

АННОТИРОВАННЫЙ ОТЧЕТ
о результатах НИР по гранту за 2024-2025 год

Конкурс 2024 года на соискание грантов
для поддержки научно-исследовательской работы
аспирантов и молодых сотрудников ИГУ.

Направление: Биология, почвоведение и биотехнологии

Шифр гранта: № 091-24-315

1. Наименование НИР по гранту: Оценка воздействия вторичных метаболитов оксифильных микроорганизмов озера Байкал на физиологические параметры сперматозоидов млекопитающих *in vitro*

2. Структурное подразделение (кафедра, лаборатория): Лаборатория экспериментальной нейрофизиологии НИЧ ФГБОУ ВО «ИГУ»

3. Исполнитель НИР: Шелковникова Виктория Николаевна

4. Координаты исполнителя НИР: тел. +79247515850, эл. почта shelkovnikova551@gmail.com

5. Ожидаемые результаты в соответствии с заявленным планом работы:

- Провести экстракцию природных соединений, синтезируемых байкальскими оксифильными микроорганизмами.
- Оценить влияния концентрированных экстрактов на мужские половые клетки;
- Оценить влияния разбавленных экстрактов на мужские половые клетки.

6. Основные полученные научные результаты:

В ходе выполнения исследования проводили глубинное культивирование штаммов, выделенных из экосистемы озера Байкал, в жидкой питательной среде TSB с подачей стерильного кислорода. Поддержание уровня повышенного содержания кислорода было обеспечено кислородными генераторами.

Содержимое колб, снятых с культивирования, было перенесено в стерильные пробирки типа Falcon, объемом 50 мл. Биомассу от культуральной жидкости отделяли посредством центрифугирования пробирок в течение 10 мин при 3 000

об/мин. С помощью ультразвуковой ванны разрушали клеточную стенку бактериальных клеток 15 минут при температуре 20°C. В культуральную жидкость добавляли 20 мл этилацетата, а к биомассе бактерий добавляли 10 мл смеси растворителей метанол:ацетон (1:1). Экстракцию соединений проводили на шейкере при интенсивном встряхивании (200 об/мин) один час с последующим центрифугированием при 3 000 об/мин в течение 10 мин. Верхнюю фракцию переносили в заранее взвешенные вials для получения сухого вещества экстрактов, которое получали при сушке в вакуумном шкафу после нескольких дней. Полученное сухое вещество взвешивали и растворяли в метаноле в концентрации 10 мг/мл для дальнейшей оценки антиоксидантной активности и последующего анализа влияния экстрактов на мужские половые клетки *in vitro*.

В эксперименте использовали эякулят мужчин-добровольцев активного репродуктивного возраста 25-35 лет). После ознакомления с методами и задачами исследования, каждый участник дал письменное согласие на проведение исследования. Эякулят был доставлен в лабораторию в термостатируемом контейнере в течение часа от момента сбора. Оценку репродуктивного потенциала экстрактов с антиоксидантной активностью проводили с использованием микроскопа PLS-MY-B041A-3, программного обеспечения «Semen and sperm quality analyze system» (V1.12) и 96 луночного планшета с оптически прозрачным дном.

Сухой экстракт биомассы *Bacillus* sp. 2021M9, содержащий соединения с антиоксидантной активностью, был разведен метанолом до концентрации 10 мг/мл. Эксперимент был проведен по следующей схеме: для контрольных условий в 96 луночный планшет наносили 25 мкл метанола и высушивали при 37°C до полного испарения. После этого к испарившемуся метанолу добавляли 150 мкл эякулята. Экспериментальные образцы были разделены на 3 группы. Для первой группы использовали концентрированный экстракт штамма в объеме 25 мкл. Экстракт высушивали при 37°C до полного испарения и добавляли 150 мкл эякулята. Для второй группы концентрированный экстракт был разбавлен в 2 раза (12,5 мкл экстракта + 12,5 мкл метанола). Для третьей группы экстракт был разбавлен в 5 раз

(5 мкл экстракта + 20 мкл метанола). Далее разбавленные экстракты также подвергали высушиванию и добавляли 150 мкл эякулята. Анализ проводили в семи аналитических повторностях. Измерение физиологических параметров сперматозоидов проводили после одного часа, трех и шести часов инкубации при 37°C по протоколам, описанным в Руководстве Всемирной организации здравоохранения по работе с эякулятом человека.

