

число которого составило 10^2 кл/г. Преимущественно встречались палочковидные бактериальные клетки. Для селекции углеводородокисляющих микроорганизмов использовали жидкие минеральные среды (Среда Ридера) с добавлением нефтепродуктов в качестве единственного источника углерода. Из 10 микроорганизмов, выделенных из проб, взятых из различных источников, только 5 штаммов бактерий проявили способность к синтезу биосурфактантов. На средах со СТАВ агаром и метиленовым синим наблюдались темно-синие ореолы вокруг выделенных колоний. Перспективные штаммы были высеяны на плотные среды, проведен морфологический анализ выделенных микроорганизмов. Все выделенные штаммы представляли собой палочковидные бактерии с размером 1-2 мкм и проявляли эмульгирующую активность по отношению к нефти как для нативной культуральной жидкости, так и для бесклеточных экстрактов.

Штамм, выделенный из нефтешлама, выращенный на масле и на глюкозе, проявил наибольшую эмульгирующую активность по отношению к нефти, равную 74% и 92% соответственно.

При первичном скрининге поверхностного натяжения на гидрофобной поверхности парафила М наибольшая активность выявлена у штамма, выделенного из активного ила. Показана перспективность использования выделенных штаммов для биоремедиации нефтезагрязненных сред.

Литература

1. Рудакова М.А., Галицкая П.Ю., Селивановская С.Ю. Биосурфактанты: Современные тренды применения // Ученые записки казанского университета. Серия Естественные науки. 2021. Т. 163, № 2. С. 177–208.
2. Kosaric N. Biosurfactants and Their Application for Soil Bioremediation. // Food Technology and Biotechnology. 2001. №39(4). P. 295-304
3. Цыплюк В. А. Современное применение биосурфактантов в медицине // Вестник ПНИПУ. Химическая технология и биотехнология №3. 2022. С. 31-45.

УДК: 636.2:591. 391.1:57.085.23

DOI: <http://doi.org/10.20914/2304-4691-2025-1-56-58>

ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ ИЗ ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТИ КОРОВ В РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЯХ ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ КАЧЕСТВА ЭМБРИОНОВ IN VITRO

Г.Н. Сингина, Е.Н. Шедова

ФГБНУ “Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста”,
Московская обл., Подольск, Россия

Развитие репродуктивных биотехнологий, в том числе производство эмбрионов, нацелены на увеличение воспроизводства и ускорения генетической селекции высокопродуктивных животных. Для оптимизации генетического отбора особенно важны технология получения жизнеспособных эмбрионов in vitro (IVP) и технология переноса их животным-реципиентам [1]. Тем не менее качество эмбрионов, полученных in vitro уступает таковым полученных in vivo. Как известно, эффективность IVP технологии определяется не только качеством исходной популяции гамет, выделенных из яичников животных, но и условиями среды, окружающей ооциты in vitro [2]. Наиболее важный этап культивирования — это созревание ооцитов. Посредством его моделирования можно существенно повысить как количественные (доля эмбрионов на стадии бластоцисты), так и качественные (полноценность бластоцист) показатели эффективности IVP метода [3]. Научное сообщество постоянно совершенствует научные исследования для улучшения систем созревания ооцитов путем добавления различных молекулярных факторов в культуральные среды для IVM. Известно, что эти факторы важны для компетенции к эмбриональному развитию ооцитов, которая приобретается вовремя фолликулогенеза яичника при плотной двунаправленной связи между ооцитом и окружающими фолликулярными клетками [4, 5].

Недавние фундаментальные исследования выявили внеклеточные секреторные гранулы – внеклеточные везикулы (extracellular vesicles, EVs), в качестве новых участников межклеточных коммуникаций, которые секретируются клетками и переносят разные регуляторные факторы (РНК, белки, липиды) в другие

клетки, которые могут поглощать эти EVs [6,7]. В фолликулах коровьих яичников EVs присутствуют в фолликулярной жидкости (ФЖ) [8] и поэтому могут быть индикаторами их компетентности [9].

Руководствуясь вышесказанным в данной работе было оценено влияние EVs фолликулярного происхождения (ffEVs) в период IVM ооцитов коров на их способность к эмбриональному развитию *in vitro* и на качество IVP эмбрионов.

