

ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ
ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ» РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи



ДУДУН АНДРЕЙ АНДРЕЕВИЧ

**БИОСИНТЕЗ БАКТЕРИАЛЬНОГО АЛЬГИНАТА И ВЛИЯНИЕ
КОНСТРУКЦИЙ НА ЕГО ОСНОВЕ НА СОСТАВ КИШЕЧНОЙ
МИКРОБИОТЫ *IN VIVO***

1.5.6. Биотехнология

Диссертация на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:
к.б.н. Г.А. Бонарцева

Москва 2022

Оглавление

Список сокращений.....	4
Введение	5
Цель работы.....	6
Научная новизна	6
Теоретическая и практическая значимость работы.....	7
Положения, выносимые на защиту	7
Степень достоверности и апробация результатов	8
Апробация работы	8
Публикации результатов исследований	9
Личный вклад автора.....	9
Методология и методы исследования	9
Структура и объем работы	10
Глава 1. Литературный обзор	11
1.1 Биополимеры	11
1.1.1 Поли-3-оксибутират.....	12
1.1.2 Альгинат	16
1.1.3 Биосинтез альгината и поли-3-оксибутирата.....	20
1.1.4 Биодegradация альгината и поли-3-оксибутирата	22
1.1.5 Биомедицинское применение альгината и поли-3-оксибутирата	27
1.2 Биоинженерные стратегии регенеративной медицины для желудочно-кишечного тракта	30
1.2.1 Бесклеточные скаффолды	31
1.2.2 Клеточные скаффолды	32
1.2.3 Кишечные органоиды.....	33
1.3 16S Метагеномный анализ кишечной микробиоты	34
1.3.1 Классические и современные методы исследования метагеномов	36
1.3.2 Кишечная микробиота в норме и при патологиях.....	39
Глава 2. Материалы и методы исследования	43
2.1 Синтез поли-3-оксибутирата и альгината в полном факторном эксперименте и определение их физико-химических свойств	43
2.1.1 Синтез поли-3-оксибутирата и альгината при различных условиях	43
2.1.2 Выделение и очистка бактериальных поли-3-оксибутирата и альгината	46
2.1.3 Определение молекулярной массы поли-3-оксибутирата и альгината.....	47
2.1.4 ИК-спектроскопия альгинатов	47
2.1.5 Подготовка пленок из поли-3-оксибутирата	48
2.1.6 ¹ H-ЯМР анализ поли-3-оксибутирата	48
2.1.7 Термогравиметрический анализ поли-3-оксибутирата и альгината	48
2.1.8 Формирование альгината кальция	49

2.1.9	Реология альгинатного гидрогеля	49
2.1.10	Тест на водопоглощение поли-3-оксибутирата и альгинатного гидрогеля.....	49
2.1.11	Выделение и характеристика мезенхимальных стволовых клеток	50
2.1.12	Тест на цитотоксичность альгинатного гидрогеля	51
2.1.13	Статистический анализ	52
2.2	Эндопротезирование конструкций на основе поли-3-оксибутирата и альгината крысам линии Вистар в толстый кишечник.....	53
2.2.1	Инкапсуляция пробиотических бактерий в сферы из альгинатного гидрогеля	53
2.2.2	Разработка биополимерной конструкции.....	54
2.2.3	Животные в экспериментах in vivo.....	54
2.2.4	Имплантация конструкций поли-3-оксибутират-альгинат в виде заплаты в толстый кишечник крысам линии Вистар	54
2.3	16S Метагеномное профилирование	58
2.3.1	Выделение геномной ДНК.....	58
2.3.2	Подготовка 16S библиотек.....	59
2.3.3	Секвенирование 16S	59
2.3.4	Биоинформатический анализ.....	60
Глава 3.	Результаты и их обсуждение	61
3.1	Альгинат и поли-3-оксибутират	61
3.1.1	Штамм-продуцент	61
3.1.2	Синтез поли-3-оксибутирата и альгината в полном факторном эксперименте	61
3.1.3	Физико-химические характеристики поли-3-оксибутирата и альгината	66
3.1.4	Многомерный дисперсионный анализ полного факторного эксперимента.....	74
3.1.5	Реологические свойства альгинатного гидрогеля	78
3.1.6	Водопоглощение бактериальных поли-3-оксибутирата и альгинатного гидрогеля.....	81
3.1.7	Тест на цитотоксичность альгинатного гидрогеля	82
3.2	Кишечная микробиота	83
3.2.1	α -разнообразие.....	85
3.2.2	β -разнообразие	86
3.2.3	Качественный и количественный анализ бактериальных таксономических групп.....	87
3.2.4	Статистический анализ кишечной микробиоты	92
Заключение		97
Выводы		99
Благодарности		100
Список литературы		101

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БФС – буфер фосфатно-солевой

МСК – мезенхимальные стволовые клетки

ПОБ – поли-3-оксибутират

ПОА – полиоксиалканоаты

ТГА – термогравиметрический анализ

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

М – маннуриновая кислота

G – гулуриновая кислота

ММ – молекулярная масса

ССК – стромальные стволовые клетки

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ПСК – плюрипотентные стволовые клетки

КСК – клетки кишечных крипт

ЭСК – эмбриональные стволовые клетки

NGS – технологии секвенирования следующего поколения

ОТЕ – операционная таксономическая единица

НК – негативный контроль

РДПР – раствор для промывания и разведения

АТФ – аденозин-5'-трифосфат

АДФ – аденозин-5'-дифосфат

ЦТК – цикл трикарбоновых кислот

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время использование эндопротезов и скаффолдов на основе биополимерных конструкций получило широкое применение в области тканевой инженерии [1, 2]. Физико-химические и биологические свойства биополимерных материалов позволяют использовать медицинские изделия на их основе для различных тканей в широком диапазоне: для мягкой соединительной, костной, мышечной, а в перспективе и для нервной ткани [3–5]. Основные требования, которым должны удовлетворять биополимеры для их непосредственного использования в качестве имплантов или скаффолдов — это их способность к биосовместимости и биодegradации [6]. Одними из таких биополимеров являются поли-3-оксибутират (ПОБ), относящийся к семейству полиоксиканоатов (ПОА) и гидрофильный экзополисахарид альгинат [7, 8]. Интересной особенностью получения этих двух биополимеров является их одновременный биосинтез бактериями рода *Azotobacter sp.* Кроме того, за счет варьирования условий культивирования бактерий *Azotobacter sp.* можно получать ПОБ и альгинат с различными физико-химическими свойствами [9]. Бактериальные ПОБ и альгинат с разными характеристиками и их композиты могут быть применимы в качестве скаффолдов для заживления тканей и органов, что имеет большой потенциал для их биомедицинского применения [10–12].

Одним из важных, активно разрабатываемым применением различных биополимерных конструкций является регенерация толстого кишечника [13, 14]. Механические повреждения, воспалительные заболевания кишечника, множественный сепсис, болезнь Крона, язвенный колит, рак толстого кишечника и многие другие заболевания требуют современных методов лечения [15]. Основная особенность кишечника — это плотное симбиотическое взаимоотношение его со сложным бактериальным сообществом. Любой фактор или воздействие на желудочно-кишечный тракт существенно изменяет состав микробиоты кишечника [16]. В настоящее время кишечную микробиоту можно представить в качестве отдельного органа, который принимает непосредственное участие в поддержании здоровья человека [17, 18]. Использование

биополимерных конструкций в качестве кишечной заплаты позволит не только осуществлять заживление кишечной ткани, но и влиять на микробиоту в ходе этого процесса. Таким образом, состав микробиоты может играть роль маркера при реакции организма на имплантацию полимерного изделия. Также мы можем оценить возможную роль отдельных таксономических бактериальных групп в заживлении поврежденной ткани кишечника.

Целью работы является биосинтез биополимеров (ПОБ и альгината), изучение их физико-химических свойств, разработка биополимерной конструкции на их основе и изучение влияния этой конструкции на состав кишечной микробиоты. Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1) Изучить синтез ПОБ и альгината бактериальным штаммом *Azotobacter vinelandii* 12.

2) Исследовать физико-химические свойства полученных биополимеров.

3) Разработать биополимерную конструкцию в виде кишечной заплаты на основе ПОБ и альгината.

4) Разработать методику имплантации биополимерной конструкции в толстый кишечник крысам линии Wistar.

5) Провести анализ качественного и количественного состава кишечной микробиоты методом 16S метагеномного профилирования у крыс после хирургического вмешательства.

Научная новизна.

В работе впервые изучено влияние различных факторов на конкурентный синтез двух биополимеров бактериальным штаммом *Azotobacter vinelandii* 12, а именно: гидрофобного ПОБ и гидрофильного альгината.

Продемонстрировано различие физико-химических свойств полученных полимеров в процессе их биосинтеза при использовании метода математического планирования - полного факторного эксперимента (ПФЭ 2³).

В работе впервые продемонстрировано влияние имплантированных биополимерных конструкций на основе альгината и ПОБ на состав кишечной микробиоты крыс линии Wistar.

Впервые прослежена связь увеличения или наоборот угнетения отдельных таксономических бактериальных групп после серий хирургических вмешательств по имплантации биополимерных конструкций в толстый кишечник крыс линии Wistar.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Путем варьирования условий культивирования *Azotobacter vinelandii* 12 достигнута высокая эффективность биосинтеза свободных и капсулярных альгинатов. Определены условия избирательного биосинтеза только капсулярного альгината при полном подавлении биосинтеза свободного альгината и ПОБ. Продемонстрировано влияние биополимерных конструкций на основе ПОБ и альгинатов, на состав кишечной микробиоты, что может дать ответ на вопрос - какие именно отдельные таксономические группы могут участвовать в роли «маркеров» для диагностики воспалительных эффектов толстого кишечника.

Положения, выносимые на защиту.

1. Оптимизирован процесс синтеза бактериальных альгинатов и поли-3-оксибутирата и определены их физико-химические свойства.
2. При определенном составе среды и условиях культивирования достигнут избирательный биосинтез только одного бактериального капсулярного альгината при полном подавлении биосинтеза свободного альгината и ПОБ.
3. Вязкоупругие и водопоглотительные свойства альгинатов имеют прямую зависимость от их молекулярной массы (ММ) и мономерного состава (М/G) в молекулярной цепи.
4. Уровень α -разнообразия кишечной микробиоты не снижается у разных групп крыс при имплантации различных вариантов ПОБ-альгинат

конструкций в сравнении с контрольной группой за исключением группы крыс с имплантированной ПОБ-альгинат конструкцией с инкапсулированными лактобактериями в альгинатном гидрогеле.

5. После серии операций по имплантации различных разработанных конструкций ПОБ-альгинат в толстый кишечник крыс по качественному составу кишечной микробиоты лабораторных животных можно разделить на две группы: первая группа крыс, которым не проводили операцию или проводили, но без терапии антибиотика или включением пробиотиков в ПОБ-альгинат конструкцию и вторая группа – это крысы, которым имплантировали ПОБ-альгинат конструкцию с включением пробиотиков или с терапией антибиотиком.
6. Качественный и количественный бактериальный состав кишечной микробиоты у каждой группы после имплантации различных ПОБ-альгинат конструкций разнообразен и имеет свои особенности.

Степень достоверности и апробация результатов.

Все опыты выполнены серийно, не менее, чем в трех повторностях. Для представления результатов экспериментов была проведена статистическая обработка с использованием языка программирования R (версия 3.6.3, Lucent Technologies, Murray Hill, NJ, США, под кодовым названием «Holding the Windsock». Copyright © 2020). Использовали однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) и многомерный дисперсионный анализ (three-way ANOVA). В таблицах и на рисунках данные представлены в виде средних величин и стандартной ошибки среднего ($M \pm SD$) при уровне значимости $p < 0.05$.

Апробация работы.

Основные положения диссертационной работы доложены на международной конференции 4th International Society for Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials (ISBPPB) (Краков, 2018), на XXXI Зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (г. Москва, 2019 г.); IV Национальном Конгрессе по

Регенеративной Медицине (г. Москва, 2019 г.), на Республиканской научно-практической конференции с международным участием «Физико-химическая биология, как основа современной медицины.» (г. Минск, Беларусь, 2019 г.), на международной конференции MicrobiotaMi (г. Милан, Италия, 2020 г.) и на 3-ем Российском Микробиологическом Конгрессе (г. Псков, 2021 г.).

Публикации результатов исследований.

По результатам было опубликовано 24 печатные работы: из них 6 статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых международными базами данных (Web of Science, Scopus) и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В.Ломоносова.

Личный вклад автора.

Представленные в работе экспериментальные данные получены либо самим автором, либо при его непосредственном участии на всех этапах исследования, в том числе: планирование и проведение экспериментов, обработка и оформление данных, а также их интерпретация. Методики экспериментов, которые были использованы, и на основе их проведенные расчеты корректны. Выводы, представленные в работе, полностью подтверждаются поставленными экспериментами и не вызывают сомнений.

Методология и методы исследования.

Бактериальный синтез полимеров – альгинатов и поли-3-оксибутирата проводился бактериальным штаммом *Azotobacter vinelandii* 12. Было изучено влияние условия аэрации и состава среды методом Полного факторного эксперимента на биосинтез полимеров и на их характеристики, такие как мономерный состав, молекулярная масса (ММ) и степень ацетилирования у альгинатов. Были изучены физико-химические свойства полученных биополимеров методом ИК-спектроскопии, реометрии, термогравиметрического анализа и теста на водопоглощение. Проведена оценка цитотоксичности альгинатов кальция *in vitro*. Разработаны биополимерные конструкции на основе альгината и поли-3-оксибутирата, как с включением пробиотических бактерий в

альгинатный гель, так и без. Исследования *in vivo* конструкций проводили на крысах линии Wistar на модель кишечного дефекта. Через неделю были проведены вскрытия животных с целью отбора фекальных проб для 16S метагеномного анализа. После секвенирования образцов, данные были анализированы в ряде программных обеспечений, таких как bbmerge, MOTHUR и QIIME2. Визуализация и статистический анализ был выполнен в среде R.

Структура и объем работы

Диссертация изложена на 136 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, заключение, выводы, список литературы, содержащий ссылки на 310 источников. Работа иллюстрирована 32 рисунками, содержит 3 таблицы.

ЧАСТЬ 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Биополимеры

С каждым годом использование биополимеров и материалов на их основе имеют все более возрастающее значение в мире [19]. Биосовместимые и биodeградируемые полимеры природного происхождения позволили продвинуться в создании материалов для биомедицины с более подходящими характеристиками в сравнении с материалами синтетического происхождения [20]. За счет материалов на биологической основе в последнее время было предпринято множество различных разработок в области создания искусственных органов, медицинских устройств, структур и носителей для тканевой инженерии [21].

Биополимеры, в первую очередь, это класс веществ, которые синтезируются живыми организмами [22, 23], что делает их более доступными для непосредственного использования в области медицины и биотехнологий. Их способность к биосовместимости дает возможность к использованию в медицине в качестве имплантируемых изделий с целью регенерации поврежденной ткани или целого органа [24]. Все материалы на основе биополимеров часто называют заменителями синтетических, которые не поддаются биологическому разложению и оказывают неблагоприятное влияние на окружающую среду и живые организмы в целом [25]. Кроме того, полимеры природного происхождения в процессе биоразложения распадаются до промежуточных соединений, а те впоследствии – до простых химических соединений, не несут токсического эффекта и легко абсорбируются организмом человека [26].

Помимо этого, ученые всего мира за счет продвинутых технологий открывают все новые возможности для применения материалов природного происхождения [27]. Так в недавних работах было продемонстрировано использование биополимеров в качестве антиоксидантов и противомикробных препаратов [28, 29]. Таким образом многочисленные исследования биополимеров открывают новые границы и возможности для потенциального их применения в области биомедицины.

1.1.1. Поли-3-оксибутират

Поли-3-оксибутират (ПОБ) — это биополимер семейства полиоксипропионатов (ПОА), синтез которого происходит у многих бактерий, относящихся к разным таксономическим группам. Также к синтезу ПОБ способны и несколько экстремофильных архей [30]. К одним из ярких представителей синтеза биополимера относятся бактерии рода *Azotobacter sp.* [31]. Способность аккумулировать ПОБ внутриклеточно дает возможность бактериям рода *Azotobacter sp.* выживать в неблагоприятных условиях внешней среды [32]. ПОБ для этих бактерий является запасным веществом и служит в качестве резервного источника энергии и углерода.

Впервые наличие суданофильных и липидоподобных включений [33], которые хорошо растворялись в хлороформе были отмечены в бактериях *Azotobacter chroococcum* в начале прошлого столетия [34]. Позднее химическая структура похожих включений в бактериях *Bacillus megaterium* была идентифицирована как поли-3-оксибутират (ПОБ) [35]. К концу 50-х годов прошлого века уже было достаточно данных для того, чтобы заключить, что ПОБ играет роль внутриклеточного резерва углерода и энергии у бактерий [36, 37]. В обзорной статье от 1973 года было продемонстрировано первое широкое освещение ПОБ в качестве запасающего биополимера у бактерий, аналогично крахмалу и гликогену у растений и животных [38]. Следующим этапом развития исследования ПОБ и других полимеров семейства ПОА включало геномное клонирование и характеризацию ферментов, участвующих в биосинтезе полиэфиров [39]. Революционные методы, появившиеся в конце 70х годов в молекулярной биологии, позволили расшифровать генетическую информацию генов, ответственных за биосинтез ПОБ. Уже в конце 80х годов были проведены первые работы по генетической трансформации бактерий. Так гены биосинтеза ПОБ бактерии *Ralstonia eutropha* были клонированы в *Escherichia coli* [40]. Детальные исследования генов, которые кодируют ферменты, участвующие в биосинтезе ПОБ у бактерий *Ralstonia eutropha* показали, что только три фермента участвуют в биосинтезе ПОБ. Фермент, осуществляющий, полимеризацию цепи

ПОБ был идентифицирован как ключевой и назван ПОБ-синтазой [41]. Так как на сегодняшний день ПОБ является наиболее хорошо изученным биополимером среди других ПОА, то и множество работ посвящены его усиленному синтезу и факторам, которые могут непосредственно влиять на этот биосинтез. Данные исследования по биосинтезу на сегодняшний день демонстрируют, что ПОБ является перспективным биоматериалом для многих направлений в области биотехнологий и биомедицины.

