стьюдента с поправкой Холма на множественные сравнения

	DFI (%)	P-value (отн. натива в 0 ч)	Кратность (отн. натива в 0 ч)
<b>Натив 0 ч</b>	$8,6 \pm 3,2$	–	–
<b>Натив 24 ч</b>	$19,5 \pm 4,1$	$p < 0,05$	2,3
<b>SpermFreeze + 24 ч</b>	$29,2 \pm 5,3$	$p < 0,05$	3,4
<b>SpermFreeze – 24 ч</b>	$30,9 \pm 4,9$	$p < 0,05$	3,6

Установлено, что после 24-часовой инкубации образцов в группе без криопротекторной среды DFI увеличивается в 1,9 раз по сравнению с показателями, зафиксированными непосредственно после размораживания. В то же время в группе, где применялась криопротекторная среда, рост DFI оказался еще более выраженным – в 3 раза (Таблица 2).

**Таблица 2** – Процент сперматозоидов с фрагментацией ДНК (Mean  $\pm$  SD;  $n = 19$ ) в нативных образцах и после криоконсервации с использованием криопротекторной среды (SpermFreeze+) или без нее (SpermFreeze-) – сразу после размораживания (0 ч) и через 24 ч инкубации при  $21^{\circ}\text{C}$ ; парный t-критерий Стьюдента с поправкой Холма на множественные сравнения)

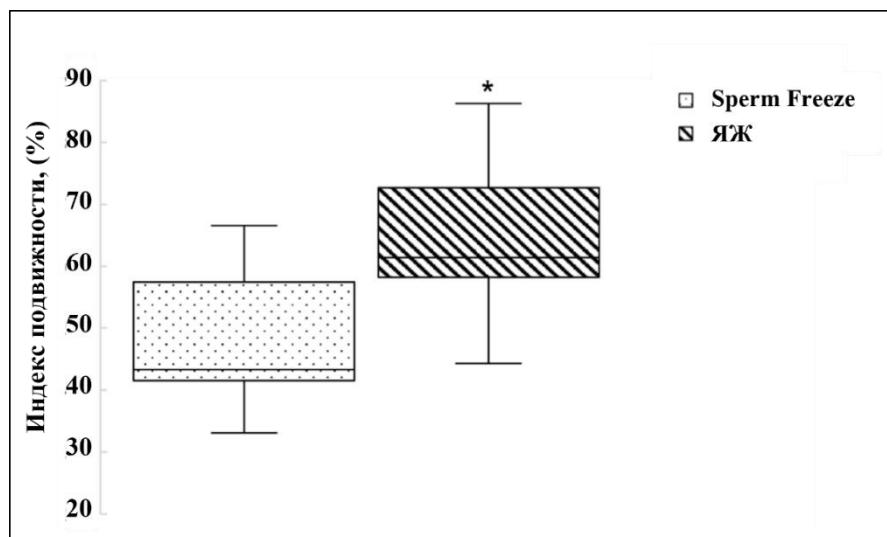
Образцы	DFI 0 ч (%)	DFI 24 ч (%)	P-value	Отношение DFI (24 ч / 0 ч)
<b>Натив</b>	$8,6 \pm 3,2$	$19,5 \pm 4,1$	$p < 0,05$	2,3
<b>SpermFreeze +</b>	$9,7 \pm 3,5$	$29,2 \pm 5,3$	$p < 0,05$	3,0
<b>SpermFreeze –</b>	$16,2 \pm 4,3$	$30,9 \pm 4,9$	$p < 0,05$	1,9

Полученные данные свидетельствуют о том, что применение криопротекторной среды SF способствует снижению DFI в момент оттаивания. Однако в постинкубационный период в этой группе наблюдается более выраженный рост DFI. Различия в кинетике DFI между исследуемыми группами можно объяснить разными доминирующими механизмами повреждений ДНК. В группе без применения криопротекторной среды фрагментация ДНК, по-видимому, обусловлена преимущественно прямыми криоиндуцированными повреждениями. В группе, где использовалась криопротекторная среда, основным механизмом повреждений, вероятно, является митохондриальная дисфункция и связанный с ней окислительный стресс. В этой связи перспективным направлением дальнейших исследований является оптимизация

состава криопротекторных сред с целью минимизации отсроченных повреждений ДНК и повышения сохранности функциональной активности сперматозоидов.

### 3.2. Эффективность модификации криопротекторной среды яичным желтком

Сравнение эффективности двух сред – среды SF и среды SF с добавлением 5,6 мг/мл ЯЖ – показало статистически значимое (в среднем на 18,9 %,  $p > 0,05$ ) повышение индекса подвижности сперматозоидов после разморозки в образцах с модифицированной ЯЖ криопротекторной средой по сравнению с нативной средой SF (Рисунок 2).



**Рисунок 2** – Диаграммы индекса подвижности сперматозоидов (%) после разморозки: контроль (Sperm Freeze) и криопротекторная среда Sperm Freeze с добавлением 5,6 мг/мл ЯЖ ( $n = 11$ ). Ящики – медиана и IQR; «усы» –  $1,5 \times \text{IQR}$ ; точки – выбросы. Статистическая значимость оценивалась критерием Уилкоксона (двусторонний). Обозначения: \* –  $p < 0,05$

Для сперматозоидов человека концентрация ЯЖ (5,6 мг/мл (0,56 % масс./об.), что эквивалентно ~1,1 % (об./об.), позволяющая достичь криопротекторного эффекта, существенно ниже, чем в аналогичных протоколах, применяемых на животных (10–20 % (об./об.)) [10]. Вероятно, это связано с относительно высоким содержанием проникающего криопротектора в используемой среде SF (глицерин ~15 %). В таких условиях введение ЯЖ, по-видимому, выполняет вспомогательную функцию, а не является основным фактором криозащиты. В ветеринарных протоколах, напротив, содержание глицерина, как правило, составляет ~7 %, что, предположительно, делает вклад проникающего криопротектора менее выраженным. Данные различия также могут быть обусловлены видоспецифическими различиями в липидном составе мембран, уровне холестерина и холодовой чувствительности сперматозоидов.

### 3.3. Концентрация холестерина в мембранах сперматозоидов

**Определение концентрации холестерина методом Либермана-Бурхарда.** На основании 21 проанализированного образца рассчитана средняя концентрация холестерина в сперматозоидах, которая составляет  $C_{LB} = 1,3 \pm 0,2$  нмоль/млн.

**Определение концентрации холестерина методом обратнофазовой высокоэффективной хроматографии.** В результате анализа 14 образцов получено следующее среднее значение концентрации холестерина в мембранах сперматозоидов человека:  $C_{HPLC} = 1,5 \pm 0,2$  нмоль/млн.

**Определение концентрации холестерина методом ферментативно-колориметрической детекции.** В результате анализа 24 образцов установлено, что среднее

содержание холестерина в мембранах сперматозоидов составляет  $C_{ENZ} = 1,0 \pm 0,3$  нмоль/млн. Отметим, что данный метод дает более низкую оценку концентрации холестерина. Вероятно, это связано с используемым способом экстракции: в отличие от смеси хлороформа и метанола, применяемой в методе Фолча, Triton X-100 является менее агрессивным экстрагентом. При этом липидные рафты, в которых локализуются наибольшие количества холестерина, обладают устойчивостью к действию мягких детергентов, что может приводить к неполному извлечению стеролов.

#### **Определение концентрации холестерина методом инфракрасной спектроскопии.**

Наиболее селективной для определения количества холестерина является полоса поглощения при  $1646 \text{ см}^{-1}$  (соответствующая колебаниям двойной C=C связи циклогексеновой группы). Для проведения анализа необходимо было получить порядка 20 мг сухого остатка. Такое количество образца невозможно получить из одного эякулята: для каждой постановки эксперимента потребовалось смешивать порядка 6-ти эякулятов, что уже накладывает ограничение на клиническое использование метода. Даже при таком количестве образца полоса поглощения при  $1646 \text{ см}^{-1}$  была слабо выражена и значительно перекрывалась спектральным шумом. Среди наблюдаемых в ИК-спектре полос поглощения наибольшую интенсивность имела полоса при  $2940 \text{ см}^{-1}$ , соответствующая возбуждению колебаний CH<sub>2</sub>-групп в системе конденсированных циклических фрагментов, относительно которой были проведены дальнейшие расчеты. На основании семи проведенных измерений была рассчитана средняя концентрация холестерина в мембранах сперматозоидов, которая составляет  $C_{IK} = 5.1 \pm 1.8$  нмоль/млн. Этот результат значительно превышает значения, полученные с использованием других методов. Расхождение в результатах в первую очередь может быть связано с нестрогой селективностью полосы поглощения при  $2940 \text{ см}^{-1}$ , соответствующей возбуждению колебаний CH<sub>2</sub>-групп, которые присутствуют не только в холестерине, но и во всех липидах мембранны.

