



УДК 577.115.083; 577.352.333

СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ХОЛЕСТЕРИНА В МЕМБРАНЕ СПЕРМАТОЗОИДОВ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ЭКСПРЕСС-АНАЛИЗА В УСЛОВИЯХ КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

© 2025 г. А. Г. Миронова*, **, #, С. И. Афанасьева***, А. В. Сыбачин****,
В. В. Спиридовонов****, М. А. Больщаков*****, Е. Ю. Симоненко***

* Клиника репродукции человека "Альтравита" (ООО "ЭКО ЦЕНТР"), Россия, 117186 Москва, ул. Нагорная, 4А

** Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Россия, 119334 Москва, ул. Косыгина, 4

*** Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, физический факультет, кафедра биофизики,
Россия, 119991 Москва, ул. Ленинские горы, 1/2

**** Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет,
кафедра высокомолекулярных соединений, Россия,
119234 Москва, ул. Ленинские горы, 1/40

***** ФГБУН "Федеральный исследовательский центр "Пущинский научный центр биологических исследований" РАН,
Россия, 119991 Пущино, ул. Институтская, 2

Поступила в редакцию 17.09.2024 г.

После доработки 28.09.2024 г.

Принята к публикации 29.09.2024 г.

В результате сравнения четырех методов количественного анализа холестерина метод ферментативно-колориметрической детекции предложен в качестве метода экспресс-анализа холестерина в мембранах сперматозоидов человека в условиях клинической лаборатории. Для сравнения были выбраны четыре физико-химических метода определения концентрации холестерина: ферментативно-колориметрической детекции, Либермана–Бурхарда, инфракрасной спектроскопии и высокоеффективной жидкостной хроматографии. Были получены следующие усредненные по выборкам концентрации холестерина: 1.0 ± 0.3 , 1.32 ± 0.15 , 5.1 ± 1.8 и 1.53 ± 0.18 нмоль/10⁶ клеток соответственно. Для оценки применимости метода были выбраны следующие критерии: количество материала для анализа, определяющееся количеством сперматозоидов в семенной жидкости единичного эякулята пациента или донора, количество этапов пробоподготовки, обуславливающее систематическую ошибку анализа, а также общее время анализа. Установлено, что метод инфракрасной спектроскопии требует использования не менее 20 мг клеточного образца, что нереализуемо для оценки холестерина в мембранах сперматозоидов у отдельно взятого пациента или донора. Методы Либермана–Бурхарда и высокоеффективной жидкостной хроматографии требуют многоэтапной пробоподготовки и использования агрессивных летучих реактивов. В свою очередь, метод ферментативно-колориметрической детекции оптимален для рассмотренных критериев, позволяет проводить экспресс-анализ холестерина у отдельно взятого пациента или донора и подходит для использования в пределах лаборатории экстракорпорального оплодотворения.

Ключевые слова: холестерин, сперматозоид, мембрана, хроматография, ИК-спектроскопия, реакция Либермана–Бурхарда

DOI: 10.31857/S0132342325010047, **EDN:** LZVQOE

ВВЕДЕНИЕ

Холестерин – важный структурный компонент плазматической мембраны клеток млекопитающих [1]. Структурная формула молекулы холестерина

представлена на рис. 1. Холестерин ориентируется в фосфолипидном бислое так, что его полярная гидроксильная группа обращена к водной фазе [2], а гидрофобное стероидное кольцо ориентировано

Сокращения: ФКД – ферментативно-колориметрическая детекция.

Автор для связи: (тел.: +7 (916) 167-00-88; эл. почта: agm90@mail.ru).

