ЗАДУБЕНКО ДЕНИС ВЛАДИМИРОВИЧТЫҢ

«8D05101- Биология» білім беру бағдарламасы бойынша философия докторы (PhD) ғылыми дәрежесін алу үшін

«Көрінетін және инфрақызыл диапазондағы электромагниттік сәулеленудің адам сперматозоидтарының қозғалғыштығы мен ультрақұрылымдық ұйымдасуына әсері»

тақырыбында дайындалған диссертациясының

АҢДАТПАСЫ

Диссертациялық жұмыстың жалпы сипаттамасы. Қоғамның көмекші репродуктивті технологияларға (КРТ) сұранысының жоғары болуына және оның төмендеуге үрдісі болмағандығына байланысты, КРТ хаттамаларының тиімділігін арттыру үшін in vitro сперматозоидтардың қозғалғыштығын модуляциялау әдістерін іздеу өзекті болып табылады. Жануарлардың сперматозоидтарына электромагниттік сәулеленудің (ЭМС) тәжірибелік әсер ету жұмыстары өткен ғасырдың 80-жылдарының аяғында басталып, бүгінгі күнге дейін жалғасуда. Осы уақыт ішінде ЭМС барлық дерлік тірі объектілер үшін әмбебап энергия көзі болып табылатын аденозинтрифосфатты (АТФ) өндіруді қамтитын жасушалардағы маңызды процестерге айқын әсер ететіні белгілі болды. Тотығу фосфорлануының биохимиялық жолының бөлігі болып табылатын цитохромоксидаза белсенділігіне ЭМС әсері құжатталған. Бүгінгі таңда бедеулік ер адамдардың арасында кең таралуына байланысты ЭМС-тің астенозооспермия кезіндегі сперматозоидтардың қозғалғыштығына әсерін түсіну өзекті мәселе болып табылады. Акросома реакциясының белсендірілуі, акросоманың қалыпты немесе патологиялық жағдайы, постакросомалық пластинаның өзгеруі, хроматин конденсациясы, нуклеосоманың вакуолизация дәрежесі, сондай-ақ митохондриялық конформация сияқты сперматозоидтардың ультрақұрылымдық параметрлерінің өзгеруіне ЭМС әсерін анықтау қажет. Қазіргі таңда акросома мен нуклеосоманың құрылымының тығыздалуына, сперматозоидтар аксонемасының ұйымдастырылуына немесе дезорганизациясына, аксонеманың шеткері микротүтікшелерінің морфологиясының өзгеруіне ЭМС қалай әсер ететіні әлі де белгісіз. Ғылыми қауымдастықтың ЭМС-дің адам сперматозоидтарындағы энергетикалық процестеріне және ДНҚ фрагментациясының дәрежесіне әсеріне нақты көзқарасын қалыптастыру қажет. Адамның сперматозоидтарында өтетін энергетикалық процестерге және адам сперматозоидтарының ДНҚ фрагментациясына ЭМС әсері мен дәрежесі туралы ғылыми қоғамдастықтың көзқарасын қалыптастыру қажет. КРТ тиімділігін арттыру үшін ЭМС көмегімен сперматозоидтардың қозғалғыштығын өзгерту әдістерін іздеу практикалық өзекті мәселе болып табылады, өйткені сперматогенездің бұзылуымен сипатталатын жағдайлар бедеулік себептерінің шамамен жартысын құрайды. Криоконсервациядан кейін аталық гаметалардың қозғалғыштығын модуляциялау өзекті, жоғары мамандандырылған міндет

болып табылады, өйткені мұздағаннан кейін қозғалғыш сперматозоидтардың саны азаяды, сонымен қатар үдемелі қозғалатын сперматозоидтардың үлесі де азаяды.

Зерттеу нысаны: астенозооспермиясы бар бедеу ерлердің сперматозоидтары.

Зерттеу пәні. көрінетін және инфрақызыл ЭМС-дің әсерінен кейінгі адамның сперматозоидтарының ультрақұрылымдық ұйымы, қозғалғыштығы, ДНҚ фрагментация индексі және митохондриялық белсенділігі.