В результате тестового определения концентрации холестерина в мембранах сперматозоидов мы получили хорошо сходящиеся результаты всех методов, за исключением ИК-спектроскопии, которая к тому же не может использоваться в клинической практике, так как этот метод требует большого объема образца. Метод ВЭЖХ, обладая высокой селективностью и воспроизводимостью, требует дорогостоящего специализированного оборудования и оператора высокой квалификации. Метод Либермана-Бурхарда, в свою очередь, предполагает работу с агрессивными химическими реагентами. С учетом этих факторов в качестве наиболее целесообразного варианта был выбран ферментативно-колориметрический метод, который при достаточной аналитической точности и воспроизводимости является простым в выполнении, не требует сложного оборудования и исключает использование агрессивных и летучих органических растворителей.

#### **3.4. Цитотоксичность метилированных $\beta$ -циклодекстринов и их комплексов с холестерином по отношению к сперматозоидам человека**

Данные о доле жизнеспособных сперматозоидов в зависимости от концентрации RAMEB, комплексов RAMEB-CHOL и времени инкубации приведены в Таблице 3. На основании полученных данных методом аппроксимации экспериментальных данных четырехпараметрической логистической моделью (4PL) с фиксированным верхним (98%) и нижним (0 %) пределом были рассчитаны значения полумаксимальной ингибирующей концентрации ( $IC_{50}$ ). Определены пороговые концентрации отсутствия эффекта (NOEC, *No Observed Effect Concentration*) и минимальной наблюдаемой цитотоксической концентрации (LOEC, *Lowest Observed Effect Concentration*) по критерию  $\chi^2$  на основании отсутствия или

наличия статистически значимого ( $p < 0,05$ ) снижения жизнеспособности клеток относительно контроля. Рассчитанные значения IC<sub>50</sub>, NOEC и LOEC для RAMEB и RAMEB-CHOL при различных временах инкубации представлены в Таблице 4.

**Таблица 3** – Доля сперматозоидов с интактной мембраной в образцах, инкубированных с различными концентрациями RAMEB и RAMEB-CHOL в течение 15, 30 и 60 мин. Для сравнения данных использован критерий хи-квадрат ( $\chi^2$ ). Уровень статистической значимости различий определен как  $p < 0,05$

Время	2 мг/мл	4 мг/мл	8 мг/мл	16 мг/мл	32 мг/мл	64 мг/мл	128 мг/мл	контроль
<b>15 минут</b>								
<b>RAMEB</b>	1376/1400 98,3 (%) $p = 0,67$	1373/1400 98,1 (%) $p = 0,98$	1236/1400 88,3 (%) $p < 0,05$	910/1400 65,0 (%) $p < 0,05$	609/1400 43,5 (%) $p < 0,05$	567/1400 40,5 (%) $p < 0,05$	22/1400 1,6 (%) $p < 0,05$	1373/1400 98,1 (%)
<b>30 минут</b>								
<b>RAMEB</b>	1292/1400 92,3 (%) $p < 0,05$	1276/1400 91,2 (%) $p < 0,05$	1190/1400 85,0 (%) $p < 0,05$	791/1400 56,5 (%) $p < 0,05$	607/1400 43,4 (%) $p < 0,05$	529/1400 37,8 (%) $p < 0,05$	14/1400 1,0 (%) $p < 0,05$	1369/1400 97,8 (%)
<b>RAMEB-CHOL</b>	1379/1400 98,5 (%) $p = 0,16$	1376/1400 98,3 (%) $p = 0,34$	1380/1400 98,6 (%) $p = 0,12$	1370/1400 97,9 (%) $p = 0,89$	1325/1400 94,7 (%) $p < 0,05$	–	–	
<b>60 минут</b>								
<b>RAMEB</b>	1254/1400 89,6 (%) $p < 0,05$	1240/1400 88,6 (%) $p < 0,05$	1029/1400 73,5 (%) $p < 0,05$	732/1400 52,3 (%) $p < 0,05$	553/1400 39,5 (%) $p < 0,05$	336/1400 24,0 (%) $p < 0,05$	0 (%)	1370/1400 97,9 (%)
<b>RAMEB-CHOL</b>	1380/1400 98,6 (%) $p = 0,15$	1377/1400 98,4 (%) $p = 0,33$	1355/1400 96,8 (%) $p = 0,08$	1253/1400 89,5 (%) $p < 0,05$	1195/1400 85,4 (%) $p < 0,05$	–	–	

**Таблица 4** – Значения полумаксимальной ингибирующей концентрации (IC<sub>50</sub>), пороговой концентрации отсутствия эффекта (NOEC) и минимальной наблюдаемой цитотоксической концентрации (LOEC) для RAMEB и RAMEB-CHOL при различных временах инкубации, рассчитанные по данным аппроксимации логистической моделью (4PL) и критерию  $\chi^2$  ( $p < 0,05$ ) относительно контроля

Время инкубации	IC <sub>50</sub> (мг/мл)	NOEC (мг/мл)	LOEC (мг/мл)	Соединение
<b>15 минут</b>	31,3	4	8	RAMEB
<b>30 минут</b>	28,7	–	2	RAMEB
<b>60 минут</b>	20,2	–	2	RAMEB
<b>30 минут</b>	>32	16	32	RAMEB-CHOL
<b>60 минут</b>	>32	8	16	RAMEB-CHOL

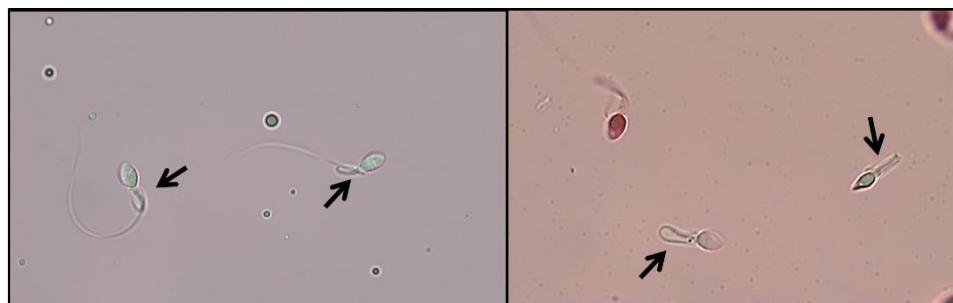
Полученные результаты демонстрируют выраженную дозо- и времязависимую цитотоксичность RAMEB в отношении сперматозоидов человека в исследованном диапазоне концентраций. Снижение IC<sub>50</sub> от 31,3 мг/мл (15 минут) до 20,2 мг/мл (60 минут) отражает усиление цитотоксического эффекта при увеличении времени экспозиции. Определенные значения NOEC и LOEC позволяют охарактеризовать диапазоны концентраций, при которых токсическое действие либо отсутствует, либо становится статистически значимым. Для времени экспозиции 15 минут NOEC составляет 4 мг/мл, а LOEC – 8 мг/мл, что указывает на наличие концентрационного интервала, в пределах которого жизнеспособность клеток не отличается от контрольной. Для 30 и 60-минутной инкубации NOEC не выявляется, тогда как LOEC составляет 2 мг/мл, что свидетельствует о статистически значимом снижении жизнеспособности уже при минимальной протестированной концентрации. Комплексы

RAMEB с холестерином характеризуются существенно меньшей цитотоксичностью: в исследованном диапазоне концентраций значение IC<sub>50</sub> не достигается ни для одного времени инкубации. Для 30 минут NOEC составляет 16 мг/мл, LOEC – 32 мг/мл; для 60 минут NOEC – 8 мг/мл, LOEC – 16 мг/мл. Сравнительный анализ показывает, что при 30 и 60-минутной инкубации жизнеспособность сперматозоидов в присутствии RAMEB-CHOL статистически значимо выше, чем в присутствии RAMEB, для всех исследованных концентраций в пределах диапазона 2–32 мг/мл ( $\chi^2$ ,  $p < 0,05$ ).