В ходе измерений физиологических параметров сперматозоидов было зафиксировано, что после одного часа в экстракте *Bacillus* sp. 2021M9 с концентрацией 2 мг/мл отмечали статистически значимое повышение ($89,3 \pm 9,6\%$) процента подвижности сперматозоидов, по сравнению с контролем ($80,9 \pm 12,1\%$). После трех часов инкубации в экстрактах с концентрациями 2 мг/мл ($92 \pm 6,7\%$) и 5 мг/мл ($92,5 \pm 9\%$) статистически значимо повысился процент подвижности сперматозоидов, по сравнению с контролем ($80,9 \pm 12,1\%$) (рис. 1).

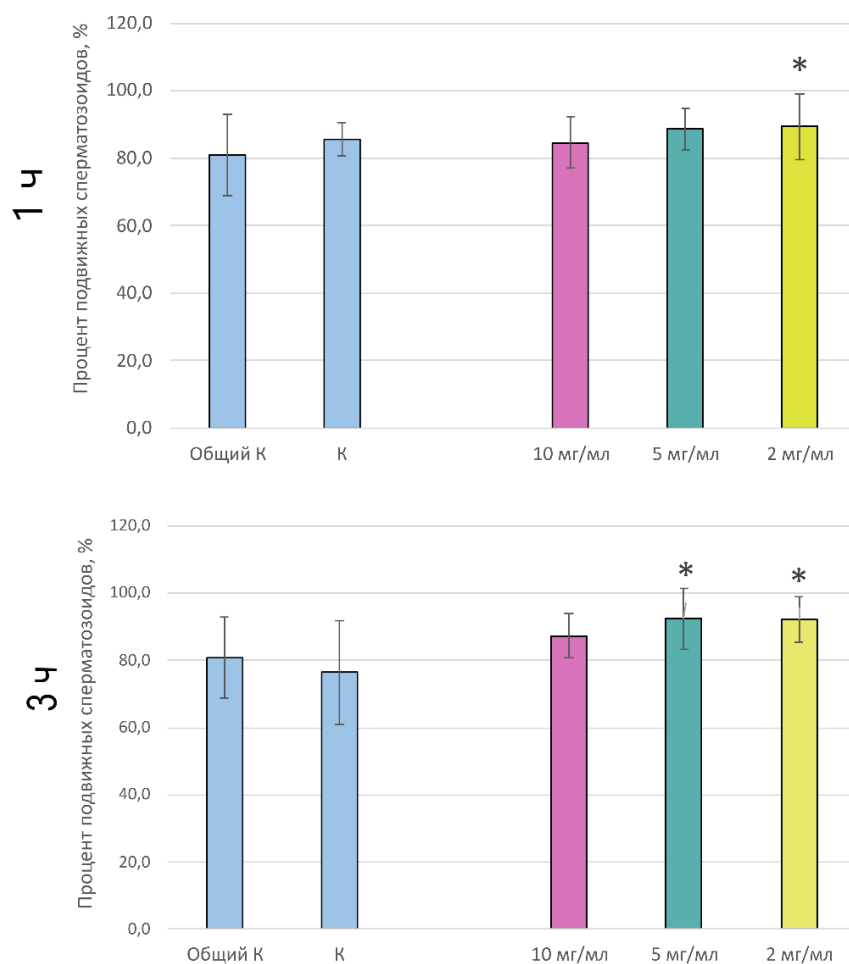


Рис. 1. Показатель процента подвижных сперматозоидов при воздействии экстракта *Bacillus* sp. 2021M9 после 1 и 3 часов

Показатель локальной подвижности после одного часа инкубации был статистически значимо повышен в экстракте с концентрацией 2 мг/мл ($73,2 \pm 11,5$ мкм/сек), по сравнению с контролем ($56,7 \pm 11,1$ мкм/сек). После трех часов локальная подвижность была статистически значимо повышена в экстрактах с концентрацией 10 мг/мл ($77,7 \pm 9,5$ мкм/сек) и 2 мг/мл ($82,6 \pm 14,2$ мкм/сек), по сравнению с контролем ($59,4 \pm 16,1$ мкм/сек) (рис. 2).