Выделенные *post mortem* ооцит-кумулюсные комплексы (ОКК) культивировали в среде TC-199, содержащая 3 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 0.5 мМ пирувата натрия, 100 нг/мл EGF и 50 мкг/мл гентамицина в отсутствие (контроль) или в присутствии EVs-FF. Везикулярный белок добавляли к среде созревания в следующих концентрациях: 1) в количестве эквивалентном содержанию белка в 1 мл ФЖ (к 1 мл среды добавляли ffEVs выделенных из 1 мл ФЖ) (ffEVs 1:1); 2) в количестве эквивалентном содержанию белка в 0.5 мл ФЖ, то есть в двое разбавленной (к 1 мл среды добавляли ffEVs выделенных из 0.5 мл ФЖ) (ffEVs 1:2); 3) в двойной концентрации (к 1 мл среды добавляли ffEVs выделенных из 2 мл ФЖ) (ffEVs 2:1). Через 24 часа ОКК переносили в среду ВО-IVF. Активные сперматозоиды, полученные методом swim-up, как описано ранее [10], добавляли в лунки с созревшими ооцитами в конечной концентрации 1×10^6 сперматозоидов/мл. Во всех экспериментах для оплодотворения ооцитов использовали заморожено-оттаянную сперму одного быка. Через 16-18 ч совместной инкубации со спермой ооциты осторожно пипетировали и отмывали в среде оплодотворения для освобождения от клеток кумулюса и налипших сперматозоидов. Одновременно с промывом проводили морфологическую оценку изолированных ооцитов, подсчитывая число яйцеклеток с направительными тельцами (первым или вторым) и определяя процент созревания. Предполагаемые зиготы переносили в среду ВО-IVC и культивировали в течение 5 суток, после чего развивающиеся эмбрионы помещали в ту же среду, содержащую 5 % фетальной бычьей сыворотки. На 2-й день после оплодотворения ооцитов проводили морфологическую оценку раздробившихся зигот, на 7-й день определяли число эмбрионов, развившихся до стадии бластоцисты.

Дополнительно, полученные на 7-й день эмбрионы фиксировали в 4 %-ном растворе параформальдегида. Для оценки ядерного материала в эмбрионах последние были окрашены раствором DAPI (1 мкг/мл) в течение 20 мин. Наличие признаков апоптоза в бластомерах эмбрионов оценивали методом TUNEL с использованием набора In Situ Cell Death Detection Kit, fluorescein («Roche Diagnostics», Швейцария) согласно инструкции компании-производителя. Микрофотографирование, подсчет числа ядер и оценку уровня апоптоза в бластоцистах осуществляли при увеличении 200x с помощью инвертированного микроскопа Axio Imager M2, оснащенный флуоресцентной приставкой, при использовании программы Zen pro (Carl Zeiss, Германия). Уровень апоптоза в эмбрионах оценивали по доле TUNEL-позитивных ядер от общего числа ядер.

Статистическую обработку полученных данных проводили методом однофакторного дисперсионного анализа при помощи программы SigmaStat. Данные выражали как средние значения \pm стандартные ошибки. Достоверность различия сравниваемых средних значений оценивали с использованием критерия Тьюки.

Морфологический анализ не обнаружил влияния пролактина на завершение ядерного созревания. Доля созревших ооцитов как отношение числа ооцитов с полярными тельцами к исходному числу, определяемое после процедуры экстракорпорального оплодотворения в процессе освобождения яйцеклеток от кумулюсных клеток и сперматозоидов, была высокой (85-91 %) и существенно не различалась между контрольной и опытными группами.

Доля раздробившихся ооцитов, также не различалась между экспериментальными группами и варьировала от 77 до 84 %. Тем не менее, обнаружено влияние ffEVs в период IVM ооцитов коров на их дальнейшее эмбриональное развитие *in vitro*. В случае созревания ОКК в контрольной среде выход бластоцист составлял $22.4 \pm 2.3\%$. Введение ffEVs в среду культивирования в физиологической концентрации (группа ffEVs 1:1) и в концентрации превышающей ее в двое (группа ffEVs 2:1) повышало данный показатель до $33.1 \pm 3.2\%$ и $36.0 \pm 2.1\%$ соответственно ($p < 0.05$). Кроме того введение ffEVs в количестве эквивалентном содержанию белка в 2 мл ФЖ (группа ffEVs 2:1) приводило к увеличению числа ядер в эмбрионах как по сравнению с внутренним контролем, так и по сравнению с более низкими концентрациями ffEVs ($P < 0.05$), а в количестве эквивалентном содержанию белка в 1 (ffEVs 1:1) и 2 мл (ffEVs 2:1) снижало уровень апоптоза ($P < 0.05$).