Установлено, что по мере увеличения концентрации RAMEB в образцах содержание холестерина в среде возрастает, что свидетельствует о его экстракции из мембран сперматозоидов. Инкубация сперматозоидов в течение 60 минут при 37 °C в среде, содержащей 8, 16, 32 и 64 мг/мл RAMEB, приводит к экстракции 20, 27, 42 и 67 % исходного количества холестерина из мембран сперматозоидов соответственно. Полученные данные согласуются со снижением жизнеспособности при увеличении концентрации RAMEB.

Выраженное дозо- и времязависимое снижение жизнеспособности сперматозоидов человека под действием RAMEB соответствуют современным представлениям о механизме взаимодействия метил-β-циклогексстринов с клеточными мембранами. Согласно литературным данным, метилированные производные β-циклогексстраина (β-ЦД) характеризуются высокой токсичностью в отношении различных типов клеток [11; 12]. Общий механизм повреждений заключается в высокой способности этих соединений к комплексообразованию с мембранным холестерином, что подтверждается исследованиями фазовой растворимости [13]. В случае RAMEB-CHOL гидрофобные полости циклогексстринов уже заняты молекулами холестерина, что существенно ограничивает возможность связывания и удаления холестерина из мембран клеток. Тем не менее, токсичность комплекса RAMEB-CHOL сохраняется, что может быть связано с присутствием в препарате значительного количества несвязанного циклогексстраина, остающегося после приготовления в соответствии с наиболее распространенным протоколом (90 мг холестерина на 1 г RAMEB) [9]. При стехиометрии связывания 1:1 около 69 % исходного RAMEB остается свободным, а при 2:1 – около 39 %. Таким образом, в препарате может сохраняться от 40 до 70 % циклогексстраина, не связанного в комплексы с холестерином.

Инкубация сперматозоидов с RAMEB приводит к изменению морфологии сперматозоидов: хвосты сперматозоидов закручиваются. Данный эффект наблюдается при концентрации RAMEB в образце, равной 16 мг/мл, и становится более выраженным при дальнейшем (32 мг/мл и выше) повышении концентрации RAMEB (Рисунок 3).



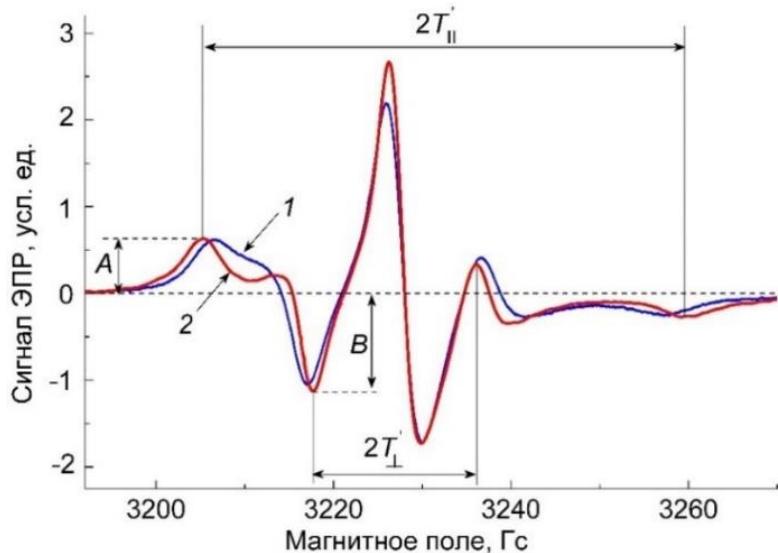
**Рисунок 3** – Изменение морфологии сперматозоидов при добавлении к образцу: a) 16 мг/мл RAMEB; b) 32 мг/мл RAMEB. Стрелки указывают на характерное закручивание хвостов сперматозоидов

Выявленное при взаимодействии с RAMEB характерное морфофункциональное изменение – закручивание хвостов («coiled tail») сперматозоидов – представляет собой специфический ответ, который может быть интерпретирован как следствие изменений

биофизических свойств плазматической мембраны, обусловленных экстракцией холестерина. Морфологические изменения клеток, индуцируемые взаимодействием с метил- $\beta$ -циклогексостринаами, были ранее описаны для различных типов клеток. Одним из наиболее изученных и наглядных примеров служат эритроциты [12].

### 3.5. Исследование мембран липосом и сперматозоидов методом спиновых зондов

**Влияние содержания холестерина на спектр ЭПР зонда 5-доксил стеарата в липосомах.** В качестве объекта исследования использовали липосомы с разным содержанием холестерина. На примере этой модельной системы было продемонстрировано, как концентрация холестерина в липидных мембранах влияет на их структурные свойства. На Рисунке 4 представлены спектры ЭПР спинового зонда 5-ДС, который был встроен в мембранны липосом, состоящих из диолеилфосфатидилхолина. Липосомы отличались по содержанию холестерина: спектр 1 – липосомы без холестерина, спектр 2 – липосомы с холестерином. В обоих случаях регистрируются сигналы ЭПР, форма линий которых указывает на анизотропное вращение молекул зонда. Сопоставление параметров наблюдаемых нами спектров ЭПР с литературными данными свидетельствует о том, что парамагнитный фрагмент зонда 5-ДС находится в гидрофобном окружении. В качестве количественных характеристик спектра используются расстояния между «внешними» и «внутренними» экстремумами спектра, обозначаемые как  $2T_{\parallel}'$  и  $2T_{\perp}'$  соответственно (Рисунок 4).



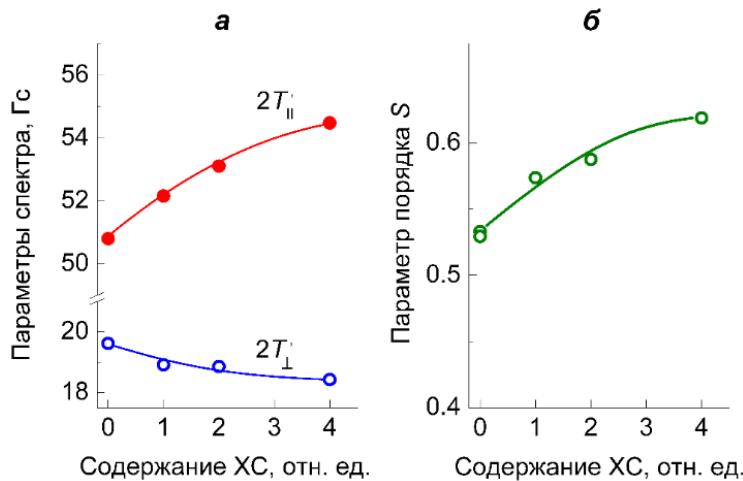
**Рисунок 4** – Спектры ЭПР спинового зонда 5-ДС в мембранах липосом из диолеилфосфатидилхолина, не содержащих холестерин (спектр 1) и в присутствии холестрина (спектр 2)

Параметры спектра ЭПР изменяются при увеличении концентрации холестерина в липосомах из диолеилфосфатидилхолина (Рисунок 5а). При этом величина  $2T_{\parallel}'$  возрастает, а параметр  $2T_{\perp}'$  уменьшается. Эти изменения могут быть связаны как с замедлением вращательного движения, так и с изменением ориентации парамагнитных фрагментов относительно нормали к поверхности мембраны.

Параметры спектра  $2T_{\parallel}'$  и  $2T_{\perp}'$  несут важную информацию об анизотропии тензора сверхтонкой структуры (СТС) спектров ЭПР нитроксильных радикалов. Величина  $2T_{\parallel}'$  определяется константой СТС тех молекул зонда, у которых  $p_z$ -орбиталь неспаренного электрона парамагнитного фрагмента ориентирована параллельно направлению магнитного поля. Параметр  $2T_{\perp}'$  определяется константой СТС для молекул, у которых направление  $p_z$ -орбитали перпендикулярно направлению магнитного поля. Изменения параметров спектра ЭПР

молекул зонда, которые мы наблюдаем при изменении концентрации холестерина в мембранах липосом, свидетельствуют о том, что повышение концентрации холестерина в мемbrane приводит к снижению скорости вращения зонда.

Для описания подвижности и ориентированности молекул зонда часто используют параметр порядка  $S$ . Его можно рассчитать, измерив значения  $2T_{\parallel}'$  и  $2T_{\perp}'$ . На Рисунке 5 (б) видно, что параметр  $S$  увеличивается с ростом относительного содержания холестерина в липосомах. С высокой точностью этот параметр пропорционален величине  $2T_{\parallel}'$ . Увеличение параметра  $S$  при росте относительного содержания холестерина говорит о снижении подвижности углеводородных цепей липидов. Иными словами, холестерин приводит к «затвердеванию» липидной матрицы, в которой локализованы молекулы зонда.