Зерттеу мақсаты: *in vitro* жағдайында аталық гаметалардың қозғалғыштығы мен ультрақұрылымдық ұйымына көрінетін және инфрақызыл диапазондағы ЭМС-дің эксперименттік әсерінің әлеуетін зерттеу.

Зерттеу міндеттері:

1. Бедеулік некелердегі ерлердің сперматогенез бұзылыстарының құрылымын анықтау.
2. Электромагнитті сәулелендіргіш құрылдығын құрастыру және оның зертханалық сынақтарын өткізу.
3. Астенозооспермия кезінде сперматозоидтардың қозғалғыштығына, адам сперматозоидтарының бас, мойын және құйрық ультрақұрылымына ЭМС әсерін зерттеу;
4. Эксперименттік жағдайда электромагниттік сәулеленудің ДНҚ фрагментация индексіне және сәулеленген сперматозоидтардың митохондриялық белсенділігіне әсерін бағалау;
5. ДНҚ фрагментация индексінің жоғарылауына және сперматозоидтардағы ультрақұрылымдық ауытқулардың пайда болуына әкелмейтін, сонымен бірге сперматозоидтардың қозғалғыштығына оң әсер ететін оңтайлы ЭМС режимін анықтау.

Зерттеу әдістері. Бедеу науқастардағы сперматогенез бұзылыстарының құрылымы Крюгер морфологиясын бағалаумен спермограмманы қолдану арқылы анықталды. Бедеуліктің иммунологиялық себептері IgG-ге аралас антиглобулин реакциясын қолдану арқылы зерттелді. Эксперименттік және бақылау эякулят аликвоттарындағы сперматозоидтардың қозғалғыштығы компьютерлік сперматозоидты талдау CASA (computer-assisted sperm analysis) көмегімен бағаланды. Адам сперматозоидтарының ультрақұрылымына электромагниттік сәулеленудің әсері трансмиссиялық электронды микроскопияны қолдану арқылы зерттелді. Митохондриялардың белсенділігі өмірлік маңызды флуоресцентті потенциалға тәуелді бояғыштармен бояу, содан кейін конфокальды лазерлік сканерлеу микроскопиясы арқылы зерттелді. ЭМС сперматозоидтардың генетикалық аппаратына әсері терминалдық дезоксинуклеотидилтрансфераза dUTP соңын таңбалау (TUNEL) әдісі арқылы бағаланды. Қолданылатын сәулеленудің толқын

ұзындығы жоғары сезімталдықты талшықты-оптикалық спектрофотометриямен, ал сәулелену қуаты толқындық қуат детекторымен өлшенді. Статистикалық талдау компьютерлік бағдарламаларды қолдану арқылы жүргізілді. ЭМС-дің сперматозоидтардың қозғалғыштығына әсері туралы алынған деректерді статистикалық талдау үшін жұптасқан Стьюденттің t-тесті қолданылды. Шағын үлгілермен және онымен байланысты деректермен жүргізілген тәжірибелер үшін Уилкоксонның ранг сынағы қолданылды. ЭМС-дің сперматозоидтардың ультрақұрылымдық ұйымдасуына әсерін анықтау үшін Бенджамини-Хохберг түзетуімен Фишердің дәл сынағы қолданылды.

Жұмыстың ғылыми жаңалығы. Орталық Азиядағы бедеу некеде тұратын ер адамдардағы сперматогенез бұзылыстарының құрылымы анықталды. Эякулят сапасындағы негізгі ауытқу сперматозоидтардың қозғалғыштығының төмендеуі (астенозооспермия) екені дәлелденді – бедеу некедегі ер адамдардың 38,6%-ында осы сипаттама бар, 47,1%-ы нормозооспермиялық болып саналады (N=957). Негізгі компоненттері монохроматикалық жарықдиодтар, ақ жарықдиод, қызыл лазер және инфрақызыл диод болып табылатын құрылғының зертханалық прототипі жасалды. Бұл құрылғы астенозооспермиямен ауыратын адамдарда *in vitro* сперматозоидтардың қозғалғыштығын арттыра алатыны зерттелді. Шығарылған толқындардың шың толқын ұзындықтары, қолданылатын ЭМС көздерінің қуаты және энергия тығыздығы сипатталған. Терминалды дезоксинуклеотидилтрансфераза dUTP соңын белгілеу (TUNEL) арқылы бағаланатындай, сперматозоидтардың ДНҚ фрагментация индексін арттырмай, қозғалғыштығына оң әсер ететін ЭМС-дің режимдері көрсетілген.