По своим физико-химическим характеристикам ПОБ является полукристаллическим гомополимером, мономером которого является 3-гидроксимасляная кислота (Рис. 1) [42].

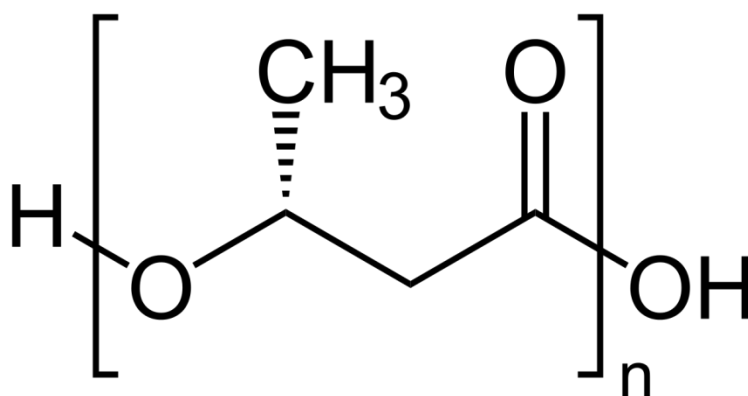


Рисунок 1. Структурная формула ПОБ [28]

Сам полимер, который относится к классу полиэфиров, может представлять из себя твердое вещество, тем самым это дает возможность использования ПОБ в качестве подложек или трехмерных конструкций для биомедицины и тканевой инженерии [43]. Продуценты *Azotobacter sp.* способны аккумулировать ПОБ до 80% от сухого веса в виде жировых запасяющих гранул [44]. За счет регулирования условий культивирования бактерий можно синтезировать ПОБ с различной степенью кристалличности и молекулярной массой полимера, это позволит использовать ПОБ во многих отраслях от биопластиков в экологии [45] до пористых биоактивных скаффолдов для регенерации костной ткани [46].

Мохан с коллегами синтезировали нанокompозиты на основе ПОБ [47]. Данные материалы демонстрировали неиммуногенность, пористость, а главное

высокую биосовместимость. Наноконпозиты на основе ПОб могут найти эффективное применение в инженерии костной ткани [47]. Несмотря на большое количество исследований по применению материалов на основе ПОб в инженерии костной ткани, сам потенциал использования данного полимера не ограничивается только регенерацией костной ткани. Так во многих работах было показано успешное использование ПОб по замещению хрящевой, нервной и кожной ткани [48]. Все эти работы показывают, что биополимер ПОб обладает большим потенциалом в разработке различных тканеинженерных конструкций для разных тканей, что имеет большую перспективу для использования ПОб в тканевой инженерии.

В настоящее время использование полезных ископаемых материалов представляет собой серьезную угрозу для окружающей среды. Поэтому, в последнее время, идет стремительный рост интереса к «зеленым» альтернативным или возобновляемым источникам с целью разработки зеленых пластиков, используемых прежде всего в качестве упаковочных материалов, а также в сельском хозяйстве для инкапсулирования семян и минеральных удобрений [49]. Так одним из самых многообещающих возобновляемых полимеров является ПОб, который демонстрирует свойства близкие к химическим термопластикам. За счет своих механических свойств, напоминающих свойства таких термопластов, как полиэтилен или полипропилен, ПОб рассматривается в качестве нового кандидата для разработки на его основе экологически чистых и возобновляемых пластиков [50]. Способность ПОб к биоразложению позволяет избежать отрицательного влияния на окружающую среду, что является определяющим фактором в разработке упаковочных материалов в 21м веке. Для преодоления проблем, связанных с губительным эффектом на окружающую среду синтетических полимеров, и улучшения термомеханических свойств материалов, множество исследователей по всему миру разрабатывают возможность биосинтеза различных сополимеров ПОб или создают полимерные композиционные материалы на основе ПОб с добавлением различных пластификаторов с целью улучшения физико-химических и

вязкоупругих свойств: ММ, температура плавления, температура стеклования, упругость биоматериала и т.д. Так, к примеру, в одной из работ был синтезирован сополимер ПОб с 3-гидроксивалератом бактерией *Cupriavidus necator* [51]. В данном исследовании субстратом для роста бактерий использованы глицерин-содержащие отходы. Результаты показали, что полученный сополимер обладал значительно лучшими механическими и физико-химическими свойствами, чем чистый полимер ПОб [51]. Другие работы по созданию упаковочных материалов на основе ПОб посвящены разработке материалов с добавлением различных пластификаторов, способных улучшить термальные и механические свойства ПОб. Манджеоном и его коллегами был изготовлен композиционный материал на основе ПОб с добавлением терпенов: линалоол, гераниол и геранилацетат [52]. Изготовленный материал обладал всеми качествами, которые свойственны используемым химическим пластикам. Более того, результаты дифференциальной сканирующей калориметрии показали снижение температуры стеклования в сравнении с чистым ПОб, что свидетельствует о пластифицирующем эффекте терпенов. Также результаты по гибкости и упругости полимеров ПОб с добавлением различных терпенов показали, что ПОб с 20% добавлением геранилацетата демонстрировал растяжимость на 650% выше в сравнении с чистым ПОб [52].

Описанные в вышеприведенных работах результаты ярко демонстрируют, что ПОб как материал для биомедицины, так и как материал для экологически чистых упаковочных материалов обладает большим потенциалом. Таким образом, в перспективе биоматериалы на основе ПОб вполне могут потеснить рынок синтетических полимеров во всех областях, что позволит уйти от сырьевой модели развития и развернуть глобальный тренд в сторону чистой и возобновляемой энергетики.

1.1.2. Альгинат

Альгинат относится к неразветвленным полисахаридам, состоящий из (1-4)- β -D-Маннуроновой кислоты (M) и его C5-эпимера α -L-Гулуруновой кислоты (G) (Рис. 2) [53].

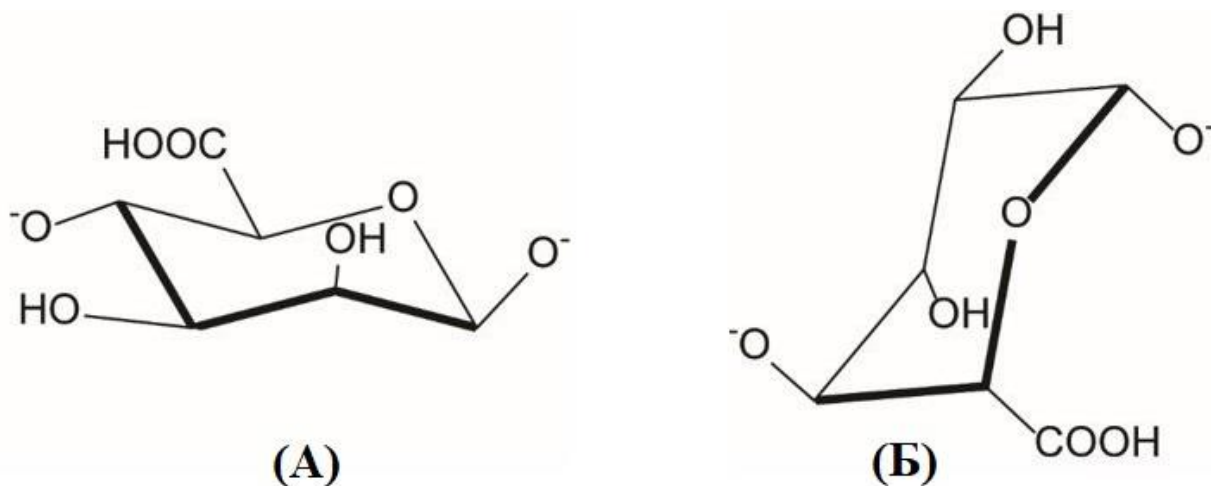


Рисунок 2. Структурная формула мономеров альгината: (А) — D— Маннуроновая кислота (M) и (Б) — L—Гулуруновая кислота (G) [53]

Отличительной чертой полимера является способность к ионотропному взаимодействию гулуруновых остатков с двухвалентными катионами кальция, за счет чего образуются гидрогели [54]. Данное гелеобразование происходит когда катионы кальция (Ca^{2+}) замещают сопряженные им ионы натрия (Na^+), что приводит к образованию межцепочечных альгинатных комплексов при участии гулуруонатных фрагментов в цепи, с которыми и происходит ионная связь. При достаточно высокой концентрации альгината в растворе и связывающих его ионов возникает трехмерная сеть в виде геля. Зоны связывания в таком геле между G-блоками и двухвалентными катионами кальция называют «egg-box» моделью (Рис.3) [55].

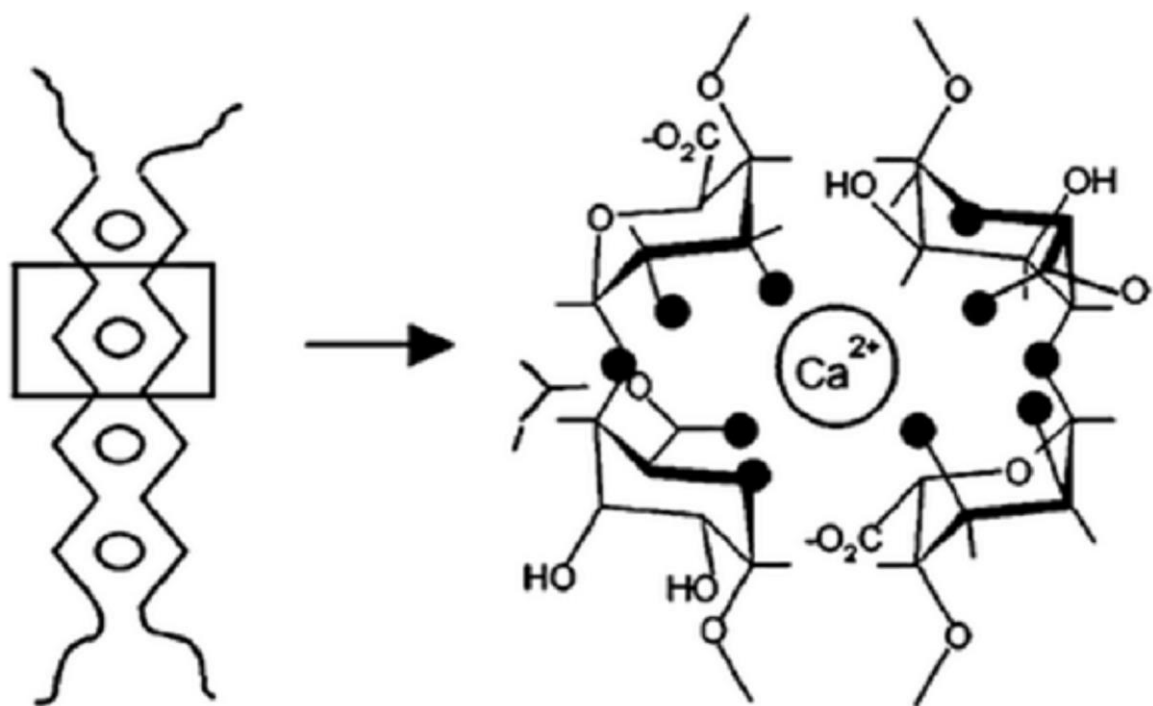


Рисунок 3. Egg-box модель гелеобразования альгината с ионами кальция [55]

Способность к гелеобразованию альгината дает преимущество колониям бактерий рода *Azotobacter sp.* выживать в неблагоприятных условиях за счет образования цист [56]. Бактерии синтезируют альгинат и выделяют его во внешнюю среду, тем самым препятствуя испарению и сохраняя колонии бактериальных клеток от высыхания [57]. Помимо поддержания целостности бактерий от высыхания, альгинат не дает проникать чрезмерному количеству молекулярного кислорода в бактериальные клетки при повышенных условиях аэрации [58]. Бактерии *Azotobacter sp.* являются строгими аэробами и diaзотрофами содержащими нитрогеназный комплекс, закодированными в их геноме [59, 60]. Во многих работах показано, что нитрогеназа чувствительна к молекулярному кислороду и подвергается окислению при непосредственном контакте с ним [61]. На данный момент известно несколько механизмов защиты от избыточного количества молекулярного кислорода бактериями рода *Azotobacter sp.* [62]. Одним из таких механизмов является высокомолекулярный альгинат, синтезируемый бактериями, который окутывает бактериальные клетки и тем самым выполняет роль защитного барьера от проникновения молекулярного кислорода для предотвращения окисления нитрогеназного комплекса [61].

В настоящий время в пищевой и фармацевтической промышленности получают альгинат из бурых водорослей, но водорослевый полимер заметно отличается по многим физико-химическим свойствам от бактериального биополимера, продуцируемого микробиологическим путем [63]. Бактериальный альгинат имеет определенные преимущества в сравнении с водорослевым: во-первых, альгинат, синтезированный бактериями родов *Azotobacter* и *Pseudomonas sp.* имеют ацетильные группы на маннуроновых остатках в положении C₂ и C₃ гексозного кольца [64], такое ацетилирование напрямую влияет на вязкость альгината, взаимодействие с ионами кальция и на активность маннуронат эпимираз и лиаз [65,66]. Во-вторых, культивирование бактерий при стандартных условиях ферментации позволяет регулировать процесс синтеза альгината и получать его в широком спектре физико-химических свойств, таких как молекулярная масса (ММ) соотношение маннуроновых к гулууроновым кислотам в альгинатной цепи (М/Г) и степень ацетилирования альгината [67]. Таким образом можно видеть, что синтез альгината бактериями обладает более тонкой регуляцией физико-химических и механических свойств биополимера, такими как вязкость, ММ, М/Г состав и уровень ацетилирования в сравнении с синтезом водорослевого альгината в природных нерегулированных условиях биосинтеза. Необходимо отметить, что многие бактерии рода *Pseudomonas sp.* также способные к синтезу альгинатов, являются патогенами, что накладывает многие ограничения по получению альгината в заводских условиях ферментации, тем самым выделяя бактерии рода *Azotobacter sp.* на роль наиболее подходящих кандидатов-продуцентов для промышленного биосинтеза альгината. Все вышеприведенные данные показывают необходимость исследований по биосинтезу бактериальных альгинатов и их физико-химических и биологических свойств.

В настоящий момент альгинат широко используется в пищевой, фармацевтической, биомедицинской промышленности [68]. В первую очередь это связано с его свойствами, такими как биосовместимость, биоразлагаемость, нетоксичность и неиммуногенность [69]. Например, альгинатные гидрогели с

Ca^{2+} , за счет своих гидрофильных и абсорбирующих свойств стимулируют заживление поверхностных ран. Альгинатный гидрогель экранирует поврежденную область от проникновения патогенных бактерий, за счет своей полисахаридной структуры, биополимер имитирует человеческий межклеточный матрикс, благодаря чему идет активный процесс регенерации [70]. В настоящее время среди медицинских изделий на основе альгината самое широкое применение получили перевязочные материалы. Помимо кальция (Ca^{2+}), альгинаты могут образовывать гидрогели при помощи ионотропного воздействия с различными бивалентными (Ba^{2+} , Cu^{2+} , Sr^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+}) и мультивалентными ионами (Al^{3+} , Fe^{3+} и т.д.), поэтому помимо заживляющих повязок альгинаты могут найти широкое применение в области тканевой инженерии и в создании различных лекарственных форм широкого спектра действия. Именно гелеобразование при помощи механизма ионотропного взаимодействия с ионами металлов делает альгинат привлекательным для широкого спектра применения в биомедицине. В настоящее время гелирование, индуцированное катионами Ca^{2+} наиболее хорошо изучено в сравнении с другими ионами. Однако, гелирование альгината при воздействии других положительно заряженных ионов также активно исследуется в последние два десятилетия. На основе этих работ было продемонстрировано, что механизм гелеобразования альгината с другими катионами отличается от классической «egg-box» модели [68]. Так было показано, что образованные гидрогели альгината при помощи ионов меди (Cu^{2+}) показывали похожую «egg-box» модель как и у альгинатов кальция, но при этом ионы меди в отличие от ионов кальция не отдавали предпочтения гулурановым кислотам при ионотропном связывании с их карбоксилатными группами, а связывались как с карбоксилатными группами маннурановых, так и гулурановых кислот в равной степени [71]. Равная селективность как к М, так и к G мономерам может объясняться тем, что катионы Cu^{2+} проявляют в 10 раз более высокую аффиность к альгинатным цепям, чем ионы Ca^{2+} [68]. Таким образом, альгинатные полиэлектролитные комплексы на основе ионов Cu^{2+} с повышенным уровнем сродства к альгинату в сравнении с

катионами Ca^{2+} , могут демонстрировать другие физико-химические и механические свойства гидрогеля. Так Хауг и Смесгорд показали, что за счет повышенной аффинности Cu^{2+} к альгинату можно создавать плотные альгинатные гидрогели с дальнейшим предотвращением диффузии катионов через гель [72]. Такие плотные гидрогели имеют большой потенциал в разработке различных биомедицинских изделий. Так уже были опубликованы работы, где показано, что гидрогели на основе ионов Cu^{2+} могут быть применены в качестве сенсоров при иммуноанализе [73], в качестве антимикробных препаратов или даже могут найти свое использование в инженерии хрящевой ткани [74]. Все вышесказанное показывает, что не только физико-химические свойства альгинатов являются определяющим фактором в разработке разных гидрогелей для биомедицины, но также и само создание этих гидрогелей при взаимодействии разных катионов может сильно влиять на их механику, что еще больше расширяет диапазон применения альгината в медицине.