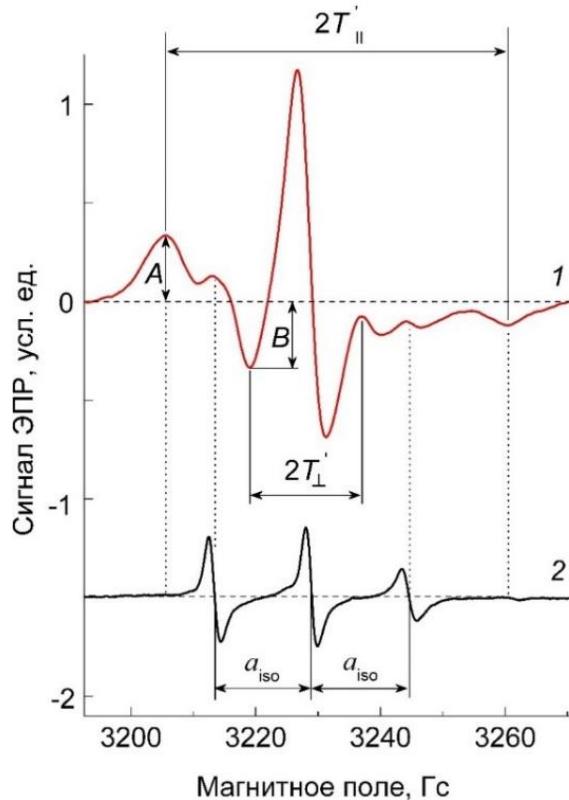
**Рисунок 5** – Параметры  $2T_{\parallel}'$  и  $2T_{\perp}'$  спектра ЭПР (панель *а*) и зависимость параметра порядка (панель *б*) от относительного содержания холестерина в липосомах. К суспензии липосом был добавлен спиновый зонд 5-ДС (0.2 мМ). Одна условная единица соответствует содержанию холестерина в липосомах, равному 12.5% от общего числа молекул липидов в липосомах

Вместе с изменением параметров  $2T_{\parallel}'$  и  $2T_{\perp}'$  изменяется и другой параметр спектра – отношение амплитуд экстремумов  $B/A$  низкополевой составляющей спектра ЭПР. Экстремум  $A$  соответствует радикалам, у которых  $p_z$ -орбиталь нитроксильного фрагмента расположена параллельно направлению магнитного поля. В свою очередь, экстремум  $B$  характерен для молекул зонда, у которых  $p_z$ -орбиталь ориентирована перпендикулярно вектору магнитного поля. Вероятно, стерические ограничения, которые накладывают молекулы холестерина, приводят к уменьшению анизотропии вращения ацильных цепей молекул зонда 5-ДС. Это подтверждается смещением экстремума  $A$  от центра спектра ЭПР, а экстремума  $B$  – к центру спектра.

Представленные выше результаты согласуются с известными представлениями о том, что добавление холестерина значительно усиливает анизотропию вращения молекул спинового зонда, погруженного в гидратированные мультислой яичного лецитина. Согласно модели случайных блужданий, молекулы зонда быстро вращаются внутри конуса ограниченного объема [14]. При повышении содержания холестерина угол конуса уменьшается от 46 до 17° (в присутствии 55 мол. % холестерина). При этом скорость вращения молекул зонда снижается, о чем свидетельствует увеличение времени вращательной корреляции с 1,8 до 3,8 нс (в присутствии 30 мол. % холестерина). Полученные нами результаты подтверждают гипотезу о том, что холестерин вызывает вытяжение цепей жирных кислот (снижает вероятность гоши-конформации углеводородных цепей) и уменьшает амплитуду вращательного движения

ацильных цепей липидов. Полученные нами данные хорошо согласуются с представлением о том, что биологическая роль холестерина в мембране сперматозоидов заключается в регулировании микровязкости липидных областей этих мембран.

**Влияние метилированных  $\beta$ -циклогексстринов на спектр ЭПР зонда 5-доксил стеарата в мембранах сперматозоидов.** На Рисунке 6 представлен характерный спектр ЭПР спинового зонда 5-ДС, встроенного в мембранны сперматозоидов контрольного образца (спектр 1 – сперматозоиды без обработки RAMEB).

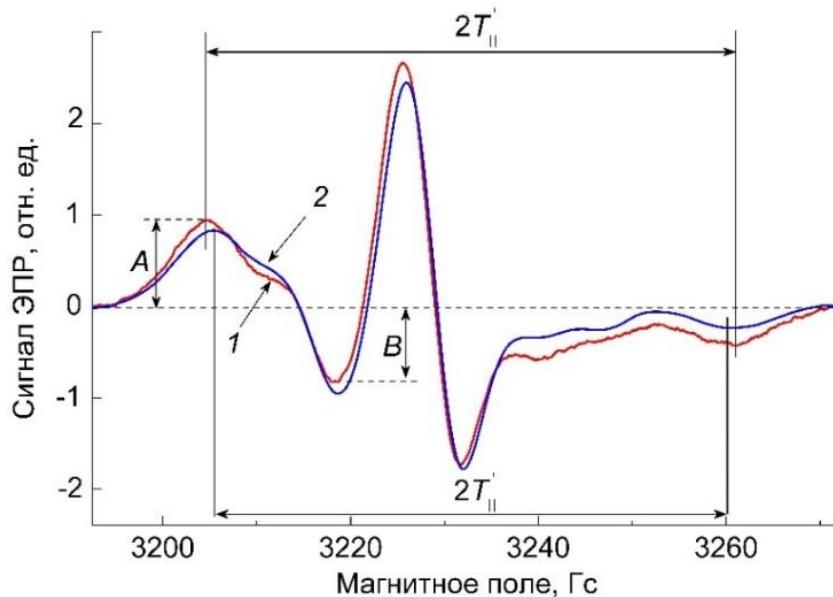


**Рисунок 6** – Спектры ЭПР спинового зонда 5-ДС в суспензии сперматозоидов (спектр 1) и в водном растворе RAMEB (спектр 2). Спектр 1 записан при амплитуде ВЧ-модуляции  $H_m = 4$  Гс, спектр 2 – при  $H_m = 1$  Гс)

Спектр ЭПР зонда 5-ДС в сперматозоидах свидетельствует о расположении парамагнитного фрагмента в липидном бислое мембранны и анизотропном вращении парамагнитного фрагмента. Для описания подвижности парамагнитного фрагмента зонда и его ориентации в мембране использовали параметр  $2T_{\parallel}'$  и отношение амплитуд двух экстремумов в низкополевой области спектра ЭПР (параметр  $B/A$ ). В спектре ЭПР также видны экстремумы, которые позволяют измерить параметр  $2T_{\perp}'$ . В случае сперматозоидов параметр  $2T_{\perp}$  не всегда определяется достаточно четко, что, вероятно, обусловлено гетерогенностью препаратов. Поэтому параметр  $2T_{\parallel}'$ , использованный нами для анализа влияния холестерина на структурные свойства мембран сперматозоидов, является наиболее удобной количественной характеристикой спектра ЭПР. На Рисунке 6 цифрой 2 обозначен сигнал ЭПР молекул зонда, растворённых в среде для инкубации, содержащей RAMEB, но не содержащей сперматозоидов. Этот сигнал представляет собой асимметричный триплет, состоящий из относительно узких линий, которые принадлежат молекулам зонда, быстро вращающимся в полярной среде. Характерное время вращательной корреляции для этих молекул, определённое по форме спектра ЭПР, составляет  $\tau_c \approx 0,1$  нс. Для этих молекул константа изотропного (контактного)

сверхтонкого взаимодействия составляет  $a_{\text{изо}} = 15,5$  Гс, что характерно для нитроксильных радикалов, находящихся в полярной среде. Сопоставляя спектры 1 и 2, представленные на Рисунке 6, можно заметить, что расстояние между линиями СТС в спектре молекул зонда, находящихся в растворе содержащем RAMEB, значительно меньше, чем расстояние  $2T_{\parallel}'$  между «внешними» экстремумами в спектре молекул метки, растворенных в мембране сперматозоидов. Отметим также, что низкополовой и высокополовой экстремумы ЭПР-сигнала молекул зонда в мембране (спектр 1) достаточно удалены от узких линий молекул метки (спектр 2). Поэтому параметр  $2T_{\parallel}'$  может быть использован в качестве надежного индикатора поведения зонда 5-ДС в мембране сперматозоидов. Для экстремумов спектра ЭПР, по которым определяется параметр  $2T_{\perp}'$  также наблюдается смещение относительно узких линий триплетного сигнала молекул зонда в полярном окружении (Рисунок 6). Использование  $2T_{\parallel}'$  и  $2T_{\perp}'$  в качестве параметров, отражающих изменения в свойствах мембранных липидов, позволяет избежать искажений, которые могли бы возникнуть из-за остаточного (примесного) сигнала ЭПР от молекул зонда, не связанных с мембраной.