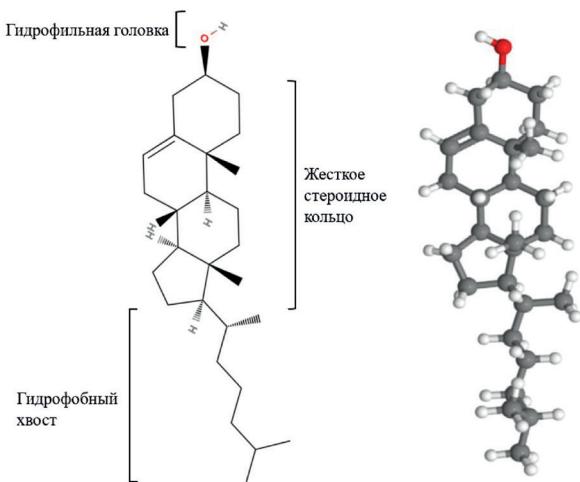


Рис. 1. Структура молекулы холестерина. Все четыре кольца стериновой группы находятся в *транс*-конформации, что делает молекулу холестерина плоской. Двойная связь между пятым и шестым атомами углеродной цепи обеспечивает жесткость молекулы холестерина [2]. Для формирования представления о трехмерной структуре холестерина важен тот факт, что OH-группа, две метильные группы и боковая цепь расположены на одной стороне кольцевого скелета (β -конфигурация) [1]. Гидроксильная группа в молекуле холестерина придает соединению амфи菲尔ный характер и вносит вклад в ориентацию молекулы холестерина в бислое.

параллельно остаткам жирных кислот [3–6]. В результате взаимодействия кольцевой системы холестерина с остатками жирных кислот соседних фосфолипидов степень упорядоченности бислоя возрастает, образуется жидкокристаллическая упорядоченная фаза L_o [7, 8]. В L_o -фазе липиды демонстрируют коэффициент латеральной диффузии, аналогичный измеренному в “жидких” фосфолипидных бислоях [9], в то же время площадь, приходящаяся на один фосфолипид, уменьшается, а толщина липидного бислоя увеличивается [10–12], мембрана становится более конденсированной [13]. Это приводит к изменению проницаемости [14] и механических свойств мембраны [15].

При низких концентрациях холестерина (<10 моль%) модельный бислой дипальмитоилфосфатидилхолин/холестерин претерпевает фазовый переход гель–жидкий кристалл, как это наблюдается для чистых липидных бислоев, а температура фазового перехода T_m незначительно сдвигается в сторону более высоких температур. При высоких

концентрациях холестерина (>30 моль%) главный фазовый переход подавляется, в то время как при промежуточных концентрациях (10–30 моль%) в большинстве исследований сообщается о существовании двух фаз: неупорядоченной жидкокристаллической L_d и упорядоченной жидкокристаллической L_o (выше температуры фазового перехода) или твердокристаллической S_o и L_o (ниже температуры фазового перехода) [2, 3].

Помимо взаимодействия с фосфолипидами мембранны, холестерин также может модулировать свойства и функции мембранных белков [16–18]. Разнообразные интегральные мембранные белки, включая ионные каналы, мембранные рецепторы и ферменты, чувствительны к изменениям окружающего их липидного бислоя [19–22]. Некоторые белки также напрямую связываются с холестерином, в результате чего происходит их активация или инактивация [23, 24]. Активность белков, регулируемых холестерином, вероятно, опосредована через стерол-чувствительные домены [25]. Нормальное функционирование белков, включенных в липидные рафты, также зависит от холестерина, поскольку он необходим для их формирования [26].

В мембранах сперматозоидов холестерин кроме всего прочего играет особую роль [27]. Изменение липидного состава мембранны сперматозоида, в частности отток холестерина, – это неотъемлемая часть процесса капацитации и последующей акросомальной реакции, необходимых сперматозоиду для оплодотворения яйцеклетки [28, 29]. Отклонения концентрации холестерина от нормы могут свидетельствовать о снижении оплодотворяющего потенциала сперматозоидов [30].

Для определения концентрации холестерина в сперматозоидах человека в клинических условиях необходим метод, позволяющий проводить точное количественное определение холестерина в области его наномолярных концентраций.

В данной работе было проведено сравнение четырех методов количественного определения холестерина с точки зрения практичности и эффективности их использования для оценки концентрации холестерина в мембранны сперматозоидов человека: метод ферментативно-колориметрической детекции, метод Либермана–Бурхарда, инфракрасная (ИК) спектроскопия и высокоеффективная жидкостная хроматография. Цель данной работы заключалась в выборе оптимального

метода, позволяющего проводить экспресс-анализ содержания холестерина в мембранах сперматозоидов человека в условиях лаборатории ЭКО.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Подготовка образцов для определения концентрации холестерина в мембранах сперматозоидов. В данной работе для определения концентрации холестерина в мембранах сперматозоидов был использован 101 эякулят пациентов с нормозооспермией. Сперматозоиды были отмыты от семенной плазмы для последующего определения холестерина одним из четырех методов: метод ферментативно-колориметрической детекции (ФКД) – 24 образца эякулята, ВЭЖХ – 14 образцов эякулята, метод Либермана–Бурхарда – 21 образец эякулята, ИК-спектроскопия – 42 образца эякулята. Метод ИК-спектроскопии потребовал объединения нескольких эякулятов (~6) для определения концентрации холестерина в мембранах сперматозоидов, таким образом этим методом было проанализировано 7 образцов.