Митохондриялардың конфокальды лазерлік сканерлеу микроскопиясы арқылы жалпы энергия шығыны 0,02-ден 5,15 Дж-ге дейінгі ЭМС әсерінен кейін астенозооспермиямен ауыратын адам сперматозоидтарында митохондриялық энергия белсенділігінің арту тренді құжатталды.

Жұмыстың практикалық құндылығы маңыздылығы астенозооспермиямен ауыратын ерлерде сперматозоидтардың қозғалғыштығының артуына әкелетін эякуляттың ЭМС-дің режимдерін анықтауға мүмкіндік беретін зертханалық прототиптік құрылғыны жасаумен байланысты. *In vitro* жағдайында сперматозоидтардың қозғалғыштығын арттырудың балама әдісі әзірленді, ол болашақта ЭКО бағдарламаларында еркек факторының бедеулігін емдеудің тиімділігін арттыру құралы ретінде КРТ-да қолданылуы мүмкін.

Жұмыстың теориялық құндылығы сперматозоидтардың қозғалғыштығын арттыруда шешуші рөлді ЭМР әсер ету ұзақтығы емес, оның қуаты (4,46 мВт) атқаратынын көрсеттік. ЭМР-дің ультрақұрылымдық морфологиялық маркерлерге әсері LED, лазерлік және инфрақызыл ЭМР (LED 400-750, лазер 651 нм, инфрақызыл диод 933 нм, жалпы берілетін сәулелену

қуаты 4,46 мВт, жалпы берілетін энергиясы 4,01 Дж, уақыты 15 минут) комбинациясына ұшырағаннан кейін бағаланды. Қолданылған ЭМР режимі сперматозоидтардың келесі ультрақұрылымдық маркерлерінің өзгеруіне әкелетіні көрсетілді: «митохондрияның қалыпты пішіні», «акросоманың болуы», «қалыптан тыс талшықты қабат», «акросоманың қалыпты пішіні», бұл маркерлер электронды микроскопиясын (ТЭМ) жүргізу кезінде артефакт болуы мүмкін, бірақ соған қарамастан, бұл режимнің қауіпсіздігін одан әрі зерттеу қажеттілігін көрсетеді. ЭМР әсерінен кейін сперматозоидтардың қозғалғыштығының өзгеруінің ықтимал механизмдері туралы білім кеңейтілді. T.I. Karu бұрын сипаттаған цитохром-С оксидазасының фотоакцепциясы, АТФ гиперпродукциясы, ROS деңгейінің жоғарылауы және сперматозоидтардың сыйымдылығы сияқты құбылыстарға байланысты адам сперматозоидтарындағы осы процестерді белсендіретін ЭМС-дің энергия шегін табу арқылы кеңейтілді.

Қорғауға ұсынылған диссертацияның негізгі қағидалары:

1. Астенозооспермия – Орталық Азия мемлекеттерінде (Қазақстан, Өзбекстан) барлық эякулят аномалиялар арасында ең жиі кездесетін жағдай, бедеу ерлердің 38,6%-ында бұл симптом кездеседі (N=957).
2. Бедеу некеде тұратын ерлердің 47,1%-ында эякуляттың көрсеткіштері қалыпты жағдайда (N=957).
3. Астенозооспермия кезінде *in vitro* адам сперматозоидтарының қозғалғыштығын арттыра алатын негізгі компоненттері монохроматикалық жарықдиодтар, ақ жарықдиод, қызыл лазер және инфрақызыл диод болып табылатын құрылғының зертханалық прототипі жасалды.
4. 651 нм лазермен және 933 нм инфрақызыл жарықпен үйлесімде сәулелену қуатының тығыздығы 0,354 мВт/см2 және жалпы берілген энергиясы 1,34 Дж болатын монохроматикалық жарықдиодты жарық *in vitro* жағдайында адам сперматозоидтарының қозғалғыштығын теріс бақылаумен салыстырғанда статистикалық айтарлықтай деңгейде арттырады ($P<0,05$).
5. Сперматозоидтарды сәулелендіруіне қолданылған ЭМС-дің режимі - сәулелену көзінің қуаты 4,46 мВт және сәулелену қуатының тығыздығы 0,354 мВт/см2, жалпы өткізілген толқын энергиясы 4,01 Дж (светодиодтар 400-750 нм, лазер 651 нм, инфрақызыл диод 933 нм) - сперматозоидтардың келесі ультрақұрылымдық маркерлерінің: «митохондрияның қалыпты пішіні», «акросоманың болуы», «қалыптан тыс талшықты қабат», «акросоманың қалыпты пішіні» теріс бақылаумен салыстырғанда статистикалық айтарлықтай деңгейде ($P<0,05$) өзгеруіне әсер ететіндігі көрсетілді.
6. Сперматозоидтарды монохроматикалық жарықдиодты, лазерлік және инфрақызыл сәулеленудің комбинациясы арқылы өңдеу адамның сперматозоидтарындағы ДНҚ-дағы бір жіпті және қос тізбекті үзілістердің санын теріс бақылаумен салыстырғанда статистикалық