На Рисунке 7 показаны спектры ЭПР спинового зонда 5-ДС в контрольных образцах сперматозоидов (спектр 1) и опытных образцах, из которых холестерин был удален с помощью обработки RAMEB (спектр 2).

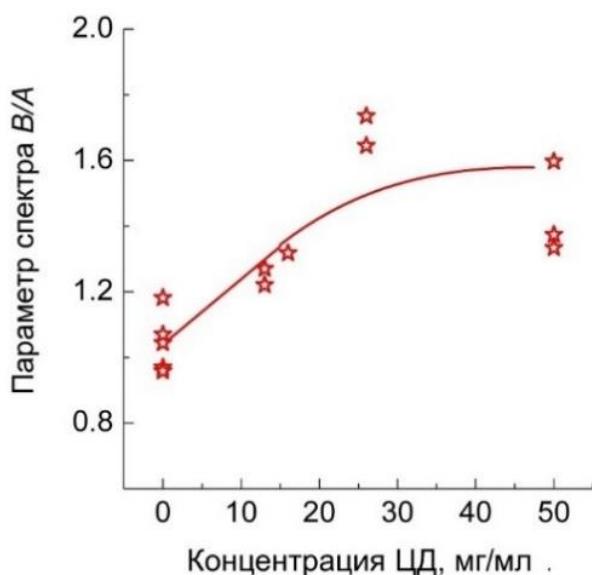


**Рисунок 7 –** Спектры ЭПР парамагнитного зонда 5-ДС в сперматозоидах (записаны при  $H_m = 2$  Гс). Спектр 1 – контрольные препараты (без обработки RAMEB), спектр 2 – опытные препараты сперматозоидов, предварительно инкубированных в присутствии RAMEB. Спектры были усреднены по четырем последовательным измерениям

Видно, что в контрольных образцах, не обработанных RAMEB, параметр  $2T_{\parallel}'$  увеличивается по сравнению с опытными образцами. Это соответствует тому, что мы наблюдали в модельной системе (липосомах) и свидетельствует о том, что удаление холестерина (даже частичное) приводит к увеличению подвижности молекул зонда в мембранах сперматозоидов. Кроме этого, после удаления холестерина из мембран сперматозоидов с помощью RAMEB, отношение  $B/A$  в спектре ЭПР молекул зонда возрастает (Рисунок 7). Это наблюдение служит дополнительным подтверждением того, что после удаления холестерина мембранны сперматозоидов претерпевают структурное изменение, подобное тому, что мы наблюдали в модельной системе. Применение отношения  $B/A$  в качестве «диагностического» показателя является обоснованным, поскольку положение экстремумов  $B$  и  $A$  не совпадает с

положением узких линий СТС тройного сигнала от молекул 5-ДС, не ассоциированных с мембраной. Уменьшение параметра  $2T_{\parallel}'$ , также как и увеличение параметра  $B/A$ , обусловленные удалением холестерина, свидетельствуют об изменении ориентированности и подвижности молекул зонда в мембране сперматозоидов.

Рост амплитуды пика  $B$  по отношению к величине пика  $A$  (Рисунок 8) обусловлен сужением спектральных линий. Данный эффект может возникать как в результате ускоренного вращательного движения молекул зонда, приводящего к компенсации вклада анизотропной составляющей тензора СТС, так и вследствие уменьшения «конуса вращений» углеводородных цепей липидов, что может быть связано с их более упорядоченной ориентацией относительно нормали к поверхности мембраны. Изменения спектра ЭПР при удалении холестерина могут отражать как сужение «конуса вращений» углеводородных цепей липидов, так и изменения толщины мембранны [15].



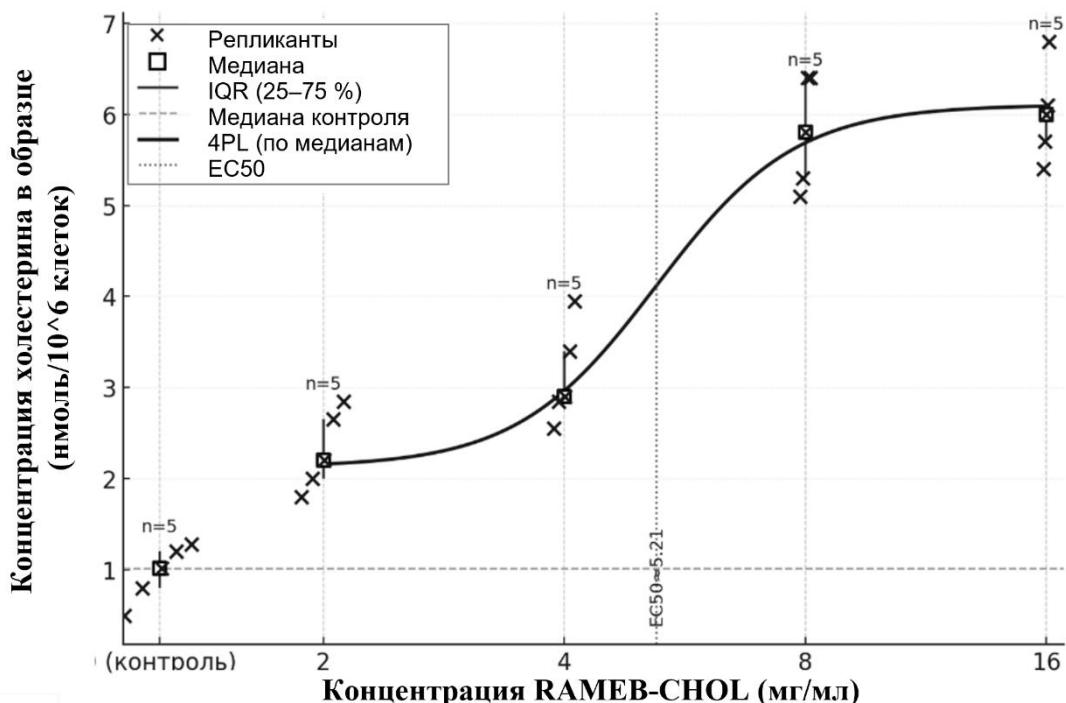
**Рисунок 8** – Зависимость параметра  $B/A$  спектра ЭПР спинового зонда 5-ДС, локализованного в мембранах сперматозоидов, в зависимости от концентрации циклодекстрина (RAMEB), использованного для удаления холестерина из мембран сперматозоидов. Спектры ЭПР зонда 5-ДС в мембранах сперматозоидов были записаны при  $H_m = 2$  Гс. Каждая точка – результат разных измерений

Полученные данные позволяют сделать вывод, что удаление холестерина вызывает изменения спектра ЭПР зонда 5-ДС, аналогичные тем, которые наблюдаются в липосомах с пониженным содержанием холестерина. При этом микровязкость («текучесть») липидного бислоя после экстракции холестерина оказывается ниже, чем в контрольных образцах, то есть в сперматозоидах, не подвергавшихся воздействию RAMEB.

### 3.6. Насыщение мембранны сперматозоидов холестерином с помощью комплексов метилированных $\beta$ -циклодекстринов с холестерином

Дозозависимое изменение концентрации холестерина в сперматозоидах при обработке RAMEB-CHOL представлено на Рисунке 9. Общая проверка показала статистически значимый эффект дозы: тест Фридмана  $\chi^2 = 19,36, p = 0,0007$ ; коэффициент согласованности по Кендаллу  $W = 0,97$  указывает на очень устойчивую монотонность ответа. Парные сравнения «доза против контроля» (двусторонний критерий Уилкоксона с коррекцией Холма) выявили, что в диапазоне концентраций RAMEB-CHOL 2–16 мг/мл статистическая значимость при  $n = 5$  пар и множественных сравнениях не достигается, несмотря на заметные медианные сдвиги.

