АННОТАЦИЯ

диссертации на соискание степени доктора философии (Ph.D.) по образовательной программе «8D05101 – Биология»

Задубенко Дениса Владимировича

на тему: **«Влияние электромагнитных излучений видимого и инфракрасного диапазонов на подвижность и ультраструктурную организацию сперматозоидов человека»**

Актуальность исследования. В связи с высокой потребностью общества во вспомогательных репродуктивных технологиях (ВРТ), не имеющей тенденции к снижению, актуален поиск способов модулирования подвижности сперматозоидов *in vitro* для повышения эффективности протоколов ВРТ. История экспериментального воздействия электромагнитного излучения (ЭМИ) на сперматозоиды животных начинается с конца 80-х годов прошлого столетия и продолжается по сей день. За это время стало известно, что ЭМИ имеет выраженное влияние на важнейшие процессы в клетках, в число которых входит продукция аденозитрифосфата (АТФ) – универсального источника энергии почти для всех живых объектов. Задокументировано влияние ЭМИ на активность цитохромоксидазы - части биохимического пути окислительного фосфорилирования. На сегодняшний день, актуально понимание влияния ЭМИ на подвижность сперматозоидов при астенозооспермии ввиду наибольшей распространенности этого состояния среди бесплодных мужчин. Необходимо установление влияния ЭМИ на изменение таких ультраструктурных параметров сперматозоида как активация акросомной реакции, нормальное или патологическое положение акросомы, изменения постакросомной пластины, конденсация хроматина, степень вакуолизации нуклеосомы, а также конформации митохондрий. До сих пор не понятно, как ЭМИ влияет и влияет ли вообще, на компактизацию содержимого акросомы и нуклеосомы, организацию или дезорганизацию аксонемы сперматозоидов, изменение морфологии периферических микротрубочек аксонемы. Необходимо формирование взгляда научного сообщества о влиянии ЭМИ на энергетические процессы в сперматозоидах человека и степень фрагментации их ДНК. Поиск методов изменения подвижности сперматозоидов при помощи ЭМИ для повышения эффективности ВРТ имеет практическую актуальность, поскольку состояния, характеризующиеся нарушением сперматогенеза, составляют, приблизительно, половину случаев причин бесплодного брака. Модулирование подвижности мужских гамет после криоконсервации является актуальной узкоспециализированной задачей, так как число подвижных сперматозоидов после заморозки уменьшается, снижается также и доля прогрессивно-подвижных сперматозоидов.

Объекты исследования:

Эякулят бесплодных мужчин с астенозооспермией

Предмет исследования. Ультраструктурная организация, подвижность, индекс фрагментации ДНК и активность митохондрий сперматозоидов человека после воздействия ЭМИ видимого и инфракрасного диапазонов

Цель исследования. Изучить потенциал экспериментального воздействия ЭМИ видимого и инфракрасного диапазонов на подвижность и ультраструктурную организацию мужских гамет *in vitro*.

Задачи исследования.

1. Определить структуру нарушений сперматогенеза у мужчин в бесплодных браках
2. Сконструировать и собрать прибор - электромагнитный излучатель, провести его лабораторные испытания.
3. Определить влияние электромагнитного излучения на подвижность сперматозоидов при астенозооспермии, изучить влияние ЭМИ на ультраструктуры головки, шейки и хвоста сперматозоидов человека.
4. Оценить в условиях эксперимента воздействие электромагнитного излучения на индекс фрагментации ДНК и митохондриальную активность облученных сперматозоидов
5. Определить оптимальный режим ЭМИ, положительно влияющий на подвижность сперматозоидов, не приводящий к увеличению индекса фрагментации ДНК и появлению ультраструктурных аномалий в сперматозоидах.