1.1.3. Биосинтез альгината и поли-3-оксибутирата

Метаболические пути синтеза альгината и ПОБ в бактериях *Azotobacter sp.* тесно переплетены друг с другом (Рис. 4) [75].

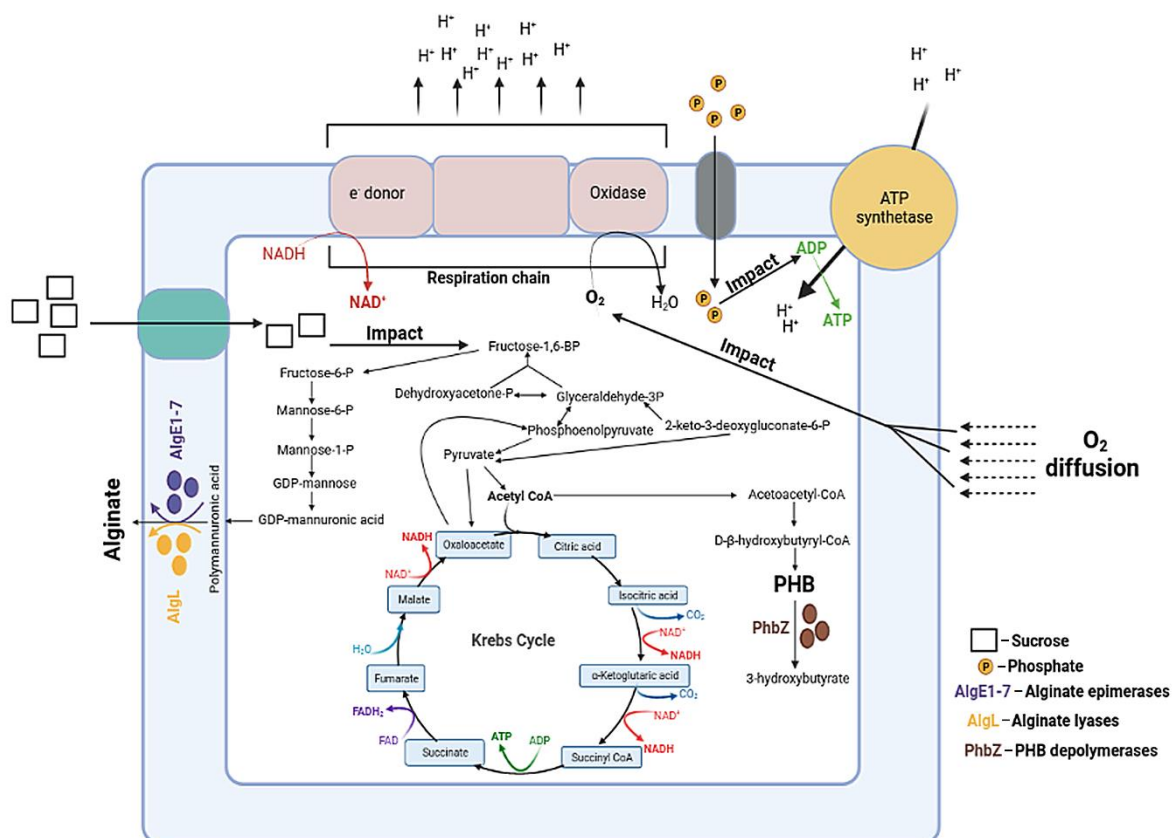


Рисунок 4. Метаболические пути синтеза альгината и ПОБ

Биосинтез альгинатов у бактерий регулируется сложной сетью ферментов, которые закодированы как минимум 24 генами [76]. Основной кластер генов, ответственных за трансляцию белков, участвующих в биосинтезе альгината, располагается под *alg* опероном [77]. Метаболический путь берет начало от дегидрогеназы (*algD*), которая катализирует реакцию конвертации субстрата ГДФ-маннозы в ГДФ-маннуоновую кислоту. На следующем этапе, а именно полимеризации цепи, участвует полимераза *alg8*, наращивающая полиманнуоновые блоки [75, 78]. В процессе полимеризации в периплазматической области происходят различные модификации маннуоновых остатков. Одна из модификаций выполняется ацетилазным комплексом, состоящим из белков *AlgI, AlgV, AlgF* [79, 80]. За другую важную модификацию, а именно: создание плотных гидрогелей из альгината, отвечают C-5 эпимеразы (*algG*), которые преобразуют маннуоновые мономеры в гулуоновые [81]. Остальные ферменты, принимающие участие в общем метаболизме альгината,

играют свою определенную роль: одни ответственны за регуляцию экспрессии генов, такие как регуляторная система *GacS/GacA* и негативный регуляторный кластер генов *tucABCD* или же ферменты, которые определяют физико-химические свойства синтезируемых альгинатов, важнейшими из которых являются альгинат-лиазы (*algE1-7*), контролирующие молекулярную массу полимера и M/G состав [82].

Синтез ПОБ состоит из трех этапов и начинается с ацетил-СоА [83]. Все три этапа синтеза полимера контролируются *phbCAB* опероном, включающим в себя три гена: *phbA*, *phbB* и *phbC*, которые кодируют β-кетотиолазу, ацетоацетил-СоА редуктазу и ПОБ синтазу, соответственно [75, 84]. На первом этапе синтеза ПОБ происходит конденсация двух молекул ацетил-СоА в ацетоацетил-СоА за счет β-кетотиолазы фермента (*phbA*). После идет реакция восстановления ацетоацетил-СоА до 3-гидроксибутирил-СоА при помощи ацетоацетил-СоА редуктазы (*phbB*). Конечная стадия характеризуется полимеризацией цепи гомополимера ферментом ПОБ синтазой (*phbC*). Данный фермент использует тиоэфиры в качестве субстратов, благодаря чему катализирует реакцию образования эфирных связей между мономерами [75].

Синтез обоих полимеров у бактерий *Azotobacter sp.* сильно зависит от условий культивирования и от выбранного штамма в качестве продуцента. В наших прошлых исследованиях бактериальный штамм *Azotobacter vinelandii* 12 показывал большую способность к синтезу альгината нежели ПОБ [44]. Для нахождения взаимосвязей между фактором культивирования или их взаимодействиями на синтез того или другого полимера, применяется метод факторного анализа [85]. В данном исследовании поставлена задача нахождения связей между факторами кислорода, сахарозы, фосфатов и синтезом альгината и ПОБ штаммом *Azotobacter vinelandii* 12.

1.1.4. Биодеградация альгината и поли-3-оксибутирата

Особым свойством ПОБ и альгината, необходимым для их использования в медицине, является их способность к биодеградации, что может быть как

выгодным, так и неблагоприятным фактором в зависимости от конкретной области их применения. Например, быстрая деградация альгинатного гидрогеля будет привлекательным свойством для применения в качестве системы доставки лекарств (клеток), тогда как быстрая деградация гидрогеля создает проблему в тех случаях, когда требуется механическая прочность в течение длительного периода времени [86]. Известно, что альгинатные гидрогели со временем разлагаются в физиологических условиях и, следовательно, имеют ограниченную долговременную физиологическую стабильность. Сама деградация альгинатных гелей происходит по причине диффузии двухвалентных катионов, которые играют роль сшивающих агентов в альгинатных цепях или происходит их замещение одновалентными катионами такими как калий и натрий (Ka^+ , Na^+) [87]. Также может происходить хелатирование двухвалентных катионов ионами фосфата, которые всегда присутствуют в средах для культивирования клеток и в среде *in vivo* [88]. Ранее в исследовании Джахроми и его коллег были показаны изменения механических свойств альгинатных гидрогелей в условиях культивирования стромальных стволовых клеток (ССК) [89]. В этой работе было показано, что деградация гидрогеля была наибольшей в течение первых 7 дней в условиях культивирования ССК. В этот же период также был обнаружен резкий выход ионов кальция из гидрогеля в окружающую среду. При сравнении скорости разложения с другими подобными биополимерными гидрогелями (в данном случае желатиновой камедью и низкометоксилированным пектином) альгинатные гели продемонстрировали наиболее сильное снижение механических свойств [89]. Биодеградация самих альгинатных цепей при помощи ферментов альгинат-лиаз в организме человека не происходит по причине их отсутствия, но в процесс биодеградации альгината за счет неспецифического связывания могут включаться ферменты, ответственные за гидролиз гликозидных связей, такие как гликозил-гидролазы [90]. ЖКТ человека располагает самым широким арсеналом различных гидролаз, такими как амилаза, мальтаза, сахараза, трехалаза и т.д. Кроме того, кишечная микробиота человека имеет в наличии бактерии, специализирующиеся на разложении полисахаридов в самом широком диапазоне, в том числе и альгината

[91]. Так известно, что множество представителей рода *Bacteroides sp.* кишечной микробиоты имеют специфические к альгинату альгинат-лиазы [92, 93]. Таким образом, альгинат является не только биосовместимым полимером для человека, но и биodeградируемым материалом, что соответствует требованиям для применения альгината в качестве лекарственных средств или скаффолдов биомедицинского назначения.

ПОБ, синтезированный микробиологическим способом, имеет способность к биodeградации в различных условиях. Это означает, что ПОБ с высокой молекулярной массой может быть полностью разложен на воду и углекислый газ как клетками микроорганизмов, присутствующих практически повсеместно в окружающей среде [94], так и под влиянием деятельности живых многоклеточных организмов. Данный аспект является достаточно интересным и тем самым ПОБ в качестве полимера для медицины привлекает все большее внимание с каждым годом. Сам процесс биodeградации ПОБ происходит за счет специфичных ферментов ПОБ-деполимераз, так и неспецифичных эстераз. При этом, процесс биodeградации зависит как от множества параметров окружающей среды (температуры, влажности, pH и т.д.), так и свойств самого полимера (состава цепи, кристалличности, ММ, и т.д.). В окружающей среде биodeградацию ПОБ можно наблюдать в почве, в морской и пресной воде [95]. Детальная работа по скорости и поведению биodeградации ПОБ в почве отражена в работе Мергаерт и его коллег [96]. Так была показана сильная зависимость деградации ПОБ от температуры: 0.05% потери массы в день при 15 °С, 0.12% потери массы в день при 28 °С и 0.45% потери массы в день при 40 °С. Стоит заметить, что в последнем случае сильное увеличение потери массы ПОБ связано, в частности, с повышенной активностью грибов при температуре 40 °С [96]. Также доказано, что ПОБ является одним из немногих пластиков, биоразлагаемых в морской воде. В одной из работ, где была смоделирована среда морской воды при 25 °С, общая потеря массы на 7% была обнаружена через год при использовании пленок толщиной 0.32 мм [97]. Стоит заметить, что изменения молекулярной массы ПОБ в данном исследовании не было обнаружено. В других литературных источниках мы можем наблюдать большой

разброс скорости деградации ПОб в зависимости от температуры, толщины пленок и т.д. Так в работе Воловой общая потеря массы полимерных пленок толщиной 0.1 мм в морской воде составило 42% или 38% гранул ПОб толщиной 5 мм соответственно [98]. При этом потеря массы ПОб была измерена всего через 160 дней при температуре в 29 °С. В другом исследовании результаты были еще более ярко выражены. Так Судзи с соавторами зафиксировали потерю массы пленок ПОб в морской воде на 60% уже через 35 дней [99]. Однако, что интересно, все эти результаты объединяет то, что молекулярная масса ПОб не изменялась или изменялась лишь незначительно. Таким образом, можно предположить, что деградация ПОб в морской воде не зависит от молекулярной массы полимера и является равномерным процессом. Биodeградация ПОб в пресной воде незначительно различается от биodeградации в морской [95]. Багери с коллегами продемонстрировал потерю массы ПОб на 8,5% через год в моделируемых условиях, аналогичных исследованию в морской воде [97]. Мергаерт подтверждает биоразлагаемость ПОб в пресной воде, но общая потеря массы ПОб в 7% была отмечена уже через 180 дней и 35% через 358 дней [100].

Если рассматривать биodeградацию ПОб чисто с биохимической точки зрения, то процесс разложения полимера заключается в первичном поверхностном ферментативном гидролизе до мономеров с последующим их включением в метаболизм. Основным ферментом класса гидролаз, катализирующим распад полимерных цепей ПОб до хиральных мономеров D-3 оксимасляных кислот, является ПОб-деполимераза [101]. Сам фермент экспрессируется у обширного количества аэробных и анаэробных бактерий, таких как *Pseudomonas lemoigne*, *Comamonas sp.*, *Acidovorax faecalis*, *Aspergillus fumigatus*, *Variovorax paradoxus*, *Alcaligenes faecalis*, *Illyobacter delafieldi*, *Pseudomonas stutzeri* и т.д. [102]. Таким образом, ПОб-деполимеразы представлены в природе обширным количеством ортологов, молекулярные массы которых могут варьироваться от 37 до 60 кДа. Сам белок обычно состоит из двух доменов, один из которых С-концевой домен, который иммобилизуется на поверхности ПОб, и N-концевой домен, выполняющий катализирующую функцию расщепления полимерных цепей [103].

В многих ранее проведенных работах было показано, что скорость деградации ПОб *in vivo* значительно превышало скорость гидролиза ПОб *in vitro* условиях [104]. Другими словами, можно заключить, что в организме млекопитающих подобно, как и в бактериальных культурах, происходит ферментативный процесс расщепления полимерных цепей ПОб. Но также можно сказать, что в окружении мягких тканей, куда может быть имплантирован материал на основе ПОб нет специфичных деполимераз, которые могли бы осуществлять процесс разложения полимера. В данном случае процесс биodeградации материала в условиях *in vivo* выполняют неспецифичные ферменты-эстеразы, отвечающие за катализ эфирных связей. Многие работы были посвящены биodeградации ПОб в присутствии липазы, так как данный фермент синтезируется во всех организмах и участвует в катаболизме триглицеридов [105]. Так было показано, что биodeградация ПОб в БФС растворе и в присутствии панкреатической липазы не приводило к какому-либо значительному снижению молекулярной массы полимерных пленок и составило всего 5% по истечении всего эксперимента (50 дней) [106]. Однако, в этом же исследовании было продемонстрировано значительное снижение молекулярной массы и массы самих пленок при их имплантации *in vivo* [106]. Такие значительные различия между экспериментами *in vitro* и *in vivo* авторы объясняют несколькими причинами. Во-первых, из-за высокой молекулярной массы пленок ПОб и небольшой площади поверхности самих пленок нарушается контакт молекул воды с полимером и тем самым ограничивается как неферментативный гидролиз, так и ферментативный при участии липазы в экспериментах *in vitro*. При достижении же критической молекулярной массы на поверхности пленок снимаются ограничения по ферментативному расщеплению, что со временем приводит к резкой потере массы полимера. В данном случае это происходило при имплантации ПОб *in vivo*, когда после 90 дней молекулярная масса ПОб снизилась всего на 25%, а в последующие 90 дней полимер полностью разложился до мономеров и коротких олигомеров (8 кДа). Во-вторых, в экспериментах *in vivo* более высокая скорость деградации пленок ПОб объясняется протоком биологических жидкостей (флюидов) внутри

исследуемых животных (кролики) содержанием других неспецифических гидролитических эстераз помимо липазы, а также активных форм кислорода, секретируемых клетками-макрофагами.

Таким образом, можно заключить, что альгинат и ПОБ, полученные бактериальным синтезом, полностью удовлетворяют свойствам к биосовместимости и биодegradации, что делает их перспективными полимерами для разработки различных конструкций в тканевой инженерии, в том числе в создании заплат для регенерации и лечения различных заболеваний толстого кишечника.

1.1.5. Биомедицинское применение альгината и поли-3-оксибутирата

Биосовместимость и биодegradируемость ПОБ и альгината позволяет их использовать для создания изделий биомедицинского назначения. Так, биосовместимость ПОБ подтверждается тем, что его синтез и накопление происходит не только в микроорганизмах, но встречается также у растений и животных [107]. Эти данные дают представление, что ПОБ с точки зрения биосовместимости представляет собой отличный материал для создания имплантатов, скаффолдов и прочих материалов для тканевой инженерии. Например, на линии клеток 3Т3 фибробластов было показано, что они демонстрируют хорошие адгезивные качества и выживаемость при культивировании их на полимерных мембранах ПОБ [108]. Также во многих других исследованиях как *in vitro* или *in vivo*, ПОБ демонстрировал хорошие результаты по биосовместимости с различными культурами клеток [109–111]. Альгинат, как и ПОБ, во многих исследованиях демонстрирует хорошую биосовместимость [112]. Так, был разработан метод создания гидрогелевых дисков на основе суспензии раствора альгината кальция и мезенхимальных стволовых клеток (МСК). Результаты показали, что клетки имели округлую форму и сохраняли высокую жизнеспособность на протяжении всей хондрогенной дифференцировки [113].