Отсутствие формальной значимости при наличии крупных медианных сдвигов объясняется малым объемом пар ( $n = 5$ ) и поправкой на множественные сравнения; это подтверждается значимым общим тестом Фридмана.



**Рисунок 9** – Дозозависимое изменение концентрации холестерина в сперматозоидах при обработке RAMEB-CHOL (мг/мл; логарифмическая шкала с основанием 2; контроль 0 мг/мл вынесен слева). Для каждой дозы показаны отдельные измерения (репликанты), медиана и межквартильный размах (IQR, 25–75 %);  $n = 5$ . Горизонтальная пунктирная линия – медиана контроля; вертикальная пунктирная линия отмечает EC<sub>50</sub> (~ 5,2 мг/мл)

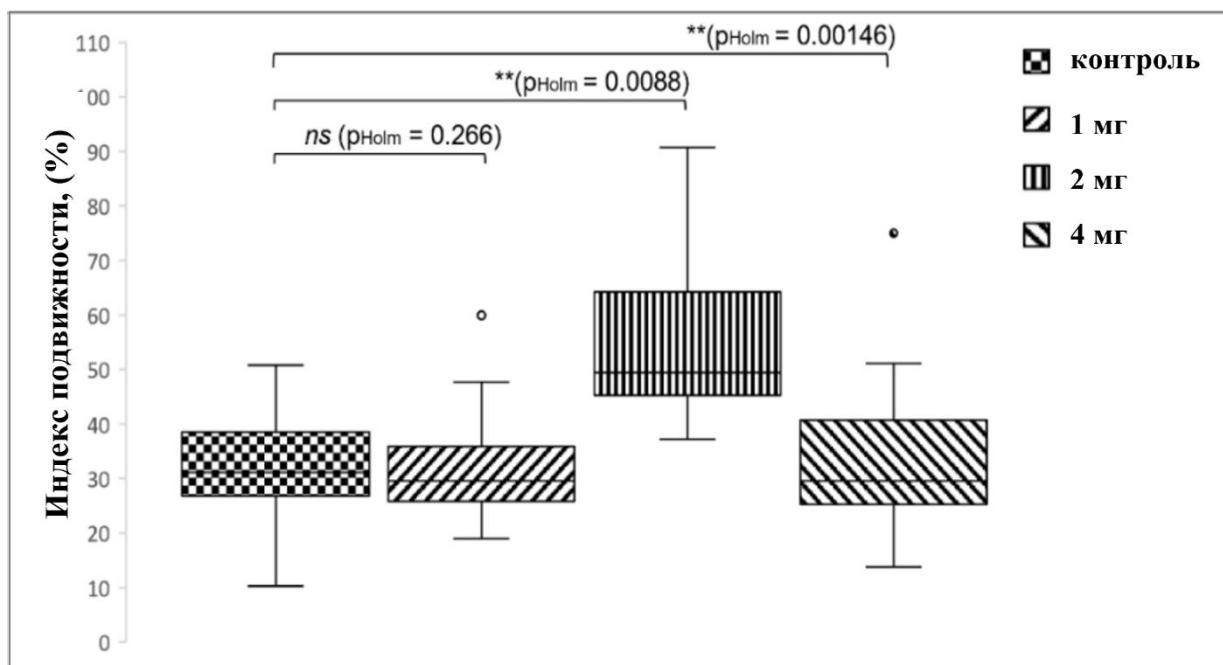
Таким образом, при инкубации сперматозоидов с RAMEB-CHOL наблюдается дозозависимое увеличение концентрации холестерина в мембранах сперматозоидов с насыщением на уровне ~ 6,1 нмоль/10<sup>6</sup> клеток; половина максимального эффекта (EC<sub>50</sub>) достигается при ~ 5,2 мг/мл. При дозах RAMEB-CHOL 8–16 мг/мл эффект стабилизируется с выходом на плато, а прирост относительно 8 мг/мл невелик, что указывает на режим убывающей отдачи. Аналогичный вид зависимости – монотонный рост с насыщением – наблюдается в работах по насыщению холестерином мембран сперматозоидов жеребцов [16] и быков [7].

В контрольных образцах (без добавления RAMEB-CHOL) медианное содержание холестерина составляет ~ 1,02 нмоль/10<sup>6</sup> клеток, что соответствует расчетному соотношению холестерин/фосфолипиды (Хол/ФЛ) 0,5–0,6 при предполагаемом содержании фосфолипидов в плазматической мембране сперматозоидов 1,7–2,0 нмоль/10<sup>6</sup> клеток. По мере увеличения концентрации RAMEB-CHOL содержание холестерина в мембранах сперматозоидов возрастает и выходит на насыщение (~ 6,1 нмоль/10<sup>6</sup> клеток) при концентрациях RAMEB-CHOL 8–16 мг/мл. В пересчете на отношение Хол/ФЛ это соответствует 3,0–3,6, что существенно превышает значения, характерные для биомембран. Однако столь высокий уровень холестерина все же наблюдается в плазматических мембранах некоторых типов клеток. Так, согласно данным Ли и соавторов [17], соотношение Хол/ФЛ в клеточных мембранах кортикалных волокон хрусталика глаза составляет от 1 до 2, а в ядерных мембранных – от 3 до 4. В таких условиях структура мембраны существенно изменяется: формируется сложная многофазная система, включающая фосфолипидно-холестериновые области, встроенные домены чистого холестерина и кристаллы холестерина, образующиеся вне бислоя.

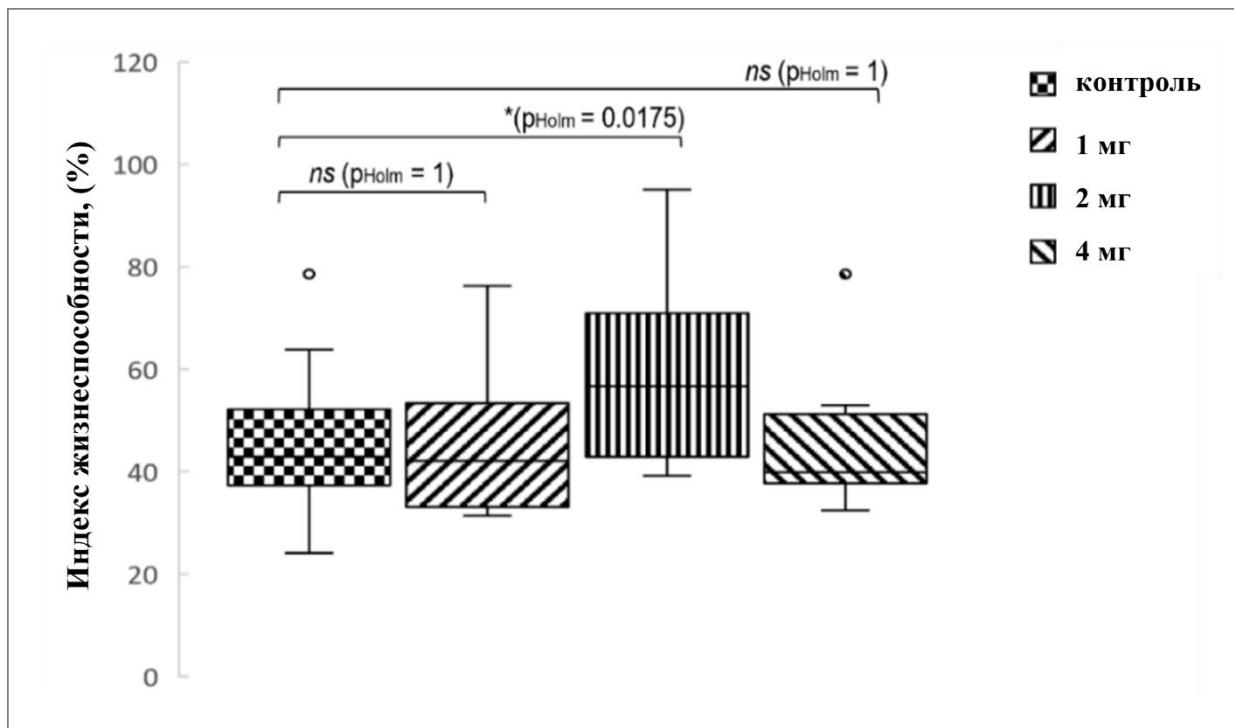
Возможными источниками артефактов в подобных экспериментах может быть наличие остаточных несвязанных комплексов RAMEB-CHOL в среде или адсорбция комплексов RAMEB-CHOL на поверхности клеток. В настоящей работе контрольные эксперименты с комплексами RAMEB-CHOL, инкубированными в отсутствие клеток, показали, что остаточный вклад холестерина после двухкратной отмычки не превышает 10 % от наблюдаемого прироста при концентрации RAMEB-CHOL, равной 4 мг/мл. Другой возможный механизм – адсорбция комплексов RAMEB-CHOL на поверхности мембран сперматозоидов. Ранее было показано, что нативные  $\beta$ -цикло декстрины ( $\beta$ -ЦД) способны адсорбироваться на поверхности липосом за счет образования водородных связей между полярными головками фосфолипидов и гидроксильными группами  $\beta$ -ЦД [18]. Расчеты показывают, что один полный монослои таких комплексов на поверхности сперматозоидов дал бы лишь 0,025–0,05 нмоль/10<sup>6</sup> молекул холестерина, то есть порядка 1 % от реально наблюдаемого прироста. Чтобы объяснить весь прирост холестерина в системе (+ 5,1 нмоль/10<sup>6</sup> клеток) только за счет адсорбции, потребовалось бы гипотетическое формирование 100–200 слоев, что физически и биологически нереалистично.