айтарлықтай арттырмайтындығы ДНҚ соңдарын терминалдық дезоксинуклеотидил трансфераза dUTP қатысуымен таңбалау арқылы зерттелді.

Негізгі ғылыми жұмыстың жоспарымен байланысы. Диссертациялық жұмыс Қазақстан Республикасы Үкіметі жанындағы Жоғары ғылыми-техникалық комиссия бекіткен ғылыми дамудың басым бағыты (Өмір және денсаулық ғылымы) аясында орындалды және негізгі ғылыми жұмыс болып табылады.

Докторанттың әрбір басылымды дайындауға қосқан жеке үлесі: ғылыми әдебиеттерге шолу, эксперименттерді жоспарлау және жүргізу, алынған деректерді жинау, оларды түсіндіру және статистикалық өңдеу, сондай-ақ нәтижелерді кейіннен талқылаумен сипаттау жұмыстарын жеке өткізді.

Ғылыми-зерттеу жұмысының апробациясы. Диссертация материалдары халықаралық ғылыми конференцияларда, форумдарда және конгрестерде ұсынылып, талқыланды: «Фараби әлемі» студенттер мен жас ғалымдардың халықаралық ғылыми конференциясы (2020, 2022, 2023 ж., Алматы, Қазақстан); Қазақстан Республикасы Тәуелсіздігінің 30 жылдығын мерекелеуге арналған «Қазақстандағы және әлемдегі генетикалық зерттеулердің келешегі мен жетістіктері» атты дөңгелек үстел (9 желтоқсан 2021 ж., Алматы, Қазақстан); «Ломоносов-2022» студенттердің, магистранттардың және жас ғалымдардың Халықаралық ғылыми конференциясы (2022, 2024 ж., Ресей Федерациясы, Мәскеу қ.); Қазақстандық репродуктивті медицина қауымдастығының халықаралық конгресі (10-12 қараша, 2022 ж. Астана, Қазақстан); «Биология ғылымдарының тұрақты дамуының заманауи тенденциялары» халықаралық форумы (27-28 наурыз, 2024 ж., Алматы, Қазақстан); «ISRG-2025» Халықаралық репродуктивті генетика қоғамының халықаралық конференциясы (2025 жылғы 6-8 маусым, Чанша, Қытай Халық Республикасы).
Орталық Азиядағы сперматогенез бұзылыстарының құрылымы туралы деректер мақалалар мен баяндамалар түрінде Дүниежүзілік денсаулық сақтау ұйымының баспа органдарына – Біріккен Ұлттар Ұйымының Халық денсаулығы бөліміне, Американдық репродуктивті медицина қоғамының баспа органына жіберілді.

Жарияланымдар. Диссертацияның негізгі мазмұны 12 баспа жұмысында, оның ішінде Scopus дерекқорына кіретін журналдарда 3 мақалада, ҚР ҒжЖБМ ЖБССҚЕК тізібесіне енгізілген журналдарда 3 мақалада көрсетілген; халықаралық ғылыми конференциялар материалдарында 7 тезистерінде көрсетілген.