Определение концентрации холестерина в мемbrane сперматозоидов методом ферментативно-колориметрической детекции (ФКД). Методы ферментативного анализа обычно применяются для определения содержания холестерина в плазме крови. Протокол метода ФКД был доработан для определения концентрации холестерина в мембранах сперматозоидов. Для определения концентрации холестерина в мембранах сперматозоидов экстракцию холестерина из мембран сперматозоидов проводили с использованием Triton X-100.

В результате исследования эякулятов пациентов было получено следующее среднее значение концентрации холестерина в мембранах сперматозоидов:

$$C_{ENZ} = 1 \pm 0.3 \text{ нмоль/млн.}$$

К основным преимуществам ферментативных методов можно отнести отсутствие необходимости работы с агрессивными химическими реактивами и исключительную специфичность ферментов, значительно снижающую влияние на аналитическую реакцию сторонних компонентов. Это делает ферментативные методы хорошими кандидатами для использования в качестве рутинных в пределах лаборатории ЭКО.

Определение концентрации холестерина непрямым методом Либермана–Бурхарда. Концентрацию холестерина определяли химическим непрямым (экстракционным) методом с экстракцией холестерина по методу Фолча с последующим фотометрическим определением продуктов реакции холестерина с реагентом Либермана–Бурхарда.

С помощью данного метода был проанализирован 21 образец эякулята пациентов. Количество холестерина в образце определяли по калибровочному графику. Для концентрации холестерина C_{LB} было получено следующее усредненное по выборке значение:

$$C_{LB} = 1.32 \pm 0.15 \text{ нмоль/млн.}$$

Полученный результат соотносится с литературными источниками [31, 32]. Однако, несмотря на точность получаемых результатов, этот метод требует сложной пробоподготовки образцов с использованием агрессивных летучих реагентов: концентрированной серной кислоты, уксусного ангидрида, метанола и хлороформа. Данный метод не подходит в качестве рутинного метода определения концентрации холестерина в условиях клинической лаборатории, его можно использовать только в условиях специально оборудованной химической лаборатории, однако он может быть рекомендован в качестве референсного метода с целью калибровки и выявления ошибок других методов и тест-систем.

Определение концентрации холестерина методом ВЭЖХ. Молекула холестерина обладает выраженным гидрофобными свойствами, что делает возможным проведение количественного анализа с использованием обращенно-фазовой хроматографии. В данной работе была использована ВЭЖХ-установка с УФ-детектором. Количество холестерина в образцах определяли по площади пика при $T_R = 8.4$ относительно калибровочного графика с известными концентрациями.

Массу холестерина в образце определяли по калибровочному графику, после чего рассчитывали среднюю концентрацию холестерина по формуле:

$$C_{HPLC} = \frac{m_{chol}}{M_{chol} \times N_{sperm}}, \quad (1)$$

где C_{HPLC} – концентрация холестерина в образце, нмоль/млн; m_{chol} – масса холестерина в образце, мкг; M_{chol} – молярная масса холестерина, мкг/моль; N_{sperm} – количество сперматозоидов в образце, млн.

В результате анализа 14 образцов эякулятов пациентов получено следующее среднее значение концентрации холестерина в сперматозоидах человека:

$$C_{HPLC} = 1.53 \pm 0.18 \text{ нмоль/млн.}$$

Определение концентрации холестерина методом ИК-спектроскопии. Молекула холестерина содержит следующие фрагменты, которые могут быть идентифицированы в ИК-спектроскопии: гидроксильную группу, двойную C=C-связь, а также CH₂-группы в системе конденсированных циклических фрагментов. Наиболее селективна для определения количества холестерина полоса поглощения при 1646 см⁻¹, соответствующая колебаниям двойной C=C-связи циклогексеновой группы. Для данного метода потребовались образцы, количество холестерина в которых значительно превышало физиологические значения. Для каждого образца необходимо было приготовить ~20 мг осущенного осадка сперматозоидов, что соответствует сбору и обработке ~6 эякулятов. Даже при таком количестве образца полоса поглощения при 1646 см⁻¹ слабо выражена. Среди наблюдаемых в ИК-спектре полос поглощения наибольшую интенсивность имеет полоса при 2940 см⁻¹, соответствующая возбуждению колебаний CH₂-групп в системе конденсированных циклических фрагментов, относительно которой были проведены дальнейшие расчеты.