В зависимости от различных физико-химических свойств ПОб и альгинат могут быть применены в широком диапазоне для биомедицины и тканевой инженерии. В недавнем исследовании было показано, что низкомолекулярный альгинат (олигоальгинат) обладает ярко выраженным антиоксидантным действием [114]. Кроме того, результаты многих работ подтвердили, что низкомолекулярный альгинат может быть использован в качестве антибактериального средства [115, 116]. Альгинаты с высокой молекулярной массой могут создавать обширные трехмерные ионные сети из связей гулуранов с кальцием. За счет таких сетей возможно разрабатывать плотные альгинатные гидрогели, которые могут быть применены в качестве скаффолдов для тканевой инженерии [117], носителей лекарственных средств [118] и в качестве внеклеточных матриц [119, 120]. Помимо молекулярной массы на физико-химические свойства может влиять и М/Г состав альгината. Выше было сказано, что G-блоки отвечают за гелирование полимера при связывании с ионами кальция. Такие плотные гидрогели могут быть широко использованы в медицине и тканевой инженерии различных тканей [121–123]. Но и для альгинатов с высоким содержанием поли-M-блоков потенциально можно найти применение. Так в одной недавней публикации было показано, что альгинат с высоким содержанием маннуроновой кислоты индуцирует выработку протеогликанов первичными фиброхондроцитами мениска человека [124]. Иными словами, создается перспектива использования альгинатов с высоким содержанием маннуронов для применения в качестве лекарственного средства или изделия, направленного на восстановление утраченной ткани мениска.

Так как ПОб является гомополимером, то параметр ММ в большой степени отвечает за его физико-химические характеристики. С увеличением ММ, ПОб становится относительно менее кристаллическим и, в связи с этим, менее хрупким полимером [125, 126]. Следовательно, производство ПОб с высокой молекулярной массой желательно для применения в биомедицине, в качестве хирургических имплантатов, каркасов для тканевой инженерии или в качестве перевязочного материала для ран [127]. Также, как было сказано ранее, потенциал биополимера

ПОБ выходит за рамки использования в качестве каркасов или скаффолдов только для инженерии костной ткани. Так, к примеру, ряд работ посвящен регенерации хрящевой ткани, где ПОБ был использован в качестве основного биоматериала [48]. Денг с коллегами разработали матриксы на основе ПОБ методом выщелачивания с целью изучения на них трёхмерной пролиферации хондроцитов, полученных из суставного хряща кролика [128]. Результаты показали, что хондроциты на ПОБ-матриксах показывали хорошую пролиферацию и адгезию клеток, формируя клеточные скопления и островки как внутри, так и на поверхности ПОБ каркасов, сохраняя при этом фенотип всех клеток в течение всего времени эксперимента. В другом исследовании методом электроспиннинга были получены скаффолды из ПОБ, загруженные глюкозамин сульфатом для клеточной оценки *in vitro* [129]. Клетки продемонстрировали очень хорошую выживаемость, адгезию и проникновение внутрь ПОБ/глюкозамин сульфат скаффолдов в сравнении с контрольными каркасами на основе чистого ПОБ. Также в последние годы были выполнены работы по созданию различных конструкций на основе ПОБ для инженерии нервной ткани. Так в одном из исследований были разработаны скаффолды на основе композитов ПОБ/ПОБВ в различных соотношениях с целью исследовать потенциальную регенерацию миелиновых мембран [130]. Разработанные материалы на основе ПОБ показывали отличные результаты по пролиферации швановских клеток во всех видах матриксов в течение 14 дней [130]. Эти результаты демонстрируют, что для ПОБ можно найти потенциальное применение в качестве скаффолдов и для инженерии нервной ткани.

Использование низкомолекулярного ПОБ перспективно в создании микрочастиц для длительного контролируемого высвобождения лекарственных препаратов [131].

Таким образом, альгинат и ПОБ, которые одновременно могут продуцироваться бактериями рода *Azotobacter sp.*, обладают большим потенциалом для использования в медицине. Поэтому создание конструкций на основе биополимеров ПОБ и альгинатов для регенерации кишечного эпителия представляется весьма актуальной и обоснованной задачей.

1.2. Биоинженерные стратегии регенеративной медицины для желудочно-кишечного тракта

Заболевания желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) поражают примерно 10% населения на территории России и вызывают 80 смертей на 100000 человек. Каждый год фиксируется прирост летальных исходов в среднем на 0.003% [132, 133]. Биоинженерия ЖКТ нацелена на разработку прогностических моделей и регенеративных методов лечения травм и заболеваний кишечника [134].

Взаимосвязь между структурой и функцией в физиологии кишечника очень сложна и представляет собой серьезную биологическую проблему. Кишечный тракт выполняет множество жизненно важных функций, выступая в качестве барьера для внешней среды и осуществляя пищеварение, перистальтику, абсорбцию, секрецию, экскрецию. ЖКТ также тесно связан с иммунитетом и с центральной нервной системой [135]. Поверхность кишечника имеет строение, которое создает большую площадь поверхности размером примерно с теннисный корт ($\sim 250 \text{ м}^2$) [134]. Стенка кишечника состоит из слизистых, подслизистых и мышечных слоев с интегрированными сосудистыми, мышечными и нервными структурами, которые координируют функции кишечника. Морфология ткани разнообразна и варьирует в зависимости от области ЖКТ, соответствуя специализированным функциям [135].

Биоинженерия кишечника развивалась от бесклеточных тканевых скаффолдов до использования созданных искусственных органов ЖКТ с естественной физиологической функцией [136]. Заболевания кишечника возникают в результате потери или дисфункции одного или нескольких типов клеток. Статус патогенных клеток считается критически важным для лечения заболеваний кишечника. Поэтому важно знать, какие клетки будут использоваться в биоинженерии кишечника для лечения конкретного заболевания. На данном этапе разработка тканеинженерных конструкций для регенерации кишечника находится на лабораторной стадии и начинает активно внедряться в область медицинских исследований [137].

В настоящее время большинство заболеваний кишечника лечат с помощью фармакотерапии или хирургической резекции (удаления органа или части его), однако это неизбежно приводит к осложнениям. Так, к примеру, использование лекарств месалазина и инфликсимаба рекомендовано при ряде воспалительных заболеваниях кишечника, однако эти препараты могут вызывать местную и системную токсичность или могут быть вообще неэффективны против заболевания [138, 139]. Хирургическое вмешательство выбирают для лечения опухолей или травматического разрыва ЖКТ; однако при этом могут возникать серьезные послеоперационные осложнения, снижающие качество жизни, такие как гастропарез, стриктура, свищ и даже синдром короткой кишки после широкой резекции [137]. Поэтому создание конструкций на основе биоматериалов может являться тем самым новым подходом в биоинженерии кишечника, который позволит преодолеть указанные проблемы в лечении воспалительных заболеваний кишечника или опухолевых заболеваний ЖКТ.

1.2.1. Бесклеточные скаффолды

Биоинженерия кишечника — это отрасль тканевой инженерии, которая восстанавливает анатомию и физиологию кишечника. Биоинженерия кишечника, используя достижения в области биоматериалов и клеточной терапии, последовательно развивалась от бесклеточных скаффолдов до создания отдельных кишечных органоидов [136, 140]. Биоматериалами для бесклеточных скаффолдов могут служить децеллюляризованные алло- и ксеногенные ткани, биополимеры и синтетические материалы. Так, к примеру, разработка децеллюляризованных подслизистых скаффолдов демонстрирует улучшенную биосовместимость и прочность в сравнении с необработанными тканями [141]. В работе Пахари с соавт. было показано увеличение длины кишечника при использовании децеллюляризованного дермального матрикса в модели заболевания на крысах. Применение дермального матрикса показало, что вес у экспериментальной группы, получавших лечение, изменялся также как и у контрольной группы крыс, а имплантированные каркасы поддерживали инфильтрацию, дифференциацию и

рост энтероцитов [142]. Такие результаты показывают способность бесклеточных скаффолдов к рекрутированию и дифференциации клеток; однако этот процесс занимает достаточно продолжительное время.

Конструкции на основе полиуретана и поликапролактона (синтетические полимеры) демонстрируют хорошие результаты по биосовместимости, пролиферации и дифференциации клеток ЖКТ [143, 144]. Гидрогелевые бесклеточные скаффолды, разработанные из различных биополимеров, являются совершенно новым видом скаффолдов для инженерии кишечника. Биополимеры, на основе которых разрабатываются гидрогелевые скаффолды, такие как коллаген, гиалуроновая кислота, шелк, ксантановая камедь, волокнистый белок и т.д., получают из различных компонентов ткани или самих организмов [145, 146]. Так, в одной из работ сообщено о ферментно-сшивающих фибриновых гелях, которые восстанавливают желудочно-кишечный свищ в клинической практике [147]. Также для стабилизации фибринового гелевого скаффолда в пищеварительном соке был дополнительно разработан анти-пищеварительный гидрогель на основе ксантановой камеди. Данный гидрогель показывал способность вызывать экспрессию функциональных белков плотных контактов клеток ИЕС-6, растущих на поверхности гидрогеля [148].

При разработке скаффолдов для восстановления дефектов кишечника необходимо учитывать физико-химические, механические и биологические свойства материалов [149].

1.2.2. Клеточные скаффолды

В настоящий момент предпринимаются попытки создать искусственный ЖКТ путем комбинирования скаффолдов и тканеспецифичных клеток или стволовых клеток. От физико-химических свойств скаффолдов, таких как биосовместимость, пористость, жесткость и топография поверхности, зависит дальнейшая судьба клеток [137]. Обычно на таких конструкциях закреплены многочисленные аминокислотные группы, которые могут поддерживать клеточную адгезию и эти конструкции биосовместимы с живыми тканями [150]. Например, Крус-Акуна

с коллегами разработали гидрогель ПЭГ-4МАЛ, который содержал концевые остатки цистеина, создающие подходящую среду для роста и дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток человека (ПСК) для восстановления поврежденной ткани толстого кишечника [151]. При разработке искусственного ЖКТ помимо возможности прикрепления клеточных культур к поверхности скаффолда важную роль играет пористость конструкции, которая обеспечивает обмен воды и питательных веществ для засеянных клеток, а также пространство для распространения самих клеток [152, 153]. Что касается жесткости материала, адекватная прочность важна для успешного анастомоза; в противном случае разработанные конструкции разорвутся [137]. Механические свойства материала играют важную роль и в регуляции пролиферации и дифференцировки клеток, растущих на его поверхности [146]. Так в одном из исследований была создана топография скаффолда в форме кишечных ворсинок, что делает возможным дифференцировку клеток вдоль оси ворсинок. Было обнаружено, что эта трехмерная модель ворсинок имеет важное физиологическое значение для нативных тканей и действует как модель кишечника *in vitro* [154].

1.2.3. Кишечные органоиды

Хотя стратегии засеивания клеток на конструкции добавили биоактивности клеточным скаффолдам в сравнении с бесклеточными, существуют опасения по поводу изменения фенотипа клеток во время их культивирования [155, 156]. Методы кишечных органоидов могут генерировать все слои архитектуры кишечника за счет правильной экспрессии генов в кишечной ткани и стабильного фенотипа [157, 158]. Дно кишечных крипт содержит столбчатые энтероциты, экспрессирующие 5-НТ-рецептор, связанный с G-белком (lgr5), и они считаются стволовыми клетками кишечных крипт (КСК). КСК способны к самообновлению и дифференцировке в различные типы кишечных эпителиальных клеток, чтобы поддерживать целостность структуры крипты-ворсинки [159]. Крипты или отдельные КСК выделяют из ЖКТ человека и затем помещают в матригель, который обычно используется при культивировании органоидов в

физиологической трехмерной среде [160]. При создании кишечных органоидов необязательно использовать только КСК, возможно также использование стволовых клеток (ЭСК) или индуцированных ПСК с добавлением различных факторов роста в процессе их культивирования [161]. Такие сконструированные кишечные органоиды могут вырасти в зрелые кишечные ткани *in vivo* при трансплантации в тело человека [137]. В своем исследовании Лю с коллегами сравнили пять мест инкубации кишечных органоидов (сальник, брыжейку кишечника, оболочку рога матки, брюшную стенку и подкожное пространство) и обнаружили, что три васкуляризированные оболочки (сальник, брыжейка и рог матки) производят наибольшее количество кишечных органоидов, а обертывание сальником и брыжейкой может производить органоиды кишечника, которые легче всего анастомозируют с кишечником хозяина [162, 163]. Таким образом, разработка новых методов создания кишечных органоидов предоставляет новые возможности для восстановления и регенерации ЖКТ.

1.3. 16S Метагеномный анализ кишечной микробиоты

Кишечная микробиота — это огромная сообщество разнообразных бактерий, архей, вирусов и эукариотических организмов [164]. Суммарный микробиом ЖКТ человека содержит в 150 раз больше генов, чем наш собственный геном [165]. Установлено, что взаимодействие между микробиотой кишечника и человеком-хозяином имеет важное значение для поддержания гомеостаза и здоровья человека [166]. Важность кишечной микробиоты для человека в симбиозе велика настолько, что колонизация первых бактерий в ЖКТ начинается еще до рождения в утробе матери [167]. Поэтому становится очевидным, что кишечные бактерии могут являться теми самыми маркерами в прогнозе и диагностике многих кишечных заболеваний, таких как язвенный колит, болезнь Крона, воспалительные заболевания кишечника и даже рак толстого кишечника [168, 169]. Так как именно бактерии преобладают в ЖКТ, становится понятно, что они первыми подвергаются различным изменениям, связанными с болезнями кишечника или рациональном питания. За счет этого кишечная микробиота очень динамична и нестабильна в

зависимости от образа жизни и различных заболеваний человека [170]. В связи с этим становится сложно проследить изменения в кишечном сообществе, пользуясь классическими методами культивирования [171]. Но с 1980-х годов был достигнут большой прогресс в исследовании микроорганизмов без необходимости их культивирования. С появлением метода секвенирования по Сэнгеру, стал возможен анализ ДНК, выделенной непосредственно из интересующего организма. Такой подход позволяет определить к какой таксономической группе относится исследуемый организм при секвенировании переменных маркерных участков ДНК, таких как гены 16S рибосомальной РНК, разрешение которых может достигать до вида. Именно начиная с середины 2000-х годов исследования таксономического состава микробных сообществ методом 16S анализа стали независимы от методик культивирования микроорганизмов, что стало поворотным этапом в развитии этого научного направления [170].

Методика метагеномного 16S анализа позволила достаточно быстро и относительно просто получать большой объем данных за счет секвенирования гиперпеременных участков 16S рРНК последовательности. Данный ген является универсальным маркером для всех организмов, принадлежащих доменам Бактерий и Архей. Оказалось, что представление о составе и численности отдельных представителей микробиоты ЖКТ человека было очень приблизительным и неполным. Новый методический подход позволил описать множество ранее неизвестных видов, скорректировал представление о численности отдельных бактериальных групп, позволил реклассифицировать уже известные виды и открыл новые возможности для исследований функций отдельных представителей микробиоты и сообщества микроорганизмов ЖКТ в целом [170].

На сегодняшний день подробно представлена систематика бактерий, заселяющих ЖКТ человека, где было идентифицировано почти 2000 некультивированных видов путем реконструкции 16S метагеномных данных (Рис.5) [171–173].

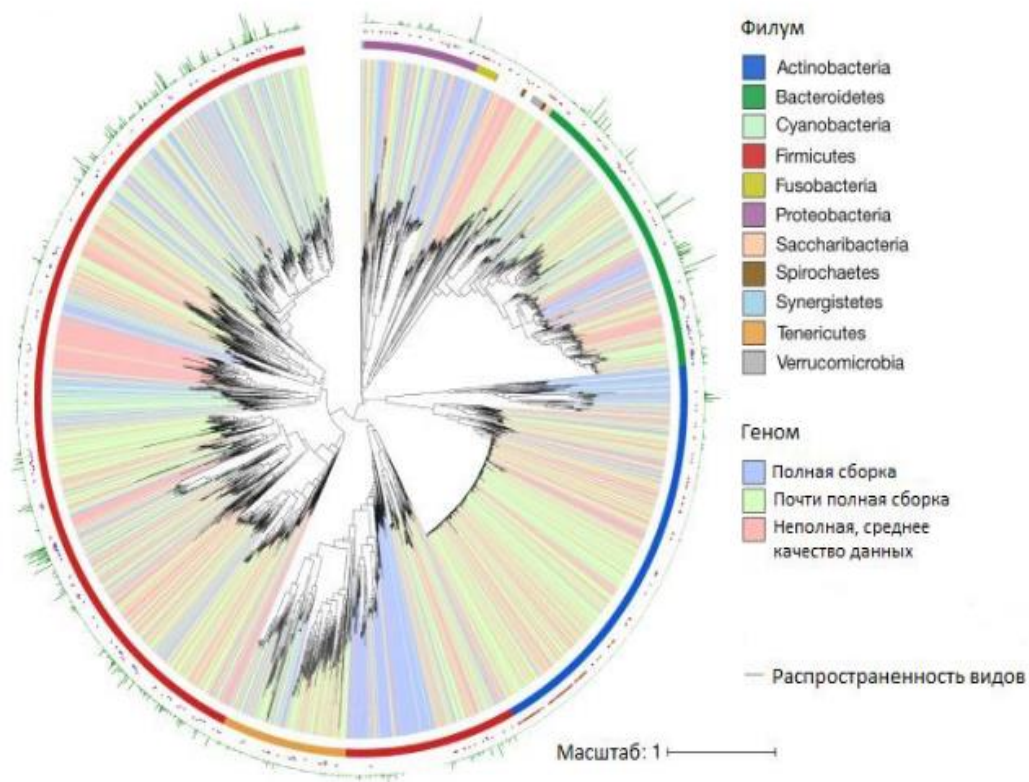


Рисунок 5. Филогения культивированных и некультивированных бактерий микробиоты кишечника человека [173]

Именно бурное развитие технологий секвенирования и внедрение этих методов в многочисленные исследования кишечной микробиоты в последние годы позволило понять роль многих отдельных таксономических групп в здоровом состоянии человека и при патогенезе [170].