Таким образом ffEVs в среде созревания оказывает стимулирующее действие на компетентность ооцитов коров к последующему эмбриональному развитию. Позитивное влияние отмечается как на количественные, так и на качественные характеристики эмбрионального развития, что свидетельствует о положительном действии внеклеточных везикул на качество ооцитов, а также о возможности их использования на этапе экстракорпорального созревания для повышения эффективности технологии IVP.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (проект № 19-16-00115)

Литература

1. Lonergan P., Fair T. In vitro-produced bovine embryos: dealing with the warts // *Theriogenology*. 2008. Vol. 69. P. 17-22.
2. Stroebech L., Mazzoni G., Pedersen H.S., Freude K.K., Kadarmideen H.N., Callesen H., Hyttel P. In vitro production of bovine embryos: revisiting oocyte development and application of systems biology // *Animal Reproduction*. 2015. Vol. 12(3). P. 465-472. 1154.
3. Blanco M.R., Demyda S., Moreno Millán M., Genero E. Developmental competence of in vivo and in vitro matured oocytes: a review // *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*. 2011. Vol. 6(7). P. 155-165.
2. Buratini J., Price C.A. Follicular somatic cell factors and follicle development // *Reproduction, Fertility and Development*. 2011. Vol. 23(1). P. 32-9.
3. Hsueh A.J.W., Kawamura K., Cheng Y., Fauser B.C. Intraovarian control of early folliculogenesis // *Endocrine Reviews*. 2015. Vol. 36(1). P. 1-24.
4. Raposo G., Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends // *Journal of Cell Biology*. 2013. Vol. 200(4). P. 373-83.
5. Tesfaye D., Hailay T., Salilew-Wondim D., Hoelker M., Bitseha S., Gebremedhn S. Extracellular vesicle mediated molecular signaling in ovarian follicle: Implication for oocyte developmental competence // *Theriogenology*. 2020. Vol. 150. P. 70-74.
6. Di Pietro C., Exosome-mediated communication in the ovarian follicle // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 2016. Vol. 33(3). P. 303-311.
7. Tesfaye D., Gebremedhn S., Salilew-Wondim D., Hailay T., Hoelker M., Grosse-Brinkhaus C., Schellander K. MicroRNAs: tiny molecules with a significant role in mammalian follicular and oocyte development // *Reproduction*. 2018. Vol. 155(3). P. R121-R135.
8. Сингина Г.Н., Лебедева И.Ю., Шедова Е.Н., Тарадайник Т.Е., Митяшова О.С., Цындрина Е.В., Данч С.С. Способность ооцитов коров к эмбриональному развитию при созревании в разных системах двухфазного культивирования // *Сельскохозяйственная биология*. 2017. Том. 52. № 4. С. 772-784.

УДК 577.15.08

DOI: <http://doi.org/10.20914/2304-4691-2025-1-58-60>

«НАФТИЛЬНЫЙ КЛЮЧ» К ПРЯМОМУ ЭЛЕКТРОННОМУ КОНТАКТУ: НАПРАВЛЕННАЯ ИММОБИЛИЗАЦИЯ МАЛЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЛАККАЗ НА ЭЛЕКТРОД

К.А. Егоров, О.Н. Пономарева

ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет», Тула, Россия

Поиск устойчивых решений для энергетики стимулирует интерес к ферментам как источникам зелёной энергии, особенно при конструировании биотопливных элементов (БТЭ). Для БТЭ существует острая потребность в высокоэффективных кислородных катодах, так как медленная кинетика реакции восстановления кислорода (ОВК) является основным «узким местом», резко ограничивающим общую мощность элемента. В биологических системах эта проблема усугубляется необходимостью работы при нейтральном pH и уязвимостью биокатализаторов к побочным продуктам, таким как активные формы кислорода (АФК). Лакказы (пара-дифенол: кислород оксидоредуктазы, К.Ф.1.10.3.2) — перспективные кандидаты для биокатодов, поскольку обладают двумя важными свойствами: способностью к прямому переносу электронов (direct electron transfer, DET) [1] и возможностью восстановления молекулярного кислорода до воды, минуя образование свободных АФК,