Методы исследования. Определение структуры нарушений сперматогенеза у пациентов с бесплодием проводили при помощи спермограммы с оценкой морфологии по Крюгеру. Иммунологические причины бесплодия исследовали путём смешанной антиглобулиновой реакции к IgG. Подвижность сперматозоидов в экспериментальных и контрольных аликвотах эякулята оценена с помощью компьютерного анализа подвижности сперматозоидов - CASA (computer-assisted sperm analysis). Исследование влияния ЭМИ на ультраструктуры сперматозоидов человека осуществляли методом трансмиссионной электронной микроскопии. Активность митохондрий регистрировали окрашиванием витальными флуоресцентными потенциал-зависимыми красителями с последующей конфокальной лазерной сканирующей микроскопией. Оценку воздействия электромагнитного излучения на генетический аппарат сперматозоидов осуществили методом мечения концов ДНК терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазой dUTP (TUNEL). Длины волн применяемого излучения измеряли высокочувствительной оптоволоконной спектрофотометрией, мощность излучения замерена детектором волновой мощности. Статистический анализ проводили при помощи компьютерных программ. Парный t-критерий Стьюдента был применен для статистической обработки полученных данных о влиянии ЭМИ на подвижность

сперматозоидов. Для экспериментов с малой выборкой и связанными данными применен тест Уилкоксона. При определении влияния ЭМИ на ультраструктурную организацию сперматозоидов применяли статистический метод анализа - точный критерий Фишера с поправкой Бенджамини–Хохберга

Научная новизна исследования. Определена структура нарушений сперматогенеза у мужчин в бесплодных браках, проживающих на территории Центральной Азии. Показано, что основным отклонением в качестве эякулята является снижение скорости движения сперматозоидов (астенозооспермия) - 38,6% мужчин в бесплодных браках имеют этот признак. 47,1% мужчин, проживающих в бесплодном браке, имеют заключение о нормозооспермии (N=957). Создан лабораторный прототип устройства, основными компонентами которого являются монохроматические светодиоды, белый светодиод, красный лазер и инфракрасный диод, способного *in vitro* увеличивать подвижность сперматозоидов человека при астенозооспермии. Описаны пики длин испускаемых волн, мощность и энергетическая плотность используемых источников ЭМИ. Показаны режимы ЭМИ, которые положительно влияют на подвижность сперматозоидов и при этом не увеличивают индекс фрагментации их ДНК, оцененного с помощью мечения концов ДНК терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазой dUTP (TUNEL). Посредством конфокальной лазерной сканирующей микроскопии митохондрий задокументирован тренд на увеличение энергетической активности митохондриального аппарата сперматозоидов человека при астенозооспермии после воздействия ЭМИ с общей сообщаемой энергией от 0,02 до 5,15 Дж.

Практическая значимость исследования связана с созданием лабораторного прототипа устройства, с помощью которого были найдены режимы обработки эякулята ЭМИ, приводящие к увеличению подвижности сперматозоидов человека у мужчин с астенозооспермией. Разработан альтернативный способ увеличения подвижности сперматозоидов *in vitro,* который в будущем может быть применен в отрасли ВРТ в качестве средства, увеличивающего эффективность лечения мужского фактора бесплодия в программах ЭКО.

Теоретическая значимость. Нами показано, что решающую роль в увеличении подвижности сперматозоидов играет не длительность воздействия ЭМИ, а его мощность (4,46 мВт). Оценено влияние ЭМИ на ультраструктурные морфологические маркеры после воздействия сочетания светодиодного, лазерного и инфракрасного ЭМИ (светодиод 400-750, лазер 651 нм, инфракрасный диод 933 нм, общая сообщаемая мощность излучения 4,46 мВт, общая сообщаемая энергия 4,01 Дж, время 15 минут). Показано, что используемый режим ЭМИ приводит к изменениям в следующих ультраструктурных маркерах сперматозоидов: «нормальная форма