1.3.1. Классические и современные методы исследования метагеномов

Более тридцати лет назад, в 1986 году, Пейс и его сотрудники впервые предложили революционную идею клонирования ДНК непосредственно из образцов окружающей среды для анализа сложных взаимодействий природных микробных популяций между собой [174]. Принятая стратегия была основана на клонировании генов 16S рРНК с использованием очищенной ДНК из природных образцов. Авторы отмечали, что, хотя образцы исследованной ДНК были взяты из смешанной популяции микроорганизмов, методология позволила восстановить и

впоследствии секвенировать отдельные гены рРНК. Таким образом, оценивая полные или частичные последовательности рРНК, можно получить состав исходных микробных популяций [175].

10 лет спустя, в 1998 году, появился термин «метагеном», когда Хандельсман и его сотрудники описали важность почвенных микроорганизмов как источников новых природных соединений [176]. По их словам, в науке появляется новый рубеж - разработка новых химических соединений из некультивируемых микроорганизмов, составляющих более 99% микробного разнообразия [177]. Эта новая концепция в микробиологической науке открыла для научного сообщества большое количество биохимических реакций, существующих в природе, которые еще предстоит открыть.

В настоящее время метагеномика подразделяется на два основных направления, которые нацелены на различные аспекты микробного сообщества, связанные с определенной средой. В первом, так называемом структурном метагеномном подходе, основное внимание уделяется изучению структуры некультивируемой микробной популяции, которая может помочь в реконструкции сложных метаболических взаимосвязей, установленных между членами сообщества (Рис. 6) [178, 179]. В этом смысле структуру микробного сообщества можно определить, как состав популяции и ее динамику в конкретной экосистеме. Изучение структуры сообщества позволяет глубже понять взаимоотношения между отдельными компонентами, составляющими сообщество, и важно для расшифровки экологических или биологических функций его членов [180]. В другом случае, функциональный метагеномный подход направлен на идентификацию генов, которые кодируют интересующую функцию. Это включает создание библиотек экспрессии с тысячами метагеномных клонов с последующим скринингом на основе активности этой функции (Рис. 6) [181, 182].

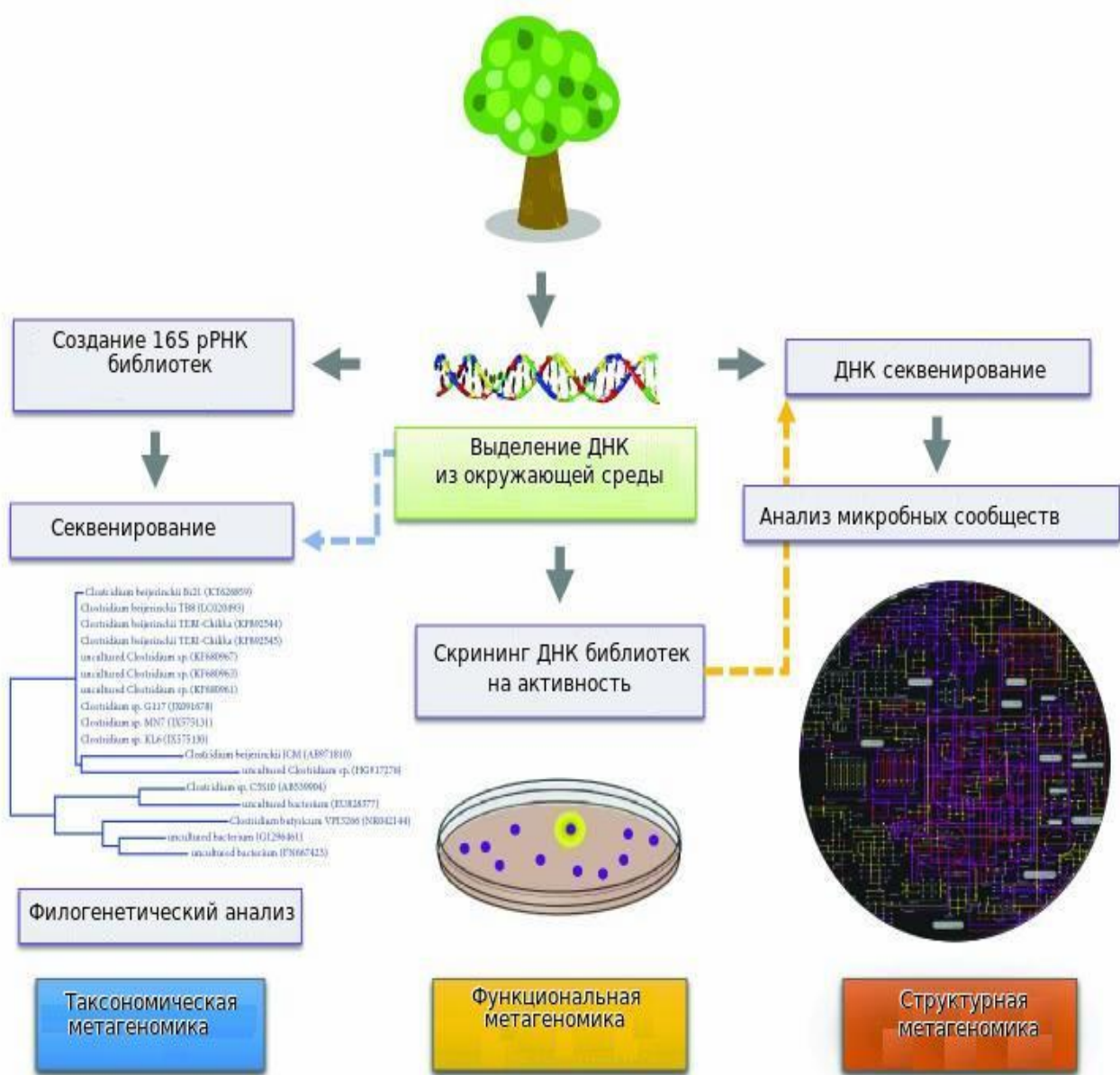


Рисунок 6. Основные подходы в метагеномике [175]

Важно подчеркнуть, что исследования генов 16S рРНК часто называют метагеномными исследованиями, хотя правильнее будет использовать формулировку «16S профилирование». При анализе гена 16S рРНК исследование сосредоточено на одном гене, используемом в качестве таксономического маркера (Рис. 6). С другой стороны, структурная метагеномика направлена на исследование геномов, членов микробного сообщества. Этот подход позволяет полностью реконструировать структуру сообщества, потенциально выявляя метаболические пути всего микробиома и отводя второстепенные или основные геоэкологические роли членам сообщества [180, 183]. Исследования 16S рРНК и метагеномика не

исключают друг друга; напротив, подходы, которые устанавливают связь между анализами 16S рРНК с генами или метаболическими путями, оказались полезными для определения функционального потенциала микробиома [184–186]. Таким образом, сочетание этих стратегий позволяет более глубоко изучить соответствующие биологические вопросы микробной экологии, такие как «кто является членом сообщества» и «какова его функциональная роль» [175].

В начале метагеномных исследований использование технологии секвенирования по Сэнгеру обеспечило важный прогресс в этой области [187]. Однако появление технологий секвенирования следующего поколения (NGS), способных секвенировать миллионы фрагментов ДНК одновременно при невысокой стоимости, значительно увеличило общие объемы данных в области метагеномных исследований [188–190]. Для сравнения, платформы NGS могут восстанавливать до 5000 МБ последовательности ДНК в день с затратами около 0,50 долларов на 1 МБ, в то время как методология секвенирования Сэнгера позволяет создавать около 6 МБ последовательности ДНК в день с затратами примерно в 1000 раз выше [191].

В данном исследовании применен метод 16S профилирования или 16S таксономический метагеномный анализ с целью получить количественную и качественную характеристику кишечных бактериальных сообществ при имплантации разработанной биополимерной конструкции.

1.3.2. Кишечная микробиота в норме и при патологиях

Благодаря интенсивному изучению микробиоты кишечника стало очевидно, что нормальное функционирование здорового организма невозможно без участия бактерий, а изменение состава микробиоты отражается на общем состоянии организма в целом. В функции микробиоты входит не только переваривание пищи, но и другие важные аспекты, такие как синтез витаминов, взаимодействие с иммунной системой, коммуникация с клетками кишечника, даже регуляция поведения организма-хозяина [170, 192–195]. Одной из основных физиологических функций резидентной микробиоты человека является создание

микробиологического барьера против микробных патогенов [196–198]. Микробиота из-за своего плотного симбиотического взаимодействия с клетками кишечника может являться маркером как при локальных прямых иммунных ответах, так и при опосредованных ответах организма-хозяина. Например, продукция иммуноглобулина А кишечными плазматическими клетками является важным параметром для обеспечения микробного разнообразия [199]. Синтезируемые микробиотой метаболиты представлены различными классами химических соединений и, попадая в кровоток через стенку кишечника, оказывают влияние на самые разные ткани и органы. В частности, метаболиты влияют на иммунную и центральную нервную систему [200, 201]. Из всего выше сказанного можно сделать вывод, что взаимодействие между организмом-хозяином и его микробиотой обеспечивается путем сложных петлеобразных обратных связей, которые до сих пор полностью не установлены [170, 200].

Миллионы лет коэволюции между микробиотой и организмом-хозяином привели их к взаимозависимости друг от друга. В результате этого кишечная микробиота млекопитающих стала играть важную роль в созревании и непрерывном обучении иммунной системы организма-хозяина; в обеспечении защиты против роста патогенов; во влиянии пролиферации клеток хозяина и васкуляризации; в регуляции эндокринных кишечных функций; в обеспечении источников энергии биогенеза; биосинтезе витаминов, нейротрансмиттеров и многих других соединений [202–205]. От самого рождения в младенческом возрасте организм уже имеет собственную микробиоту кишечника, которая начинает изменяться с прекращением грудного вскармливания [206]. В течение первых нескольких лет постнатального периода бактериальное разнообразие и функциональность микробиоты активно расширяется [207]. Темпы роста бактериального разнообразия после 1-ого года жизни человека начинают замедляться, и по достижению 12-летнего возраста состав кишечной микробиоты становится стабильным [208]. С этого возраста количество бактериальных таксономических единиц (ОТЕ) и число функциональных генов становится аналогичным таковым у взрослого человека (Рис. 7) [209, 210]. И только по

достижению пожилого возраста, бактериальное α -разнообразие начинает активно снижаться и становится нестабильной, такое развитие ситуации напрямую коррелирует со снижением иммунокомпетентности у людей, достигших пожилого возраста [170, 211].

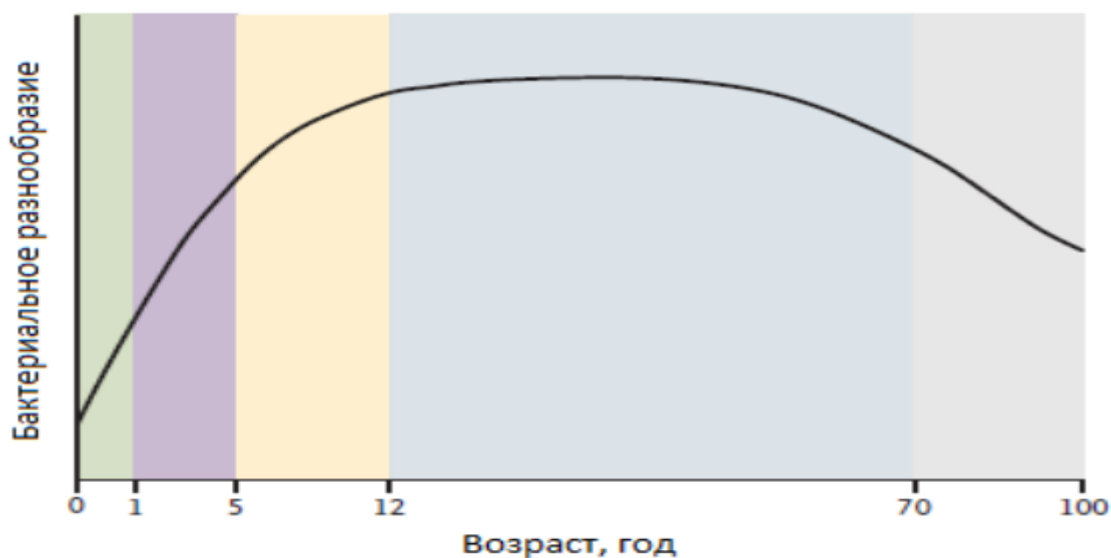


Рисунок 7. Развитие кишечной микробиоты у человека в течение жизни [210]

По достижению взрослого состояния человека кишечная микробиота из-за устоявшихся привычек в питании и ведения относительно стандартного образа жизни становится стабильной. Введение краткосрочных диет вызывает глубокие изменения в структуре бактериальных сообществ, в первую очередь, любые краткосрочные изменения, т.к. для организма это искусственное состояние, которое выражается в снижении бактериального α -разнообразия [212]. Множество экзогенных и эндогенных факторов влияют на микробиоту, такие как суточный ритм, питание, иммунный ответ хозяина, использование ксенобиотиков (включая антибиотики) и другие лекарства [213, 214]. Было установлено, что некоторые из этих факторов ведут к риску развития заболеваний в детском возрасте, таких как аллергия и ожирение [215]. Также заболевания, связанные с точечными мутациями в человеческом геноме, напрямую влияют на рост и обогащение определенного бактериального таксона кишечной микробиоты у лиц с воспалительными процессами заболевания кишечника [216]. Однако прием иммунодепрессантов и антимикробных лекарственных препаратов, а также место локализации активного

роста бактерий в кишечнике намного сильнее влияют на бактериальную композицию, указывая на то, что необходимо следить именно за данными факторами. Одним из главных вопросов, который стоит при исследовании кишечной микробиоты заключается в том, является ли нарушение равновесия микробных сообществ кишечника следствием или причиной хронических полигенных заболеваний [170, 217].

По современным представлениям, наибольшей численностью в ЖКТ человека обладают бактерии, принадлежащие филумам *Bacteroidetes* и *Firmicutes* [218, 219], а также *Actinobacteria* и *Proteobacteria*. В основной состав микробиоты входят также менее многочисленные представители филумов *Verrucomicrobia*, *Lentisphaerae*, *Synergistetes*, *Planctomycetes*, *Tenericutes* и *Deinococcus-Thermus* [170, 172]. Каждый из этих филумов играет очень важную роль в поддержании гомеостаза организма, а также некоторые внутри филумов из них определенные таксономические группы проявляют себя при различных заболеваниях, в том числе и при кишечных патологиях. Использование в настоящей работе 16S анализа позволит определить отдельные ОТЕ с разрешением до родовой принадлежности и тем самым понять какие бактерии проявляют себя в заданных условиях эксперимента (с биополимерной конструкцией или без).

ЧАСТЬ 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа состояла из нескольких задач: синтеза ПОБ и альгината микробиологическим путем с использованием штамма *Azotobacter vinelandii* 12, исследования их физико-химических свойств, разработки конструкций на основе бактериальных альгината и ПОБ в виде заплат, проведения серий операций по разработке модели дефекта толстого кишечника у крыс линии Wistar и имплантации конструкций в виде заплат в месте повреждения толстого кишечника, 16S метагеномного анализа полученных образцов после хирургического вмешательства.

2.1. Синтез поли-3-оксибутирата и альгината в полном факторном эксперименте и определение их физико-химических свойств

2.1.1. Синтез поли-3-оксибутирата и альгината при различных условиях

Синтез ПОБ и альгината проводился микробиологическим способом [168]. Кандидатом для синтеза был выбран штамм *Azotobacter vinelandii* 12, так как данный микроорганизм способен к продукции двух полимеров одновременно [30].

Данный штамм выделен из дерново-подзолистых почв Московской области (Россия). В настоящий момент бактерия поддерживается в лаборатории биохимии азотфиксации и метаболизма азота Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН [44, 220].

Культура *A. vinelandii* 12 представляет из себя колонию бактериальных клеток темно-оранжевого цвета, плеоморфны в зависимости от окружающей среды, грамотрицательные, строгие аэробы, подвижные (Рис. 8). Активно образуют цисты вокруг себя из альгината и алкилрезорцина, формируя тем самым защитную оболочку от неблагоприятных условий, таких как воздействие экстремальных температур, повышенной аэрации или токсичного действия тяжелых металлов [220, 221].

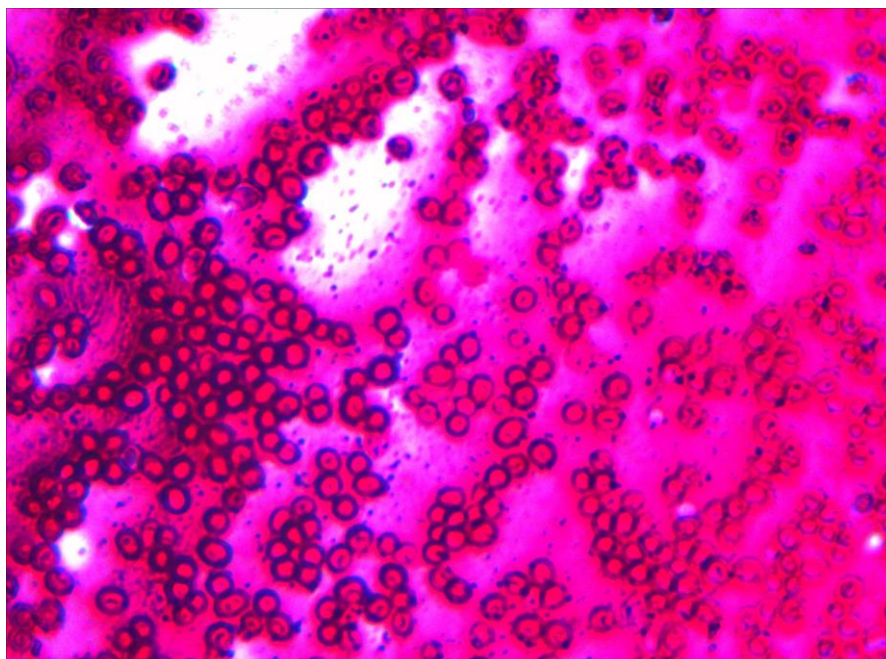


Рисунок 8. Культура *Azotobacter vinelandii* 12

Для точного видового определения штамма выполнялся 16S анализ со стандартными парами праймеров под 16S рРНК ген, а именно прямой праймер fD1 — (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и обратный rD1 — (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'). Амплификацию ПЦР-продукта производили на термоциклере T100 (Bio-Rad, США). Затем ПЦР-продукт был очищен набором Cleanup Standard kit (Евроген, Россия). Секвенирование готового 16S ампликона выполняли на 3730xl секвенаторе (thermofisher scientific, США). После секвенирования прочтенные последовательности проверяли на наличие химер и собирали с использованием программного обеспечения DNA Baser Assembler 5.15.0. Для идентификации видов собранный контиг сравнивали с другими генами 16S в базе данных NCBI Genbank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, по состоянию на 23 января 2020 г.) с использованием инструмента BLASTN.