Массу холестерина в образце определяли по калибровочному графику, после чего рассчитывали концентрацию холестерина в образце по формуле:

$$C_{IK} = \frac{m_{chol}}{M_{chol} \times N_{sperm}}, \quad (2)$$

где C_{IK} – концентрация холестерина в образце, нмоль/млн; m_{chol} – масса холестерина в образце, мг; M_{chol} – молярная масса холестерина, мг/моль; N_{sperm} – количество сперматозоидов в образце, млн.

Таблица 1. Средние концентрации холестерина (нмоль/млн) в сперматозоидах человека, полученные разными методами, и их сравнение с данными из литературных источников [31, 32]

Средняя концентрация холестерина, нмоль/млн					
ВЭЖХ	ферментативный анализ	ИК-спектроскопия	метод Либермана–Бурхарда	литературные данные [31]	литературные данные [32]
1.53 ± 0.18	1.0 ± 0.3	5.1 ± 1.8	1.32 ± 0.15	1.04 ± 0.12	1.2 ± 0.3

С помощью данного метода было проанализировано семь образцов, получено следующее среднее значение для концентрации холестерина в сперматозоидах человека:

$$C_{IK} = 5.1 \pm 1.8 \text{ нмоль/млн.}$$

Полученный результат значительно превышает значения, представленные в литературных источниках [31, 32], и данные, полученные с использованием других методов. Расхождение в результатах в первую очередь вызвано нестрогой селективностью полосы поглощения при 2940 см⁻¹, соответствующей возбуждению колебаний CH₂-групп, которые присутствуют не только в холестерине, но и во всех липидах мембранны.

Средние концентрации холестерина в мембранных сперматозоидах человека, полученные с использованием методов ФКД, Либермана–Бурхарда, ВЭЖХ и ИК-спектроскопии, представлены в табл. 1.

Представленные данные свидетельствуют о том, что результаты, полученные методами Либермана–Бурхарда, ВЭЖХ и ферментативного анализа, коррелируют с литературными данными [31, 32]. Среднее значение концентрации холестерина в сперматозоидах, полученное методом ФКД, ниже, чем значения, полученные с использованием метода Либермана–Бурхарда и ВЭЖХ. Это может быть обусловлено повышенной устойчивостью липидных рафтов, в которых преимущественно находится холестерин в клеточных мембранных, к воздействию детергента и, как следствие, неполной экстракцией холестерина. Среднее значение концентрации холестерина в мембранных сперматозоидах, полученное с помощью ИК-спектроскопии, значительно превышает значения концентрации холестерина, полученные с помощью других методов, и значительно отличается от значений, представленных в литературных источниках.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы. Набор реагентов для определения холестерина Холестерин-ФКД (Агат, Россия); раствор Дюльбекко с кальцием и магнием (DPBS, ПанЭко, Россия); холестерин, уксусный ангидрид (Sigma, США); хлороформ (х.ч.), метанол (х.ч.), серная кислота (о.с.ч.) (Реахим, Россия); бромид калия для спектроскопии (Aladdin, Китай).

Образцы спермы. В данной работе был использован 101 эякулят пациентов с установленной нормозооспермией (по критериям ВОЗ). До включения в исследование у всех участников было получено письменное информированное согласие. Критериями включения в исследование были следующие показатели: концентрация сперматозоидов в эякуляте – не менее 50 млн/мл; доля прогрессивно подвижных сперматозоидов категорий $a + b$ – не менее 32%; морфология – не менее 4% по Крюгеру; концентрация лейкоцитов в эякуляте – не более 0,1 млн/мл.