митохондрий», «присутствие акросомы», «аномальный фиброзный слой», «нормальная форма акросомы», что может быть артефактом при проведении трансмиссионной электронной микроскопии(ТЭМ), но тем не менее указывает на необходимость дальнейших исследований безопасности данного режима. Дополнены знания о вероятных механизмах изменения подвижности сперматозоидов после воздействия ЭМИ за счёт ранее описанных T.I. Karu явлений фотоакцептивности цитохром-С-оксидазы, гиперпродукции АТФ, повышения уровня АФК и капацитации сперматозоидов путём нахождения энергетического порога ЭМИ, активирующие эти процессы в сперматозоидах человека.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Астенозооспермия является наиболее распространенным состоянием среди всех отклонений эякулята в Центральной Азии (Казахстан, Узбекистан), всего 38,6% бесплодных мужчин имеют этот признак (N=957).
2. Показано, что 47,1% мужчин, живущих в бесплодном браке, имеют нормальные параметры эякулята (N=957).
3. Создан лабораторный прототип устройства, основными компонентами которого являются монохроматические светодиоды, белый светодиод, красный лазер и инфракрасный диод, способного *in vitro* увеличивать подвижность сперматозоидов человека при астенозооспермии.
4. Монохроматическое светодиодное излучение в сочетании с 651-нанометровым лазерными и 933-нанометровым инфракрасным излучением с плотностью мощности излучения 0,354 мВт/см^2 и общей сообщаемой энергией 1,34 Дж статистически значимо увеличивают подвижность сперматозоидов человека *in vitro* по сравнению с отрицательным контролем ($P<0,05$).
5. Облучение сперматозоидов при мощности источника излучения 4,46 мВт и плотности мощности излучения 0,354 мВт/см^2 с общей сообщаемой волновой энергией 4,01 Дж (светодиоды 400-750, лазер 651 нм, инфракрасный диод 933 нм) показало, что используемый режим ЭМИ приводит к статистически значимым изменениям в таких ультраструктурных маркерах сперматозоидов как нормальная форма митохондрий, присутствие акросомы, аномальный фиброзный слой, нормальная форма акросомы по сравнению с отрицательным контролем ($P<0,05$).
6. Обработка сперматозоидов сочетанием монохроматического светодиодного, лазерного и инфракрасного излучений не приводит к увеличению чисел однонитевых и двунитевых разрывов в составе ДНК сперматозоидов человека, которые зарегистрированы мечением с участием терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазы dUTP по сравнению с

отрицательным контролем.

Связь с планом основных научных работ. Диссертационная работа выполнялась в рамках приоритетного направления развития науки, утвержденному Высшей научно-технической комиссией при Правительстве Республики Казахстан (Наука о жизни и здоровье) и является основной научной работой.

Личный вклад докторанта в подготовку каждой публикации включает обзор научной литературы, планирование и проведение экспериментов, сбор полученных данных, их интерпретацию и статистическую обработку, а также описание результатов с последующим обсуждением.

Апробация научно-исследовательской работы. Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на международных научных конференциях, конгрессах, форумах и круглых столах: Международная научная конференция студентов и молодых ученых «Фараби әлемі» (2020, 2022, 2023 г., Алматы, Казахстан); Круглый стол «Перспективы и достижения генетических исследований в Казахстане и мире», посвященный празднованию 30-летия Независимости Республики Казахстан (9 декабря 2021, г. Алматы, Казахстан); Международный молодежный научный форум «Ломоносов» (2022, 2024 г., г. Москва, Российская Федерация); Международный конгресс Казахстанской Ассоциации Репродуктивной Медицины (10-12 ноября 2022 г. Нур-Султан, Казахстан); Международный форум «Современные тенденции устойчивого развития биологических наук» (27-28 марта 2024, г. Алматы, Казахстан); Международная конференция Международного общества репродуктивной генетики «ISRG-2025» (6-8 июня 2025, г. Чанша, Китайская Народная Республика).

Данные по структуре нарушений сперматогенеза в Центральной Азии направлены в виде отчетов в печатные органы Всемирной организации здравоохранения – подразделение по охране здоровья народонаселения Организации Объединенных Наций и печатный орган Американского общества репродуктивной медицины.

Публикации. Основное содержание диссертации отражено в 12 печатных работах, в том числе 2 работы в изданиях, входящих в базу данных Scopus; 3 статьи в журналах, входящих в перечень КОКСНВО МНВО РК; 7 тезисов в материалах международных конференций.