Для поддержания *A. vinelandii* 12 использовали твердую среду Эшби следующего состава: K_2HPO_4 - 0.2, $MgSO_4$ — 0.2 г/л, NaCl — 0.2 г/л, Na_2MoO_4 — 0.006 г/л, $CaCO_3$ — 5.0 г/л, сахароза — 20 г/л, agar — 20 г/л [222]. Микробиологический инокулянт выращивали на жидкой среде Берка в качалочных колбах объемом 750 мл с содержанием 100 мл среды в течение 48 ч, 28°C, pH среды

– 7.2, возраст посевного материала - 1 сутки; объем внесенного посевного материала — 4%.

Стандартная среда Берка, содержащая: $MgSO_4$ — 0.4 г/л, $FeSO_4$ — 0.01 г/л, Na_2MoO_4 — 0.006 г/л, цитрат натрия — 0.5 г/л, $CaCl_2$ — 0.1 г/л, K_2HPO_4 — 1.05 г/л, KH_2PO_4 — 0.2 г/л, сахароза — 20 г/л регулировалась по трем параметрам, а именно, по концентрации фосфатов (K_2HPO_4 и KH_2PO_4), по концентрации сахарозы и по уровню аэрации за счет скорости перемешивания качалочных колб. Все три параметра имели 2 уровня: высокий уровень (+), соответствующий высоким концентрациям веществ в среде и высокой скорости перемешивания, и низкий уровень (-), который соответствует низким концентрациям фосфатов, сахарозы и скорости перемешивания (Таблица 1). Для создания всех возможных комбинаций требуется поставить 2^n опытов, где n — это количество исследуемых факторов. Данный полный факторный эксперимент (ПФЭ 2^3) позволит отследить какие факторы или их взаимодействия оказались ключевыми в синтезе альгината и ПОБ. 8 опытов, имеющий каждый свое обозначение (Таблица 1), в различных сочетаниях имел по три повторности, с целью дальнейшего статистического анализа.

Таблица 1. План полного факторного эксперимента (ПФЭ 2^3)

	C-/P-/O-	C+/P-/O-	C-/P+/O-	C+/P+/O-	C-/P-/O+	C+/P-/O+	C-/P+/O+	C+/P+/O+
Сахароз а g/l (x_1) (+) 35 (-) 15	-	+	-	+	-	+	-	+
K_2HPO_4 g/l (x_2) (+) 1.25 (-) 0.05	-	-	+	+	-	-	+	+
Аэрация rpm (x_3) (+) 210 (-) 150	-	-	-	-	+	+	+	+

2.1.2. Выделение и очистка бактериального поли-3-оксибутирата и альгината

По функциям и физико-химическим свойствам альгинат можно разделить на два типа: свободный и капсулярный альгинат. Свободный альгинат синтезируется в межклеточное пространство, имеет низкую молекулярную массу, снижает концентрацию кислорода и затрудняет диффузию в культуральной жидкости [44]. Альгинат капсулярный выполняет защитную функцию, покрывая стенку бактериальной клетки плотным полисахаридным слоем; этот полимер имеет высокую молекулярную массу и позволяет колониям клеток образовывать вокруг себя капсулы для устойчивости к неблагоприятным условиям, в первую очередь из-за влияния избыточной концентрации кислорода на нитрогеназные комплексы [58].

Первым этапом для выделения свободного альгината служит разделение клеточной биомассы после выращивания и культуральной жидкости методом центрифугирования на 11000 g в течение 30 минут. Затем супернатант был осажден 3 объемами охлажденного 80% этилового спирта при 4400 g в течение 15 минут. Полученный осадок был лиофилизирован в течение суток (Martin Christ Alpha 1-2 LD plus, Германия). Капсулярный альгинат выделяли из клеточной биомассы путем добавления к ней 1M раствора NaCl и 100 mM ЭДТА в соотношении 1:8:1. Далее полученную смесь инкубировали 1 час при 60°C с перемешиванием на орбитальном шейкере (PSU-20i, Biosan, Латвия) до полной гомогенизации раствора. После супернатант получали центрифугированием при 11000 g в течение 30 минут. Супернатант осаждали 3 объемами охлажденного 80% этилового спирта при 4400 g в течение 15 минут, по окончании полученный осадок лиофилизировали 24 часа. Заключительная стадия очистки свободного и капсулярного альгината заключалась в растворении осадков в 1M растворе NaCl и в диализе полученного раствора против 1 л 0.1M NaCl в течение 30 часов. Для получения очищенных альгинатов, супернатанты после диализа снова осаждали 3 объемами этилового спирта и осадки лиофилизировали [44, 223].

Выделение ПОБ из клеточной биомассы осуществляли экстракцией хлороформом в течение 12 ч при 37 °С. Полученный экстракт отделяли от клеточных остатков фильтрацией и затем ПОБ выделяли из хлороформного экстракта осаждением изопропиловым спиртом. Стадию растворения в хлороформе и осаждения ПОБ изопропиловым спиртом повторяли не менее 3 раз. ПОБ сушили при 60 °С [44].

2.1.3. Определение молекулярной массы поли-3-оксибутирата и альгината

Молекулярные массы биополимеров были определены методом вискозиметрии. Характеристическая вязкость была подсчитана из результатов времени истечений хлороформного раствора ПОБ и водного раствора альгината, а именно:

$$\eta_{sp} = (t - t_0)/t_0,$$

где t_0 - время истечения растворителя, t - время истечения раствора полимера.

Молекулярные массы рассчитывалась по уравнению Марка-Хаувинка-Куна:

$$[\eta] = K(M)^\alpha,$$

с константами для альгината:

$$K = 7.3 \times 10^{-5}; \alpha = 0.92,$$

$$[\eta] = 7.3 \times 10^{-5} \times (M)^{0.92}$$

И для ПОБ:

$$K = 7.7 \times 10^{-5}; \alpha = 0.82,$$

$$[\eta] = 7.7 \times 10^{-5} \times (M)^{0.82},$$

где M - молекулярная масса, $[\eta]$ - характеристическая вязкость, K и α - константы, значение которых зависит от природы полимера (альгинат и ПОБ) [224, 225].

2.1.4. ИК-спектроскопия альгинатов

Методом инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье (FTIR) были исследованы бактериальные альгинаты. ИК-спектры регистрировали в режиме отражения в ИК-микроскопе Nupregion-2000, связанным с ИК-спектром IFS-66 v/s FTIR (Gecrystal, разрешение 2 см⁻¹, диапазон 4000–600 см⁻¹,

сканирование – 50, “Bruker”, США) [44]. Таким же образом, методом ИК-спектроскопии был исследован альгинат водорослей, который был использован в качестве контроля.

2.1.5. Подготовка пленок из поли-3-оксибутирата

Для анализа физико-химических свойств были получены полимерные пленки из ПОБ. Образцы ПОБ растворяли в хлороформе (3% вес/об.) и разливали в чистые, сухие, стерильные стеклянные чашки Петри. Толщину пленки измеряли с помощью цифрового микрометра (796XFL-1, Starrett, США) [44]. Толщина полимерных пленок составляла 50 ± 4 мкм.

2.1.6. ^1H -ЯМР анализ поли-3-оксибутирата

Методом протонного магнитного резонанса была исследована химическая структура бактериального ПОБ. ПОБ растворяли в дейтерированном хлороформе (CDCl_3) и спектры данного раствора детектировали на спектрометре MSL-300 (“Bruker”, Германия) при рабочей частоте 400 МГц. Химические сдвиги в частях на миллион (м.д.) измеряли от 0 ч/млн. к сигналу остаточных протонов хлороформа-d (CDCl_3), 7.27 ч/млн. Параметры эксперимента были следующими: 1% (вес/об.) полимера в хлороформе-d, 313 К, время сбора 2.5 с и ширина спектра 4000 Гц [44, 226].

2.1.7. Термогравиметрический анализ поли-3-оксибутирата и альгината

Термогравиметрические (ТГА) измерения ПОБ и альгината выполняли на термовесах (TG 209 F1, NETZSCH, Германия). Устройство было откалибровано по точкам плавления стандартных веществ. Эксперимент проводили в открытом алундовом тигле с использованием образца массой 7 мг в потоке (20 мл/мин) воздуха при температуре от 30 до 600°C со скоростью нагрева 10°C/мин. Температуры разложения были взяты на пике максимума первой производной оставшегося веса (%) по отношению к кривой температуры (°C) [44].

2.1.8. Формирование альгината кальция

Гидрогели альгината кальция были разработаны для исследования физических и реологических свойств. Раствор 1% альгината натрия смешивали с 10% раствором CaCl_2 в соотношении 1:1. Объем полученных альгинатных гидрогелей измеряли путем вычитания объема жидкого альгината и хлорида кальция, оставшегося (V_r) после полимеризации, от начального общего объема (V_t). Выход полученного полимера рассчитывали по следующему уравнению [227]:

$$\text{Выход полимера (\%)} = 100 * (V_t - V_r) / V_t.$$

2.1.9. Реология альгинатного гидрогеля

Эксперименты по изучению механических свойств избранных альгинатов на основе ПФЭ проводили на реометре Anton Paar MCR 302 (Австрия). Исследования проводились на сухих образцах. Реометр был снабжен измерительной системой типа "пластина-пластина". Типичная толщина исследуемых образцов составляла 3-4 мм, диаметр - 2,5 см. Сначала был проведен амплитудный тест для определения диапазона линейной вязкоупругости при угловой частоте 10 рад/с. Также на альгинатных образцах проводились частотные испытания с угловой частотой от 0,1 до 100 рад/с. Во всех испытаниях измеряли модуль накопления (G') и потери (G'') и рассчитывали комплексный модуль сдвига $G^* = \sqrt{(G')^2 + (G'')^2}$.

2.1.10. Тест на водопоглощение поли-3-оксибутирата и альгинатного гидрогеля

Сухие образцы альгината кальция и ПОБ постоянной массы (m_1) погружали в деионизированную воду (25 °С) на 3 часа. После удаления капель воды влажные образцы взвешивали. Водопоглощение гидрогеля альгината кальция и пленок ПОБ рассчитывали по формуле, где m_1 и m_2 - массы сухого и водонасыщенного образца соответственно:

$$A (\%) = (m_2 - m_1) m_1 \times 100,$$

где m_1 и m_2 - массы сухого и водонасыщенного образца соответственно.

2.1.11. Выделение и характеристика мезенхимальных стволовых клеток

Все эксперименты и хирургические процедуры проводились в соответствии с этическими рекомендациями, изданными ISO 10993–1:2009 и одобренными локальными комитетами по биоэтике биологического факультета МГУ имени М.В. МГУ им. Ломоносова (№ 16.1 от 28 мая 2021 г.).

Для дальнейшей оценки цитотоксичности альгинатных гидрогелей было произведено выделение МСК из бедренной кости молодых (3–5-дневных) крыс линии Wistar и их культивирование в течение 2 недель в среде DMEM (Dubecco's Modified Eagle Medium, «ПанЭко», Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, Biological Industries, Израиль) и 100 ЕД/мл пенициллина. МСК культивировали в течение трех пассажей. Клетки удаляли путем инкубации в растворе трипсина-версена в течение 5 минут и затем подсчитывали с помощью гемоцитометра. В дальнейшем готовили суспензию 10^5 клеток в 100 мкл PE-буфера (2 мл ЭДТА-0,5% ЭТС в БФС) и инкубировали с антителами к положительным поверхностным маркерам фенотипа МСК: CD90 и CD29 и отрицательным поверхностным маркерам: CD45 и CD11b/c (eBioscience, Сан-Диего, Калифорния, США). Жизнеспособность клеток оценивали при использовании красителя 7-Аминоактиномицина Д (7ААД) в темноте в течение 40 мин при температуре 5 °С. Затем клетки промывали в БФС и отделяли центрифугированием, после чего проводили их исследование на проточном цитометре (FACS ARIA II, Franklin Lakes, NJ, США). Анализ результатов был выполнен с использованием программного обеспечения Flowing 2.5.1 (Рис. 9).

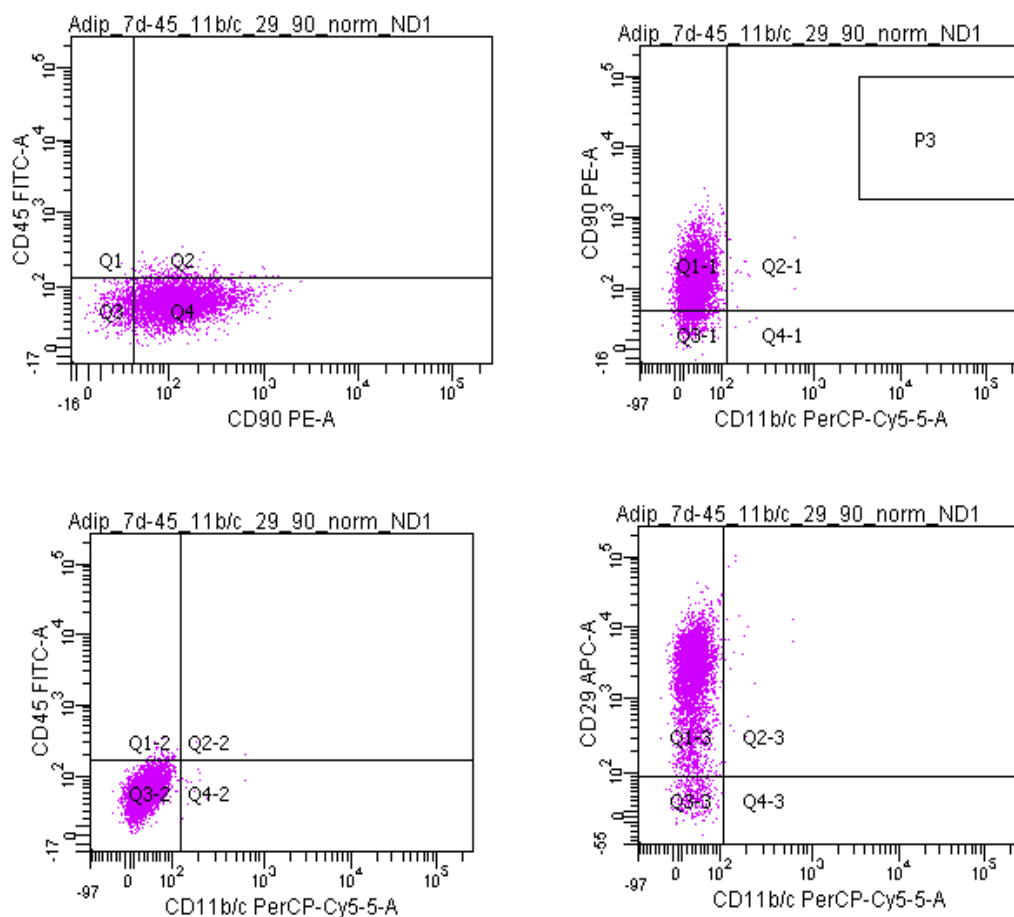


Рисунок 9. Данные цитометрии МСК, выделенных из костного мозга крыс

2.1.12. Тест на цитотоксичность альгинатного гидрогеля

Для оценки цитотоксичности были выбраны три типа бактериальных альгинатов, а именно: свободный альгинат, низкомолекулярный (212 кДа) капсулярный альгинат и высокомолекулярный (574 кДа) капсулярный альгинат. Для сравнения с альгинатами бактериального происхождения использовали альгинат водорослей от Merck (бывш. Sigma Aldrich, Германия) со средней вязкостью 20 000–40 000 сП (около 155 кДа). Клетки, выращенные на культуральном пластике, использовали в качестве отрицательного контроля (НК). Для культивирования МСК с альгинатным гидрогелем были приготовлены сферы объемом 25 мкл путем добавления по каплям 1%-го раствора альгината к 10%-му раствору хлорида кальция. Затем сферы из альгината кальция промывали в фосфатно-солевом буфере (БФС) [228]. Затем МСК инкубировали в термостате при 37 °С во влажной атмосфере с 5% CO₂ в питательной среде, содержащей модифицированную среду Игла (DMEM,

Invitrogen, Waltham, MA, США) с высоким содержанием глюкозы (4,5 г/л), 10% эмбриональной телячьей сыворотки и антибиотиков (100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл раствора стрептомицина). После трех пассажей клетки собирали, центрифугировали и промывали, как указано в разделе 2.1.11, после чего высевали клетки на 96-луночный планшет по 4000 клеток на лунку. Объем ростовой среды на лунку составлял 200 мкл. Через 2 часа в каждую лунку добавляли по одной сфере из альгината кальция. Рост клеток на пластике в присутствии альгинатных гидрогелевых сфер в течение первого и третьего дня оценивали методом ХТТ с использованием набора для пролиферации ХТТ (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Израиль). Этот метод основан на способности активных митохондрий живых клеток превращать соли тетразолия в соли формазана. Для этого в каждую лунку добавляли 50 мкл раствора реагента ХТТ и 50 мкл бессывороточной среды DMEM после удаления из лунок альгината кальция в конце культивирования. Планшеты инкубировали при 37°C еще 2 часа. После этого спектрофотометрически измеряли поглощение образцов при 450 нм путем вычитания фонового поглощения при 620 нм. Затем количество жизнеспособных клеток на пленках определяли по калибровочной кривой, основанной на их ХТТ-реактивности. Результаты представляли как рост жизнеспособных клеток по отношению к негативному контролю, где к последнему не добавляли альгинаты.