### 3.7. Определение оптимальной концентрации комплексов метилированных $\beta$ -цикло декстринов с холестерином для повышения криотолерантности сперматозоидов человека

Для оценки влияния мембранных холестерина на криотолерантность сперматозоидов было исследовано действие комплексов RAMEB-CHOL. Дозозависимые изменения индекса подвижности и индекса жизнеспособности сперматозоидов при обработке RAMEB-CHOL представлены на Рисунках 10 и 11 соответственно.



**Рисунок 10** – Диаграммы индекса подвижности сперматозоидов (%) после разморозки: контроль и инкубация с RAMEB-CHOL (1, 2 и 4 мг/мл) перед криоконсервацией (n = 12). Ящики – медиана и IQR; «усы» – 1,5 x IQR; точки – выбросы. Статистическая значимость для пар «контроль – доза» оценивалась критерием Уилкоксона (двусторонний) с поправкой Холма. Обозначения: ns – p ≥ 0,05; \*\* – p < 0,05



**Рисунок 11** – Диаграммы индекса жизнеспособности сперматозоидов (%) после разморозки: контроль и инкубация с RAMEB-CHOL (1, 2 и 4 мг/мл) перед криоконсервацией ( $n = 12$ ). Ящики – медиана и IQR; «усы» –  $1,5 \times$  IQR; точки – выбросы. Статистическая значимость для пар «контроль – доза» оценивалась критерием Уилкоксона (двусторонний) с поправкой Холма. Обозначения: ns –  $p \geq 0,05$ ; \* –  $p < 0,05$

Выраженный положительный эффект был получен при концентрации RAMEB-CHOL, равной 2 мг/мл: индекс подвижности и индекс жизнеспособности в этой группе были статистически значимо выше по сравнению с контролем (49,4 (45,3; 64,3) против 34,6 (28,5; 43,9),  $p_{Holm} < 0,05$ ; 56,6 (42,9; 70,9) против 42,8 (37,4; 52,1);  $p_{Holm} < 0,05$ , соответственно). При концентрации RAMEB-CHOL, равной 1 мг/мл, статистически значимых различий в индексе подвижности и жизнеспособности сперматозоидов по сравнению с контрольными образцами выявлено не было ( $p_{Holm} = 0,26$  и  $p = 1$  соответственно). При обработке образцов комплексами RAMEB-CHOL в концентрации 4 мг/мл индекс подвижности был статистически значимо ниже, чем в контроле (29,6 (25,3; 40,8) против 34,6 (28,5; 43,9),  $p_{Holm} < 0,05$ ), при этом индекс жизнеспособности в этой группе не отличался от контрольных значений ( $p_{Holm} = 1$ ). Полученные данные согласуются с результатами исследований на других видах млекопитающих [7; 9; 19]. При этом мы не выявили корреляции между концентрацией сперматозоидов в нативном образце и выживаемостью сперматозоидов после разморозки при инкубации эякулята с различными концентрациями RAMEB-CHOL перед криоконсервацией. Для концентраций RAMEB-CHOL, равных 1 и 2 мг/мл, коэффициент ранговой корреляции Спирмена составляет 0,059 ( $p = 0,89$ ) и 0,275 ( $p = 0,51$ ) соответственно.

Основным механизмом криопротекторного действия холестерина в мемbrane 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, можно выделить еще 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 АФК. Второй, «сакрификационный», механизм реализуется при высокой нагрузке АФК: в этих условиях

холестерин может выступать в роли мишени для АФК, препятствуя инициации цепных свободнорадикальных процессов, приводящих к лавинообразному повреждению мембран.

Циклодекстрины способны удалять из мембраны не только холестерин, но и продукты его окисления [20]. В составе нашего препарата может сохраняться от 40 до 70 % (при стехиометрии связывания 1:1 или 2:1, соответственно) «пустых» циклодекстринов, не образовавших комплексы с холестерином. В этих условиях RAMEB может извлекать оксистеролы из мембраны, в то время как комплексы RAMEB-CHOL доставляют холестерин в мембрану, поддерживая упорядоченность и барьерные свойства бислоя. Таким образом формируется цикл: структурная стабилизация – окисление холестерина – удаление оксистеролов циклодекстринами – репопуляция бислоя нативным холестерином.

### **3.8. Анализ кристаллообразования в криопротекторной среде Sperm Freeze после добавления метилированных β-циклодекстринов и их комплексов с холестерином методом рентгеноструктурного анализа**

Дисахариды (сахароза, трегалоза) широко применяются в криобиологии в качестве непроникающих криопротекторов. Включение дисахаридов в криопротекторный раствор, как правило, приводит к уменьшению размера кристаллов льда при одновременном увеличении их количества. Можно предположить, что циклодекстрины, являясь олигомерами глюкозы, способны влиять на структуру окружающей воды и процессы кристаллообразования. Для проверки этой гипотезы была проведена оценка средних размеров кристаллов льда, формирующихся в криопротекторной среде SF, содержащей 2, 4 и 8 мг/мл циклодекстринов или комплексов циклодекстрины-холестерин при замораживании.

Проведенный рентгеноструктурный анализ (PETRA III, DESY, Германия) показал, что добавление RAMEB и RAMEB-CHOL в криопротекторную среду SF в концентрациях 2–8 мг/мл не оказывает влияния на средний размер образующихся кристаллов льда (Таблица 5).

**Таблица 5** – Средний размер кристаллов льда, формирующихся в образцах с различной концентрацией RAMEB и RAMEB-CHOL. Для каждого образца оценка среднего размера кристаллов проводилась по 2000 значений

Контроль (1 мл SpermWash + 0,7 мл SF)	RAMEB 2 мг	RAMEB 4 мг	RAMEB 8 мг	RAMEB- CHOL 2 мг	RAMEB- CHOL 4 мг	RAMEB- CHOL 8 мг
14 мкм	15 мкм	14 мкм	14 мкм	15 мкм	15 мкм	14 мкм

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Показано, что применение криопротекторной среды SF на основе глицерола и сахарозы уменьшает процент сперматозоидов с фрагментацией ДНК непосредственно после оттаивания. Установлено, что добавление яичного желтка в криопротекторную среду SF приводит к статистически значимому повышению индекса подвижности сперматозоидов после размораживания. Показано, что ферментативно-колориметрический метод может быть использован для экспресс-анализа концентрации холестерина в лабораториях экстракорпорального оплодотворения. Установлено, что RAMEB обладают выраженной цитотоксичностью по отношению к сперматозоидам человека, обусловленной экстракцией холестерина из мембран сперматозоидов. Методом спиновых зондов показано, что удаление холестерина из мембран сперматозоидов с помощью RAMEB приводит к увеличению подвижности липидорастворимого спинового зонда 5-ДС в мембране. Установлено, что обработка сперматозоидов комплексами RAMEB-CHOL сопровождается дозозависимым

увеличением содержания холестерина в мембранах сперматозоидов с выходом на насыщение. Определена оптимальная концентрация RAMEB-CHOL для повышения криотолерантности сперматозоидов человека: инкубация сперматозоидов с комплексами RAMEB-CHOL (2 мг/мл) перед криоконсервацией приводит к статистически значимому повышению индекса подвижности и индекса жизнеспособности сперматозоидов после размораживания. Проведенный рентгеноструктурный анализ показал, что добавление RAMEB и RAMEB-CHOL к криопротекторной среде SF не влияет на средний размер кристаллов, образующихся в процессе криоконсервации, следовательно, положительные эффекты RAMEB-CHOL не связаны с ингибированием роста кристаллов льда.