Подготовка образцов. К эякуляту добавляли раствор DPBS в соотношении 1 : 2 (v/v), центрифугировали при 300 g в течение 10 мин, отбирали супернатант, осадок ресуспенсировали в 2 мл DBPS и центрифугировали при 300 g в течение 10 мин. Отбирали супернатант, осадок ресуспенсировали в 200–500 мкл DPBS, в зависимости от объема осадка, производили подсчет концентрации клеток в камере Маклера (подсчет производили не менее 5 раз в разных аликовтах, рассчитывали среднее значение концентрации сперматозоидов в образце). Далее определяли концентрацию холестерина в образце с помощью одного из ниже-описанных методов.

Определение концентрации холестерина с помощью ферментативно-колориметрического метода. К 100 мкл супензии клеток добавляли 100 мкл 2%-ного раствора Triton X100 в DPBS, инкубировали в течение 1 ч при 37°C, после чего добавляли 2 мл ферментно-хромогенной смеси Холестерин ФКД (холестеролэстераза, холестеролксидаза, пероксидаза, аминоантипирин, гидроксибензолсульфонат натрия, холат натрия, фосфатный буфер). Для приготовления калибровочной пробы к стандартному раствору холестерина (51,7 нмоль холестерина в пробе объемом 200 мкл) добавляли 2 мл ферментно-хромогенной смеси. Образцы тщательно перемешивали на вортексе и инкубировали в течение

25 мин при 25°C в темноте. По окончании инкубации сперматозоиды осаждали посредством центрифугирования при 300 g в течение 10 мин. Супернатант отбирали для регистрации спектра поглощения на спектрофотометре ПЭ-5400УФ (ЭКРОСХИМ, Россия) в диапазоне длин волн 300–700 нм с шагом 1 нм в кюветах с длиной оптического пути 10 мм. Расчет концентрации холестерина в анализируемом образце производили во формуле:

$$C = \frac{E_0}{E_K} \times \frac{51.7}{n}, \quad (3)$$

где C – концентрация холестерина в исследуемом образце, нмоль/млн; E_0 – оптическая плотность опытной пробы при длине волны 514 нм; E_K – оптическая плотность калибровочной пробы при длине волны 514 нм; 51,7 – количество холестерина в калибровочной пробе, нмоль; n – количество сперматозоидов в образце, млн.

Экстракция липидов методом Фолча. Экстракцию липидов проводили в соответствии с методом Фолча [33]. К 100 мкл супензии клеток добавляли 4 мл раствора хлороформа-метанола (2 : 1, v/v) перемешивали на вортексе в течение 5 мин; добавляли 750 мкл воды и центрифугировали при 10 000 g в течение 15 мин при комнатной температуре; нижний органический слой, содержащий липиды, отбирали и повторяли процедуру экстракции (добавив 4,3 мл хлороформа 700 мкл метанола и 500 мкл воды, перемешивание 5 мин на вортексе; центрифугирование при 10 000 g в течение 15 мин); отбирали органический слой и объединяли с образцом, полученным на первом этапе; осушали пробы в ротационном испарителе Laborota-4000 (Heidolph, Германия).

Количественное определение холестерина по методу Либермана–Бурхарда. Высушенные экстракты липидов перерастворяли в 500 мкл реактива Либермана–Бурхарда (хлороформ/уксусный ангидрид/серная кислота 3 : 2 : 0,1, v/v/v). Для построения калибровочной кривой к серии стандартных растворов холестерина (20–200 нмоль холестерина в пробе объемом 10 мкл) добавляли 500 мкл реактива Либермана–Бурхарда. Образцы инкубировали 20 мин при 25°C в темноте. Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре ПЭ-5400УФ (ЭКРОСХИМ, Россия) в диапазоне длин волн 300–700 нм с шагом 1 нм в кюветах с длиной оптического пути 10 мм. Характерный спектр поглощения для реакции Либермана–

Бурхарда имеет два максимума поглощения при 410 и 650 нм. Для построения калибровочного графика и дальнейшего определения концентрации холестерина в образцах использовали значение оптической плотности при длине волны 650 нм.