2.1.13. Статистический анализ

Для статистической оценки данных был реализован непараметрический тест Краскела-Уоллиса с использованием пакета tidyverse в среде R (версия 3.6.3, Lucent Technologies, Murray Hill, NJ, США, под кодовым названием «Holding the Windsock». Copyright © 2020). Полученные данные представляли средние значения \pm SD (стандартная ошибка среднего). Для анализа результатов полного факторного эксперимента (ПФЭ 2³) был проведен метод многомерного дисперсионного анализа (three-way ANOVA) с использованием пакета stats на языке программирования R. Критерием отбора достоверных различий между группами было $p \leq 0,05$.

2.2. Эндопротезирование конструкции на основе поли-3-оксибутирата и альгината крысам линии Wistar в толстый кишечник

2.2.1. Инкапсуляция пробиотических бактерий в сферы из альгинатного гидрогеля

Для имплантирования биополимерной конструкции в толстый кишечник крысам линии Вистар были разработаны сферы из альгинатного гидрогеля с включением в него пробиотических бактерий, а именно бактерий рода *Lactobacillus sp.* и *Bifidobacterium sp.* [170].

Реагенты и среды:

- Раствор 50 мМ CaCl₂;
- Раствор 1% цитрата натрия;
- Жидкая питательная среда MRS-бульон;
- Бактериальный капсулярный альгинат после ПФЭ;
- Пробиотические культуры *Lactobacillus sp.* и *Bifidobacterium sp.*;
- Раствор для промывания и разведения (РДПР) суспензий клеток;

Альгинат перед инокуляцией пробиотических бактерий стерилизуют методом пастеризации, приготовление 1% раствора альгината является стандартной для инкапсулирования различных клеток [67, 170]. Один грамм бактериального альгинат растворяют в 90 мл MRS-бульона, после производится посев пробиотических бактерий. Посев производили по 10 мл бактерий, выращенных на MRS-бульоне для достижения 1% концентрации альгината, полученную смесь тщательно перемешивали на магнитной мешалке [170]. Конечным этапом было внесение по каплям полученного раствора в 50 мМ CaCl₂, за счет ионотропного связывания ионов кальция с гулурановыми мономерами, формируются сферы заполненные альгинатным гелем и бактериями. После сферы отмывают раствором РДПР, приготовленные сферы имели три комбинации включения пробиотических бактерий, а именно: сферы с включением лактобактерий, сферы с включением бифидобактерий и сферы с включением сразу двух родов одновременно [170].

2.2.2. Разработка биополимерной конструкции

Пластина из чистого ПОб толщиной около 40 мкм была отлита на обезжиренной стеклянной поверхности. Для получения микросфер диаметром 150 мкм хлороформенный раствор ПОб с молекулярной массой 300 кДа смешивали с 5% раствором карбоната аммония. Полученный коллоид по каплям добавляли в 1%-ный (w/v) раствор поливинилового спирта при постоянном перемешивании на верхнеприводной мешалке. Полученные микросферы были иммобилизованы на пластину из ПОб. После высыхания ее покрывали тонким слоем полимерного раствора ПОб, которым фиксировали микросферы. Полученные пластины ПОб с микросферами помещали в 1%-ный раствор альгината в четырех вариантах: чистый альгинат, альгинат со сферами лактобактерий, альгинат со сферами бифидобактерий и альгинат со сферами лакто-бифидобактерий. Полученные конструкции выдерживали в течение 1 часа, после чего биополимерные изделия переносили в 10%-ный раствор хлорида кальция и также выдерживали в течение 1 часа для создания альгинатного гидрогеля на поверхности ПОб-пластин.

2.2.3. Животные в экспериментах in vivo

Самцы крысы линии Wistar, 10-недельного возраста и массой 300–350 г, были использованы для хирургических вмешательств по имплантации композитных пластин в толстый кишечник. Крыс инкубировали в специальных барьерных помещениях, свободных от патогенов, при $25 \pm 3^\circ\text{C}$, влажности 55% с 12-часовым циклом свет/темнота с постоянным доступом к еде и воде.

2.2.4. Имплантация конструкции поли-3-оксибутират-альгинат в виде заплат в толстый кишечник крысам линии Вистар

Была разработана модель повреждения стенки толстого кишечника крысы in vivo с помощью хирургических методов с целью дальнейшего отбора фекальных образцов для 16S метагеномного анализа.

Для надежной фиксации в желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) крысы был выбран толстый кишечник, по причине того, что слепая кишка имеет

неправильную «мешковидную» форму для прикрепления. Поэтому все дальнейшие эксперименты проводились на толстом кишечнике, который непосредственно выходит из слепой кишки.

Перед серией операций крысам вводили по 10 мг золетила 50 на полкилограмма веса животного в комбинации с мышечным миорелаксантом рометаром в дозе 6 мг/кг. Затем под наркозом производилась лапаротомия и выведение толстого кишечника из брюшной полости с фиксацией участка этого кишечника при помощи двух зажимов кохера. На ранних этапах исследования толстый кишечник подвергался травматизации и ишемизации при контакте с металлическими частями зажимов, поэтому предварительно сами зажимы были обмотаны гигроскопичной медицинской ватой для предотвращения повреждения серозно-мышечной ткани кишечника при непосредственном захвате (Рис. 10А).

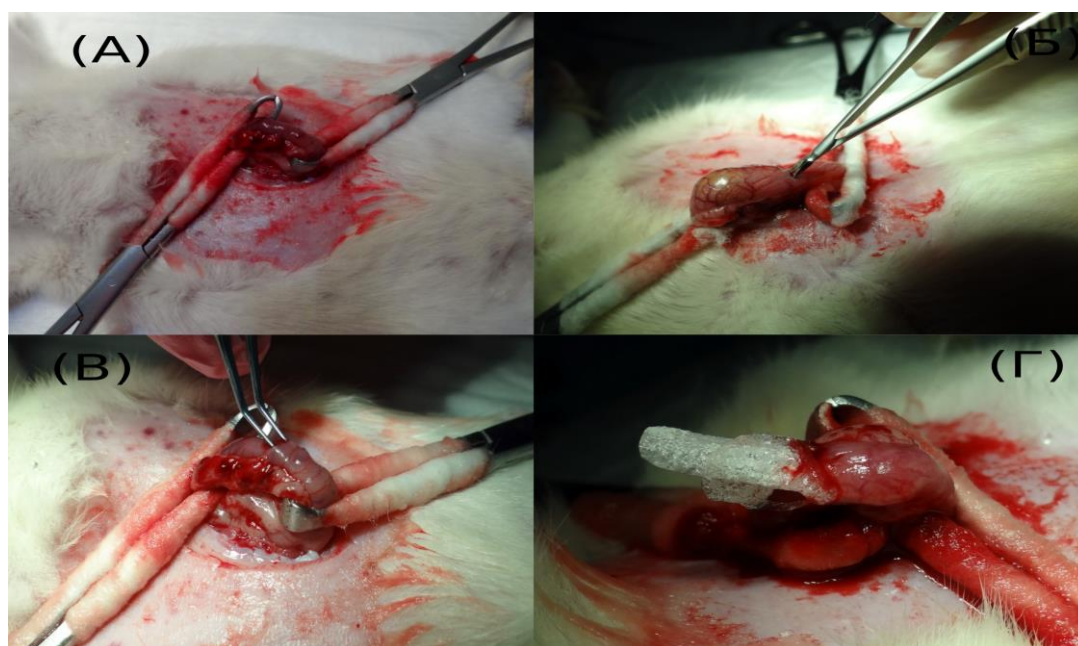


Рисунок 10. Имплантация полимерной пластины ПОБ—альгинат. (А) — фиксация толстого кишечника зажимами кохера. (Б) —повреждение толстого кишечника крысы хирургическими ножницами. (В) —исполненный разрез между двумя зажимами Кохера. (Г) —имплантация кишечной заплаты ПОБ—альгинат

Повреждение толстого кишечника было проведено хирургическими ножницами по центру между двумя зажимами Кохера шириной в 3-4 мм (Рис. 10Б,

В). Затем на крысах был проведен ряд операций на месте повреждения кишечной заплаты длиной 1.5-2 см и шириной 0.5 см (Рис. 10Г).

При наложении швов для закрытия поврежденного участка в толстом кишечнике был использован модифицированный шов Ламбера: использование стандартного шва было проблематично из-за того, что он захватывает только серозно-мышечную (внешний футляр) ткань кишечника, поэтому был использован модифицированный «сквозной» шов Ламбера (Рис. 11) [229, 230]. Толща толстого кишечника прошивалась строго перпендикулярно.

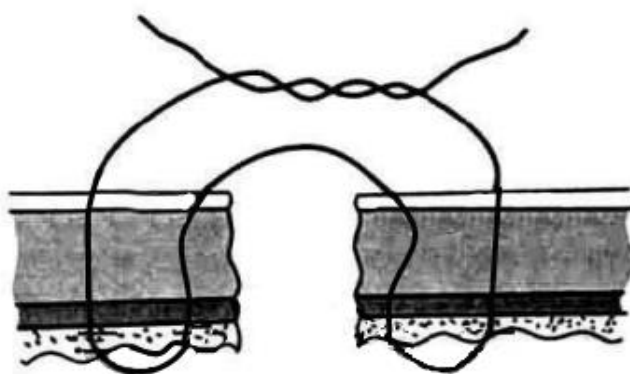


Рисунок 11. Сквозной шов Ламбера

Для предотвращения высыхания ЖКТ, место операции периодически смачивали физиологическим раствором (0.9% NaCl) с антисептиком Фурацилином 0.4 г/л. Для достижения герметичности, частота швов Ламбера должна быть не реже 3 стежек на 1 см длины как вдоль (Рис. 12А), так и поперек (Рис. 12Б) на месте повреждения толстого кишечника [231]. В ходе методики для поврежденного кишечника, при имплантации заплаты ПОб-альгинат требовались стандартные швы 3*3 (Рис. 12В) [15, 232].

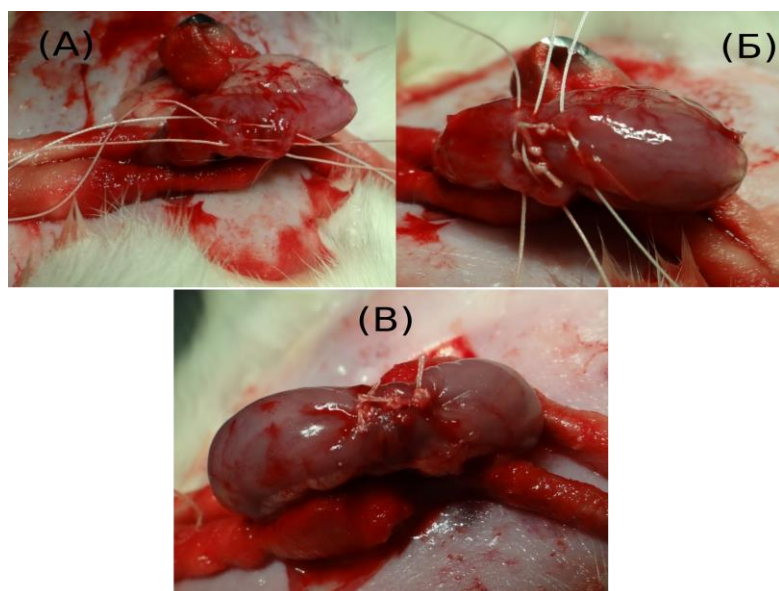


Рисунок 12. Швы Ламбера. (А) —продольные швы. (Б) —поперечные швы. (В)— имплантированная заплата с швами 3*3

По завершении операции кишечную заплату фиксировали краевыми швами на стенку толстого кишечника, брюшную стенку закрывали поперечными швами с частотой 2 стежка на 1 см длины и обрабатывали антибактериальным препаратом Стрептоцид [233].

После операции одной группе крыс с включенной конструкцией без инкапсулированных в сферы пробиотиков, каждый день вводили раствор антибиотика азитромицин в концентрации 30 мг/кг веса. Все послеоперационные крысы на третьи сутки получали жидкое углеводно-белковое питание. В итоге было создано семь экспериментальных групп крыс линии Wistar:

- Контрольные крысы без операционного вмешательства (Контроль);
- Контрольные крысы с операционным вмешательством (плацебо);
- Крысы с имплантированной конструкцией ПОБ-альгинат (ПОБ-альгинат);
- Крысы с имплантированной конструкцией ПОБ-альгинат и в присутствии антибиотика (антибиотик);
- Крысы с имплантированной конструкцией ПОБ-альгинат и сферами лактобактерий (лакто);

- Крысы с имплантированной конструкцией ПОБ-альгинат и сферами бифидобактерий (бифидо);
- Крысы с имплантированной конструкцией ПОБ-альгинат и сферами лакто-бифидобактерий (лакто-бифидо);

После 7 суток животных умерщвляли путем перенаркотизации и проводили релапаротомию с целью получения биологического материала. Забор проб был произведен на месте операционного вмешательства с помощью медицинского шпателя. Проводили забор каловых масс и соскоб слизи со стенки толстого кишечника.

2.3. 16S Метагеномное профилирование

2.3.1. Выделение геномной ДНК

Все полученные образцы хранились в морозильной камере при -70°C до момента выделения ДНК из биоматериала. Для выделения ДНК к замороженным образцам добавляли кремниево-циркониевые бусины (BioSpec Products, США) диаметром 0,1 мм (300мг) и 0,5 мм (100мг), а затем 1200 мкл теплого лизирующего буфера (500мМ NaCl, 50мМ Tris-HCl, pH 8.0, 50мМ ЭДТА, 4% SDS). Все это перемешивали на вортексе до однородного состояния и гомогенизировали с помощью MiniBeadBeater (BioSpec Products, США) в течение 3 мин. Затем полученный лизат был подвержен инкубированию при 70°C в течение 15 мин., после образцы центрифугировали 20 мин при 14000 об/мин. Далее супернатант отбирали в новые эппендорфы и ставили в лед. К осадку снова добавляли лизис буфер и повторяли процесс. Супернатанты объединяли и добавляли к ним 2 объема 96% спирта и 1/10 объема 3М раствора ацетата натрия. После образцы инкубировали при -20°C не менее часа. По окончании инкубации образцы центрифугировали при 12000 об/мин 20 мин. Полученный осадок дважды промывали 80% этанолом и затем сушили на воздухе и растворяли в TE-буфере. Последним этапом было добавление к элюатам РНКазу А (5 мг/мл) в соотношении к раствору 1:200, данная стадия необходима для избавления в образцах молекул

РНК. Образцы с РНКазой инкубировали 1 час при 37°C и полученный раствор ДНК хранили при -20°C.

2.3.2. Подготовка 16S библиотек

Метагеномный анализ был сделан по варибельному участку V4 гена 16S рРНК для оценки качественного и количественного разнообразия бактериальных сообществ. Последовательность участка V4 составляет 254 нуклеотида и данный ДНК фрагмент в каждом образце амплифицировался при помощи форвардного праймера Forward515 с последовательностью GTGBCAGCMGCCGCGGТАА и реверсного праймера Reverse806 с последовательностью GGACTACHVGGGTWTCTAAT.

Непосредственно перед амплификацией, образцы были разведены в 500 раз деионизированной водой. Далее была произведена амплификация V4 фрагмента при помощи праймеров Forward515 и Reverse806 с присоединенными к ним последовательностями P5 и P7 в качестве адаптеров для Illumina и индексированных баркодов при помощи набора Nextera XT Index Kit (Illumina). Данный набор позволит при всех возможных комбинациях пулировать одновременно до 384 образцов (Рис. 13).

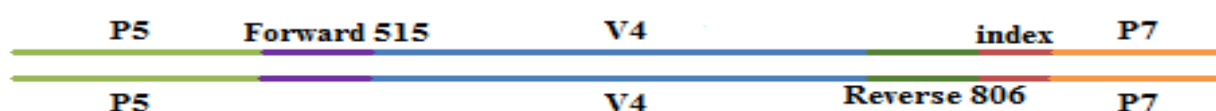


Рисунок 13. Дизайн ДНК библиотеки участка V4

2.3.3. Секвенирование 16S

После раунда амплификации, ПЦР-продукты с использованием различных комбинаций специфических праймеров были очищены при помощи бусин Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, США) в соответствии с протоколом.

Концентрация полученных 16S библиотек в растворе определяли с помощью флуориметра Qubit® (Invitrogen, США) с использованием набора Quant-iT™ dsDNA High-Sensitivity Assay Kit (США). Очищенные ампликоны смешивали

эквимольно в соответствии с полученными концентрациями. Качество приготовленной для секвенса библиотеки оценивали на приборе Bioanalyzer 2100 (Agilent, США) с использованием набора Agilent DNA 1000 Kit. Затем образцы непосредственно были секвенированы на приборе MiSeq (Illumina, США) с использованием реагентов MiSeq Reagent Kit v2 (300 циклов).