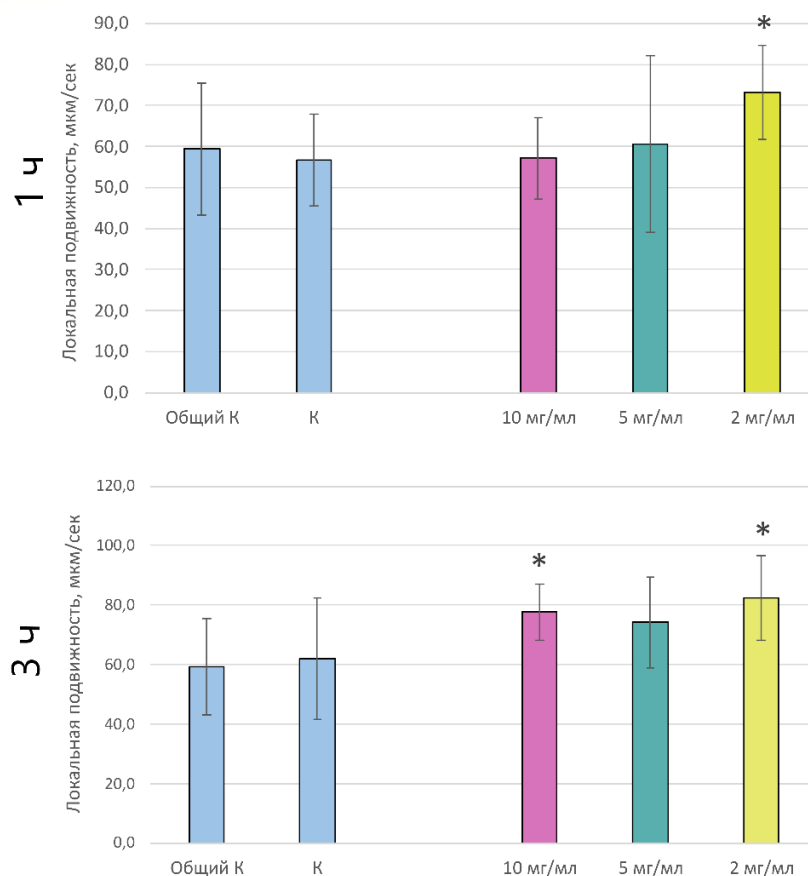


Рис. 2. Показатель локальной подвижности сперматозоидов при воздействии экстракта *Bacillus* sp. 2021M9 после 1 и 3 часов

После одного часа инкубации статистически значимо повысилась прямолинейность сперматозоидов в экстракте с концентрацией 5 мг/мл ($52,5 \pm 5,7$), по сравнению с контролем ($43,4 \pm 9,2$) (рис. 3).

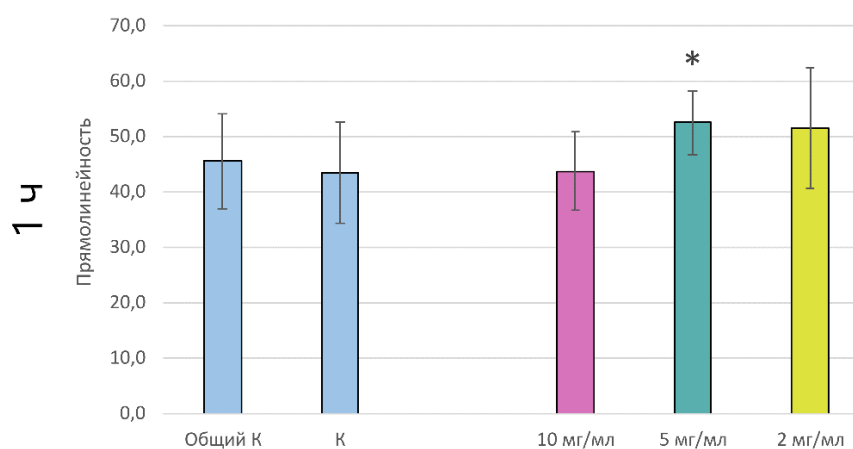


Рис. 3. Показатель прямолинейности сперматозоидов при воздействии экстракта *Bacillus* sp. 2021M9 после 1 часа

7. Предполагаемое использование результатов, в том числе в учебном процессе:

После завершения исследования основные результаты планируется опубликовать в рецензируемых научных российских и международных журналах. Также предполагается использовать полученные результаты в подготовке кандидатской диссертации руководителя гранта.

8. Перечень публикаций по результатам работы (статьи, доклады) с приложением оттисков или рукописей, направленных в печать:

1. Биофармацевтический потенциал байкальских оксифильных микроорганизмов / В.Н. Шелковникова, М.Е. Дмитриева, А.А. Баталова [и др.] // Научная конференция, посвященная 60-летию ТИБОХ ДВО РАН и 95-летию со дня рождения его основателя академика Г.Б. Еякова. 12-13 сентября 2024 г. Владивосток, сборник тезисов. - С. 42.

2. Оксифильные микроорганизмы озера Байкал: новые возможности для терапии заболеваний, связанных с окислительным стрессом / М.Е. Дмитриева, В.Н. Шелковникова, А.А. Баталова [и др.] // XV Всероссийская научная конференция с международным участием Молодежного научного общества «МОЛОДАЯ ФАРМАЦИЯ – ПОТЕНЦИАЛ БУДУЩЕГО». 7 апреля 2025 г., г. Санкт-Петербург. – принята к печати.

Исполнитель НИР по гранту _____ (Шелковникова В.Н.)