## **ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ**

1. Криопротекторная среда Sperm Freeze на основе глицерола и сахарозы позволяет снизить (в среднем на 6,5 % по сравнению с контролем) уровень прямых повреждений ДНК сперматозоидов на этапе замораживания/оттаивания. Нарастание фрагментации ДНК в посткриогенном периоде указывает на наличие отсроченных механизмов повреждений, связанных, вероятно, с сублетальными повреждениями клеточных структур сперматозоидов и окислительным стрессом.

2. Включение яичного желтка в криопротекторную среду обеспечивает статистически значимое (в среднем на 18,9 %) повышение индекса подвижности сперматозоидов после криоконсервации. Ограничивающим фактором применения яичного является нестандартизованный состав и риск контаминации.

3. Ферментативно-колориметрическим метод может быть использован для измерения концентрации холестерина в сперматозоидах доноров и пациентов в условиях лаборатории вспомогательных репродуктивных технологий.

4. Случайно метилированные  $\beta$ -циклодекстрины обладают выраженной дозозависимой цитотоксичностью по отношению к сперматозоидам человека, что обусловлено экстракцией мембранных холестерина.

5. С увеличением концентрации случайно метилированных  $\beta$ -циклодекстринов в среде подвижность молекул спинового зонда 5-доксил стеарата в мембранах сперматозоидов увеличивается, что подтверждает гипотезу о том, что удаление холестерина приводит к уменьшению «жесткости» цитоплазматической мембранны.

6. Обработка сперматозоидов человека комплексами случайно метилированных  $\beta$ -циклодекстринов с холестерином сопровождается дозозависимым увеличением содержания холестерина в мембранах клеток с последующим достижением эффекта насыщения.

7. Инкубация сперматозоидов человека с комплексами случайно метилированных  $\beta$ -циклодекстринов с холестерином (2 мг/мл) перед криоконсервацией приводит к статистически значимому повышению индекса подвижности (в среднем на 14,8 %) и индекса жизнеспособности (в среднем на 13,8 %) сперматозоидов после размораживания.

## **Список цитируемой литературы**

1. Ozimic, S. Sperm Cryopreservation Today: Approaches, Efficiency, and Pitfalls / S. Ozimic, H. Ban-Frangez, M. Stimpfel // Current Issues in Molecular Biology. – 2023. – Vol. 45, № 6. – P. 4716–4734.
2. Mazur, P. A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells / P. Mazur, S. P. Leibo, E.H.Y. Chu // Experimental Cell Research. – 1972. – Vol. 71, № 2. – P. 345–355.

3. Morris, G. J. Rapidly cooled human sperm: No evidence of intracellular ice formation / G. J. Morris // Human Reproduction. – 2006. – Vol. 21, № 8. – P. 2075–2083.
4. Parks, J. E. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes / J. E. Parks, J. K. Graham // Theriogenology. – 1992. – Vol. 38, № 2. – P. 209–222.
5. Dong, Q. X. The role of low-density lipoprotein (LDL) and high-density lipoprotein (HDL) in comparison with whole egg yolk for sperm cryopreservation in rhesus monkeys / Q. X. Dong, S. E. Rodenburg, D. Hill, C. A. Vandervoort // Asian Journal of Andrology. – 2011. – Vol. 13, № 3. – P. 459–464.
6. Rög, T. Cholesterol effects on the phospholipid condensation and packing in the bilayer: A molecular simulation study / T. Rög, M. Pasenkiewicz-Gierula // FEBS Letters. – 2001. – Vol. 502, № 1–2. – P. 68–71.
7. Mocé, E. Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosurvival / E. Mocé, J. K. Graham // Journal of Animal Science. – 2006. – Vol. 84, № 4. – P. 826–833.
8. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, sixth edition. – 2023.
9. Purdy, P. H. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm / P. H. Purdy, J. K. Graham // Cryobiology. – 2004. – Vol. 48, № 1. – P. 36–45.
10. Bergeron, A. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk / A. Bergeron, P. Manjunath // Molecular Reproduction and Development. – 2006. – Vol. 73, № 10. – P. 1338–1344.
11. Kiss, T. Evaluation of the cytotoxicity of  $\beta$ -cyclodextrin derivatives: Evidence for the role of cholesterol extraction / T Kiss, F. Fenyvesi, I. Bácskay, et al. // European Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2010. – Vol. 40, № 4. – P. 376–380.
12. Motoyama, K. Involvement of Lipid Rafts of Rabbit Red Blood Cells in Morphological Changes Induced by Methylated  $\beta$ -Cyclodextrins / K. Motoyama, H. Toyodome, R. Onodera, et al. // Biological and Pharmaceutical Bulletin. – 2009. – Vol. 32, № 4. – P. 700–705.
13. Fenyvesi, É. Methyl-beta-cyclodextrins: the role of number and types of substituents in solubilizing power É. Fenyvesi, J. Szemán, K. Csabai, M. Malanga, L. Szente // Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2014. – Vol. 103, № 5. – P. 1443–1452.
14. Lapper, R. D. A Spin Label Study of the Influence of Cholesterol on Egg Lecithin Multibilayers / R. D. Lapper, S. J. Paterson, I. C. P. Smith // Canadian Journal of Biochemistry. – 1972. – Vol. 50, № 9. – P. 969–981.
15. McConnell, H. M. Molecular motion in spin-labeled phospholipids and membranes / H. M. McConnell, W. L. Hubbell // Journal of the American Chemical Society. – 1971. – Vol. 93, № 2. – Pp. 314–326.
16. Moore, A.I. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival / A. I. Moore, E. L. Squires, J. K. Graham // Cryobiology. – 2005. – Vol. 51, № 3. – P. 241–249.
17. Li, L. K. Age-dependent changes in the distribution and concentration of human lens cholesterol and / L. K. Li, L. So, A. Spector // Biochimica et Biophysica Acta. – 1987. – Vol. 917, № 1. – P. 112–120.
18. Joset, A. Investigation of the interaction between a  $\beta$ -cyclodextrin and DMPC liposomes: a small angle neutron scattering study / A. Joset, A. Grammenos, M. Hoebke, B. Leyh // Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry. – 2015. – Vol. 83, № 3–4. – P. 227–238.
19. Mocé, E. Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival / P. H. Purdy, J. K. Graham // Animal Reproduction Science. – 2010. – Vol. 118, № 2–4. – P. 236–247.
20. Kritharides, L. Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin-mediated efflux of 7-ketocholesterol from macrophage foam cells / L. Kritharides, M. Kus, A. J. Brown, W. Jessup, R. T. Dean // Journal of Biological Chemistry. – 1996. – Vol. 271, № 44. – P. 27450–27455.

## 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 / 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. Влияние холестерина на мембранны 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;

4. Миронова, А.Г. Сравнение методов определения концентрации холестерина в мемbrane 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;

### **Публикации в трудах конференций и съездов:**

1. Гармаева, С.Б. Влияние температуры хранения и условий криоконсервации на степень фрагментации ДНК и сперматозоидов человека / С.Б. Гармаева, А.Г. Миронова, Е.Ю. Симоненко, С.А. Яковенко, А.А. Григорьева, В.А.Твердислов, В.П. Апрышко // Сборник научных трудов V съезда биофизиков России». – 2015. – Т.1. – С .135–135;

2. Григорьева, А.А. Криоконсервация гамет человека в присутствии криопротекторов, модифицированных яичным желтком / А.А. Григорьева, С.Б. Гармаева, С.А. Яковенко, Е.Ю. Симоненко, В.А. Твердислов, К.В. Кириенко, А.Г. Миронова, В.П. Апрышко // Сборник научных трудов по итогам международной научно-практической конференции «Новейшие достижения и успехи развития естественных и математических наук». – 2016. – С. 28–32;

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

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

5. Смоленцева, Д.А. Влияние добавления холестерина на выживаемость сперматозоидов после криоконсервации / Д.А. Смоленцева, А.Г. Миронова, Е.Ю. Симоненко, А.В. Сыбачин, С.А. Яковенко // Сборник научных трудов VI съезда биофизиков России. – 2019. – Т. 1. – С. 191–192.