Метод высокоеффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Высущенные экстракты липидов перерастворяли в 500 мкл подвижной фазы (изопропанол/ацетонитрил/вода 60 : 30 : 10, v/v/v). Хроматографическое определение содержания холестерина проводили с помощью ВЭЖХ-системы 1100 (Agilent, США), используя колонку с обращенной фазой Zorbax XDB-C18 4.6 × 150 мм × 5 мкм (Agilent, США). Условия хроматографического разделения: температура – 28°C, элюент А: изопропанол/ацетонитрил/вода (60 : 30 : 10, v/v/v), скорость потока 1 мл/мин, спектрофотометрический детектор DAD. Спектр поглощения получали при длине волны 205 нм. На колонку наносили 40 мкл образца. Общее время анализа составило 14 мин. Холестерин идентифицировали по времени удержания на колонке с помощью программного обеспечения Agilent (США). Для построения калибровочной кривой регистрировали хроматограммы для серии растворов холестерина (10–100 мкг в пробе изопропанол/ацетонитрил/вода объемом 40 мкл). Калибровочный график был построен на основе площади пика спектра, который наблюдался при TR, равном 8.4 мин, что соответствует времени удержания холестерина.

Метод ИК-спектроскопии. Полученный ранее после центрифугирования осадок клеток помещали в сушильный шкаф при 60°C на 48 ч до полного испарения жидкости. Подготовку проб для снятия ИК-спектров проводили методом взвесей в бромиде калия. На аналитических весах взвешивали 200 мг предварительно растертого спектрально чистого бромида калия и помещали в фарфоровую чашку. Для формирования конечного образца использовали высущенные клетки нескольких пациентов, которые объединяли до достижения общей массы образца ~20 мг. Высущенные клетки тщательно растирали в той же фарфоровой чашке, содержимое чашки тщательно перемешивали, полностью переносили в пресс-форму и прессовали, в результате чего получали прозрачную или полупрозрачную таблетку. Регистрировали ИК-спектр полученной таб-

летки на спектрометре Specord M80 (Carl Zeiss, Германия) в диапазоне частот 400–4000 см⁻¹. Для построения калибровочного кривой регистрировали ИК-спектры для серии навесок холестерина (1.1–4.7 мг холестерина в 200 мг бромида калия). Калибровочный график строили по высоте пика спектра на 2940 см⁻¹.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено сравнение четырех методов количественного анализа холестерина в мембране сперматозоидов человека. Было показано, что метод ИК-спектроскопии непригоден для определения концентрации холестерина в сперматозоидах отдельно взятого пациента или донора спермы, т.к. для данного метода требуется количество анализируемого материала, значительно превышающее объем одного эякулята.

Методы Либермана–Бурхарда, ферментативно-колориметрической детекции и ВЭЖХ показали схожие результаты, полученные средние значения концентрации холестерина совпадают в пределах погрешности. Вместе с тем методы Либермана–Бурхарда и ВЭЖХ предполагают более сложную пробоподготовку и использование агрессивных реагентов для экстракции липидов, что также исключает возможность их использования в качестве методов оценки концентрации холестерина в пределах лаборатории ЭКО, однако данные методы могут быть использованы в качестве референсных.

Метод ФКД имеет ряд значительных преимуществ как рутинный лабораторный способ определения концентрации холестерина в мембранах сперматозоидов по сравнению с методами Либермана–Бурхарда и ВЭЖХ. В первую очередь, это малая токсичность метода, а также меньшая стоимость реагентов и значительное уменьшение времени полного анализа: от пробоподготовки до получения конечного результата.

Метод ФКД может быть рекомендован в качестве метода экспресс-анализа концентрации холестерина в мембранах сперматозоидов в условиях лаборатории ЭКО.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках проекта 23-Ш01-15 междисциплинарной научно-образовательной школы МГУ им. М.В. Ломоносова “Фундаментальные и прикладные исследования космоса”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование было выполнено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики (Good clinical practice) и принципами Хельсинской декларации. Протокол исследования (протокол № 6 от 20.06.2019) был одобрен Этическим комитетом клиники репродукции человека “Альтравита”, ООО “ЭКО ЦЕНТР”. До включения в исследование у всех участников было получено письменное информированное согласие.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Все авторы внесли равнозначный вклад в написание статьи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Marquardt D., Kućerka N., Wassall S.R., Harroun T.A., Katsaras J. // Chem. Phys. Lipids. 2016. V. 199. P. 17–25.
<https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2016.04.001>
2. Subczynski W.K., Pasenkiewicz-Gierula M., Widomska J., Mainali L., Raguz M. // Cell Biochem. Biophys. 2017. V. 75. P. 369–385.
<https://doi.org/10.1007/s12013-017-0792-7>
3. Leonard A., Escrive C., Laguerre M., Pebay-Peyroula E., Neri W., Pott T., Katsaras J., Dufourc E.J. // Langmuir. 2001. V. 17. P. 2019–2030.
<https://doi.org/10.1021/la001382p>
4. Kessel A., Ben-Tal N., May S. // Biophys. J. 2001. V. 81. P. 643–658.
[https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(01\)75729-3](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(01)75729-3)
5. Harroun T.A., Katsaras J., Wassall S.R. // Biochemistry. 2006. V. 45. P. 1227–1233.
<https://doi.org/10.1021/bi0520840>
6. Harroun T.A., Katsaras J., Wassall S.R. // Biochemistry. 2008. V. 47. P. 7090–7096.
<https://doi.org/10.1021/bi0800123b>
7. Armstrong C.L., Marquardt D., Dies H., Kućerka N., Yamani Z., Harroun T.A., Katsaras J., Shi A.C., Rheinstädter M.C. // PLoS One. 2013. V. 8. P. e66162.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066162>
8. Armstrong C.L., Häussler W., Seydel T., Katsaras J., Rheinstädter M.C. // Soft Matter. 2014. V. 10. P. 2600–2611.
<https://doi.org/10.1039/c3sm51757h>
9. Armstrong C.L., Barrett M.A., Hiess A., Salditt T., Katsaras J., Shi A.C., Rheinstädter M.C. // Eur. Biophys. J. 2012. V. 41. P. 901–913.
<https://doi.org/10.1007/s00249-012-0826-4>
10. Kućerka N., Perlmutter J.D., Pan J., Tristram-Nagle S., Katsaras J., Sachs J.N. // Biophys. J. 2008. V. 95. P. 2792–2805.
<https://doi.org/10.1529/biophysj.107.122465>
11. Keller F., Heuer A. // Soft Matter. 2021. V. 17. P. 6098–6108.
<https://doi.org/10.1039/d1sm00459j>
12. Leftin A., Molugu T.R., Job C., Beyer K., Brown M.F. // Biophys. J. 2014. V. 107. P. 2274–2286.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.07.044>
13. Rog T., Pasenkiewicz-Gierula M. // FEBS Lett. 2001. V. 502. P. 68–71.
[https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)02668-0](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)02668-0)
14. Dahley C., Garessus E.D.G., Ebert A., Goss K.U. // Biochim. Biophys. Acta Biomembr. 2022. V. 1864. P. 183953.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2022.183953>
15. Khatibzadeh N., Gupta S., Farrell B., Brownell W.E., Anvari B. // Soft Matter. 2012. V. 8. P. 8350–8360.
<https://doi.org/10.1039/c2sm25263e>
16. Yeagle P.L. // Biochimie. 1991. V. 73. P. 1303–1310.
[https://doi.org/10.1016/0300-9084\(91\)90093-g](https://doi.org/10.1016/0300-9084(91)90093-g)
17. Jafurulla M., Chattopadhyay A. // Methods Mol. Biol. 2017. V. 1583. P. 21–39.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6875-6_3
18. Grouleff J., Irudayam S.J., Skeby K.K., Schiøtt B. // Biochim. Biophys. Acta. 2015. V. 1848. P. 1783–1795.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.03.029>
19. Epand R.M. // In: The Structure of Biological Membrane / Ed. Yeagle P.L. CRC Press, Boca Raton, 2005. P. 499–509.
20. Reichow S.L., Gonen T. // Curr. Opin. Struct. Biol. 2009. V. 19. P. 560–565.
<https://doi.org/10.1016/j.sbi.2009.07.012>
21. Tong J., Briggs M.M., McIntosh T.J. // Biophys. J. 2012. V. 103. P. 1899–1908.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.09.025>
22. Tong J., Carty J.T., Briggs M.M., McIntosh T.J. // Exp. Eye Res. 2013. V. 113. P. 32–40.
<https://doi.org/10.1016/j.exer.2013.04.022>
23. Fantini J., Epand R.M., Barrantes F.J. // Adv. Exp. Med. Biol. 2019. V. 1135. P. 3–25.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-14265-0_1
24. Fantini J., Di Scala C., Baier C.J., Barrantes F.J. // Chem. Phys. Lipids. 2016. V. 199. P. 52–60.
<https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2016.02.009>
25. Hedger G., Koldø H., Chavent M., Siebold C., Rohatgi R., Sansom M.S.P. // Structure. 2019. V. 27. P. 549–559.e2.
<https://doi.org/10.1016/j.str.2018.11.003>

26. George K.S., Wu S. // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2012. V. 259. P. 311–319.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.01.007>
27. Phillips M.C. // *J Biol Chem.* 2014. V. 289. P. 24020–24029.
<https://doi.org/10.1074/jbc.r114.583658>
28. Yancey P.G., Bortnick A.E., Kellner-Weibel G., de la Llera-Moya M., Phillips M.C., Rothblat G.H. // *Arterioscler. Thromb Vasc. Biol.* 2003. V. 23. P. 712–719.
<https://doi.org/10.1161/01.atv.0000057572.97137.dd>
29. Rosenson R.S., Brewer H.B., Jr., Davidson W.S., Fayad Z.A., Fuster V., Goldstein J., Hellerstein M., Jiang X.C., Phillips M.C., Rader D.J., Remaley A.T.,
- Rothblat G.H., Tall A.R., Yvan-Charvet L. // *Circulation.* 2012. V. 125. P. 1905–1919.
<https://doi.org/10.1161/circulationaha.111.066589>
30. Low H., Hoang A., Sviridov D. // *J. Vis. Exp.* 2012. V. 61. P. e3810.
<https://doi.org/10.3791/3810>
31. Sugkraroek P., Kates M., Leader A., Tanphaichitr N. // *Fertil. Steril.* 1991. V. 55. P. 820–827.
32. Force A., Grizard G., Giraud M.N., Motta C., Sion B., Boucher D. // *Int. J. Androl.* 2001. V. 24. P. 327–334.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2605.2001.00309.x>
33. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.M. // *J. Biol. Chem.* 1957. V. 226. P. 497–509.

Comparison of Methods for Rapid Determination of Cholesterol Concentration in Human Sperm Membrane in Clinical Laboratory Practice

A. G. Mironova^{*, **, #}, S. I. Afanasyeva^{*}, A. V. Sybachin^{****}, V. V. Spiridonov^{****}, M. A. Bolshakov^{*****}, and E. Yu. Simonenko^{***}**

[#]Phone: +7 (916) 167-00-88; e-mail: agm90@mail.ru

^{*}Human Reproduction Clinic “Altravita” (LLC “ECO CENTER”), ul. Nagornaya 4A, Moscow, 117186 Russia

^{**}N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences,
 ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia

^{***}Lomonosov Moscow State University, Faculty of Physics, Department of Biophysics.
 ul. Leninskie Gory 1/2, Moscow, 119991 Russia

^{****}Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, Department of High Molecular Compounds,
 ul. Leninskie Gory 1/40, Moscow, 119234 Russia

^{*****}FSBI “Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research
 of the Russian Academy of Sciences”,
 ul. Institutskaya 2, Pushchino, 119991 Russia

This study proposes a rapid method for the determination of cholesterol in human sperm membranes suitable for use in the clinical laboratory. Four physicochemical methods for the quantitative measurement of cholesterol were selected for comparison: the enzymatic cholesterol assay, the Liberman–Burkhardt method, the infrared spectroscopy and the high-performance liquid chromatography. The following cholesterol concentrations were obtained: 1.0 ± 0.3 , 1.32 ± 0.15 , 5.1 ± 1.8 , and 1.53 ± 0.18 nmol/ 10^6 cells, respectively. The following criteria of the applicability of the method were chosen: the amount of material to be analyzed, determined by the number of spermatozoa in the seminal fluid of a single ejaculate of a patient, the number of sample preparation steps that account for the systematic error of the analysis, and the total time of the analysis. The infrared spectroscopy method requires at least 20 mg of cellular sample, which is unrealizable for estimating cholesterol in sperm membranes of a single patient. The Liberman–Burkhardt and high-performance liquid chromatography methods require multi-step sample preparation and the use of aggressive volatile reagents. In turn, the enzymatic assay is optimal for the considered criteria, it allows rapid analysis of cholesterol in the sperm membrane of a single patient, and is suitable for use within the in vitro fertilization laboratory.

Keywords: cholesterol, sperm, membrane, chromatography, infrared spectroscopy, Lieberman–Burkhardt reaction