2.3.4. Биоинформатический анализ

По завершении секвенирования был осуществлен анализ данных в серии различных открытых биоинформатических программных обеспечений (ПО). Сначала все прочтения проходили стадию тримминга по качеству, а также удаление последовательностей праймеров в приложении bbmerge, в этом же ПО было выполнено объединение перекрывающихся парных прочтений и затем собранные контиги в формате FASTA были анализированы при помощи пакета MOTHUR [234, 235]. В ходе обработки из общего массива удалялись прочтения, соответствующие хлоропластам, митохондриям или ДНК эукариот. Также для всех последовательностей V4 была определена таксономия методом наивного Байесовского классификатора в приложении QIIME 2 с целью построения филогенетического дерева. Визуализация дерева была выполнена в онлайн приложении iTOL. После обработки 16S данных в пакете MOTHUR, результаты были импортированы в среду R. Визуализация полученных результатов в R была выполнена с использованием библиотек tidyverse, reshape, vegan, plyr, scales, ggcorrplot, devtools, ggbiplot и ggplot2 соответственно [236—238].

ЧАСТЬ 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ¹

3.1. Альгинат и поли-3-оксибутират

3.1.1. Штамм-продуцент

Методом анализа определения последовательности 16S рибосомальной РНК было подтверждено, что штамм из нашей коллекции принадлежит таксономическому виду *Azotobacter vinelandii* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MN977323.1>).

3.1.2. Синтез поли-3-оксибутирата и альгината в ПФЭ³

Динамика роста штамма *Azotobacter vinelandii* 12 в жидкой среде Берка в течение 72 часов заметно различалась среди восьми вариантов опыта в ПФЭ (Рис. 14).

¹ Основные результаты, изложенные в данной главе, опубликованы в следующих научных статьях автора в журналах, индексируемых в базах данных WoS, Scopus и RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова:

1. Akoulina E., **Dudun A.**, Bonartsev A., Bonartseva G., Voinova V. Effect of bacterial alginate on growth of mesenchymal stem cells // International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials. 2019. 68, 1-3, 115-118.
2. **Дудун А.А.**, Акулина Е.А., Воинова В.В., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Жуйков В.А., Бонарцев А.П., Бонарцева Г.А. Биосинтез альгината и поли(3-оксибутирата) бактериальным штаммом *Azotobacter agile* 12 // Прикладная биохимия и микробиология. 2019. 55, 6, 559- 565.
3. Volkov A.V., Muraev A.A., Zharkova I.I., Voinova V.V., Akoulina E.A., Zhuikov V.A., Khaydapova D.D., Chesnokova D.V., Menshikh K.A., **Dudun A.A.**, Makhina T.K., Bonartseva G.A., Asfarov T.F., Stamboliev I.A., Gazhva Y.V., Ryabova V.M., Zlatev L.H., Ivanov S.Y., Shaitan K.V., Bonartsev A.P. Poly(3-hydroxybutyrate)/hydroxyapatite/alginate scaffolds seeded with mesenchymal stem cells enhance the regeneration of critical-sized bone defect // Materials Science and Engineering: C. 2020. 114, 110991.
4. Акулина Е.А., Демьянова И.В., Жаркова И.И., Воинова В.В., Жуйков В.А., Хайдапова Д.Д., Чеснокова Д.В., Меньших К.А., **Дудун А.А.**, Махина Т.К., Бонарцева Г.А., Волков А.В., Асфаров Т.Ф., Иванов С.Ю., Шайтан К.В., Бонарцев А.П. Рост мезенхимальных стволовых клеток на матриксах на основе поли-3-оксибутирата, загруженных симвастатином // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2021. 1, 70-76.
5. **Dudun A.A.**, Akoulina E.A., Zhuikov V.A., Makhina T.K., Voinova V.V., Belishev N.V., Khaydapova D.D., Shaitan K.V., Bonartseva G.A., Bonartsev A.P. Competitive Biosynthesis of Bacterial Alginate Using *Azotobacter vinelandii* 12 for Tissue Engineering Applications // Polymers. 2022. 14, 1, 131.
6. Pryadko A.S., Mukhortova Y.R., Chernozem R.V., Pariy I., Alipkina S.I., Zharkova I.I., **Dudun A.A.**, Zhuikov V.A., Moisenovich A.M., Bonartseva G.A., Voinova V.V., Chesnokova D.V., Ivanov A.A., Travnikova D.Y., Shaitan K.V., Bonartsev A.P., Wagner D.V., Shlapakova L.E., Surmenev R.A., Surmeneva M.A. Electrospun magnetic composite poly-3-hydroxybutyrate/magnetite scaffolds for biomedical applications: composition, structure, magnetic properties, and biological performance // ACS Applied Bio Materials. 2022. 5, 8, 3999-4019.

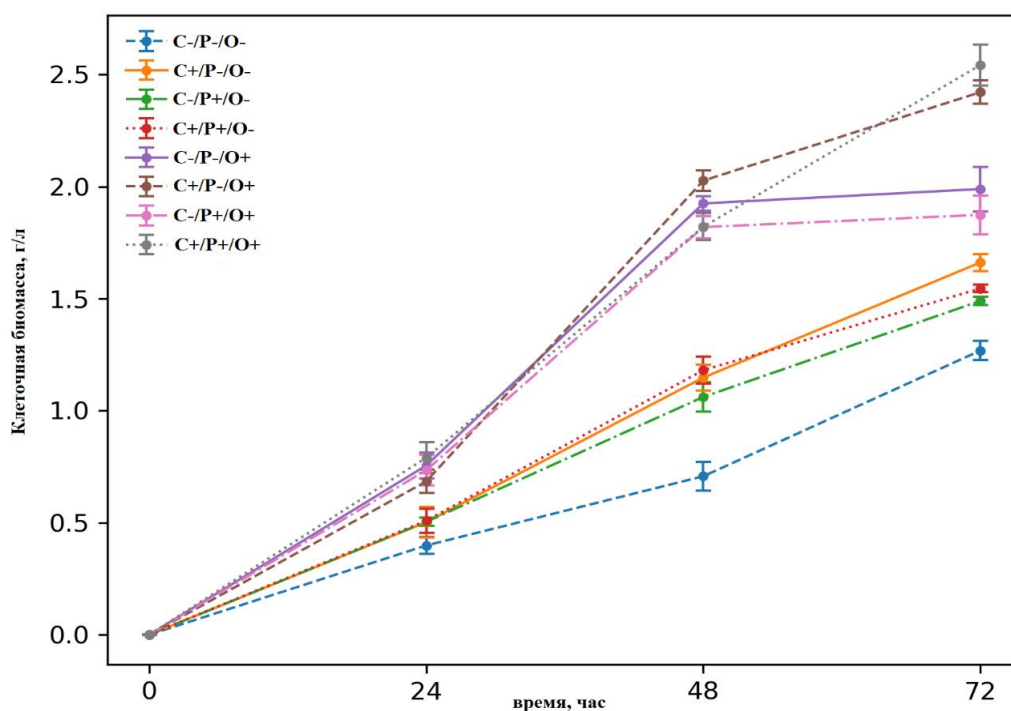


Рисунок 14. Динамика роста *Azotobacter vinelandii* 12 в ПФЭ 2³

Как видно из результатов, представленных на рисунке, можно провести четкую границу между экспериментами с низкой аэрацией (O-) и высокой аэрацией (O+). Эти результаты ярко показывают, что бактерии более активно растут при высоких концентрациях молекулярного кислорода, что связано с тем, что бактерии рода *Azotobacter sp.* являются строгими аэробами [63]. Из результатов также можно сделать вывод, что бактерии с высокой аэрацией и низкими значениями концентрации сахарозы не имеют достаточно источника углерода для постоянного экспоненциального роста и поэтому через 48 часов они переходят в стационарную фазу (C-/O+). Можно предположить, что из-за высокой скорости перемешивания качалочных колб (O+), использование углерода как основного источника роста бактерий увеличивается [239]. В работе Барреры и его коллег показано, что с увеличением уровня аэрации бактерии *A. vinelandii* начинают максимально потреблять углерод, 25% которого расходуется на биосинтез альгината [240]. Связи между концентрацией фосфатов в среде и ростом бактериальных клеток не наблюдали. Во многих исследованиях было показано, что ограничение фосфатов в

среде ингибирует рост и снижает выживаемость *Azotobacter sp.* [241, 242]. Цай с соавтр. также показал, что при дефиците фосфатов в питательной среде нарушается структура клеточной стенки и наблюдается неспособность образовывать цисты [243].

Данные по синтезу полимеров в конце ферментации в ПФЭ, также как и по динамике роста бактерий были разнородны.

Свободный альгинат, который синтезируется непосредственно во внеклеточное пространство [44] показал высокие значения синтеза в ПФЭ (Рис. 15), соответствующие высоким концентрациям сахарозы и доступности молекулярного кислорода (C+/O+).

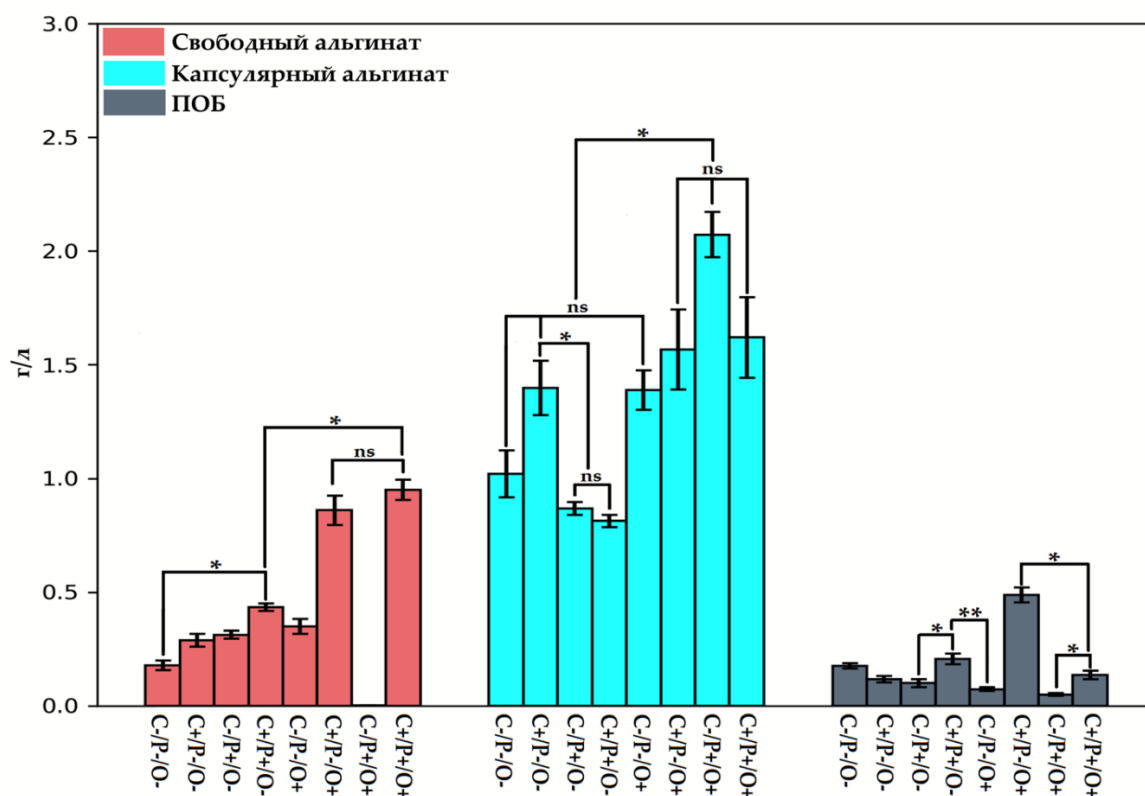


Рисунок 15. Общий выход свободного альгината, капсулярного альгината и ПОБ в ПФЭ 2³

Интересно отметить, что в работе Барреры с соавтр. молекулярная масса альгината при высокой аэрации увеличивалась с 800 до 2500 кДа за счет увеличения концентрации сахарозы в среде (с 5 г/л до 20 г/л) [244]. В наших экспериментах напротив общая доля свободного альгината, который обладает

низкой молекулярной массой [44], увеличивается при повышенных концентрациях кислорода и доступного источника углерода в среде. Эти результаты можно объяснить тем, что повышение концентрации растворенного кислорода увеличивает скорость потребления сахарозы бактериями *Azotobacter sp.* [245]. Таким образом можно предположить, что культивирование при высоких уровнях аэрации и концентрациях сахарозы (C+/O+) увеличивает скорость потребления сахарозы микроорганизмами и индуцирует максимальный синтез альгинат-лиаз [246], которые расщепляют альгинатные цепи, увеличивая тем самым долю низкомолекулярного «свободного» альгината в среде. Также стоит заметить, что максимальная активность лиаз достигается в логарифмическую фазу клеточного роста [246], что хорошо согласуется с нашими данными, так как логарифмическая фаза роста бактерий в вариантах (C+/P-/O+) и (C+/P+/O+) не переходила в стационарную на протяжении всего времени ферментации (Рис. 14).

Отдельно следует отметить, что результат эксперимента (C-/P+/O+), где низкие концентрации углерода, высокие концентрации фосфата и высокая аэрация в среде, наоборот, предотвращает и полностью нивелирует синтез свободного альгината и способствует синтезу высокомолекулярного капсулярного альгината (2,07 г/л), который образует капсулы вокруг бактериальных клеток (Рис. 15). По-видимому, фосфаты в среде Берка очень важны для образования капсул [243], которые состоят из высокомолекулярного альгината. Этот факт представляет большой биотехнологический интерес, поскольку здесь мы наблюдаем тот редкий случай, когда можно получить только высокомолекулярный капсулярный альгинат без примеси низкомолекулярного альгината.

Синтез ПОБ сильно отличался во всех 8 вариантах ПФЭ, но только сочетание высокой концентрации сахара и интенсивной аэрации способствовало эффективному синтезу биополимера (C+/P-/O+ — 0,49 г/л) (Рис. 15). Положительное влияние фактора сахарозы и кислорода для увеличения биосинтеза ПОБ хорошо согласуется со многими литературными источниками [247-251].

Из данных рисунка 15 можно видеть, что различные факторы или их комбинации во многом определяют синтез того или иного полимера. Данные ряда

исследований показали, что альгинат синтезируется бактериями *Azotobacter sp.* для образования цист (капсул). Этот механизм способствует устойчивости к высыханию колоний клеток при различных неблагоприятных условиях [53, 57, 63, 78]. В наших предыдущих работах было показано, что бактерии *Azotobacter sp.* синтезируют два типа альгината (свободный и капсулярный), которые различаются по физико-химическим свойствам [44, 220]. Повышенный синтез свободного альгината определялся увеличением источника углерода при высокой аэрации среды. Можно предположить, что в таких условиях концентрация растворенного кислорода увеличивается, что, в свою очередь, увеличивает активность ферментов альгинат-лиаз (*algL*, *alyA1*, *alyA2*, *alyA3* и *algE7*) и снижает экспрессию генов полимераз [245]. Для синтеза капсулярного альгината кислород является существенным фактором, поскольку капсулярный альгинат создает капсулу, защищающую бактериальную клетку от токсичных ионов металлов и от кислорода, ингибирующего активность нитрогеназного комплекса [44, 58].

Все варианты ПФЭ в продукции синтезируемых полимеров показали, что *A. vinelandii* 12 является преимущественно альгинат-продуцирующим штаммом, в особенности капсулярного альгината (Рис. 15). Выход капсулярного альгината во всех вариантах опыта колебался от 54% до 98%, минимальный выход капсулярного наблюдался в С+/Р-/О+ варианте, где концентрация фосфатов была на нижнем уровне. Таким образом можно заключить, что низкое содержание фосфатов в среде, ограничивало синтез капсулярного альгината. Фосфаты являются важным компонентом для создания капсул вокруг бактериальных колоний [243], тем самым недостаток фосфатов не позволяет продуцировать капсулярный альгинат в нужном количестве для создания плотных капсул вокруг клеточных стенок. Вариант С-/Р+/О+ показал, что почти весь источник углерода (98%) расходуется на синтез капсулярного альгината, только два процента расходуется на ПОБ. Поскольку фосфаты являются основными энергетическими молекулами для всех живых организмов, особенно для аэробов, к которым относится *Azotobacter vinelandii* 12, снижение содержания фосфатов грозит резкими изменениями в клеточном метаболизме. Ограничение фосфатов снижает соотношение аденозин-5'-

трифосфата (АТФ) к аденозин-5'-дифосфату (АДФ) [243]. Можно сделать вывод, что дыхательная активность бактериальных клеток также снижается [58], поскольку окислительное фосфорилирование является основным процессом синтеза АТФ. Предположительно, именно снижение бактериального дыхания может быть связано с изолированным синтезом капсулярного альгината в варианте (С-/Р+/О+), поскольку защита нитрогеназного комплекса осуществляется за счет нескольких механизмов [58]. Первый защитный механизм — это высокая респираторная активность клеток. При таком клеточном дыхании кислород удаляется с поверхности клетки, не достигая нитрогеназ [252, 253]. Вторым защитным механизмом является создание плотных капсул из капсулярного альгината, при этом бактериальным клеткам не хватает ресурсов для синтеза свободного альгината.

Малое количество ПОБ в варианте (С-/Р+/О+) ПФЭ связано с наличием большого количества капсулярного альгината. Так Реуш с коллегами показал, что липидный профиль и количество ПОБ при образовании капсул достигает своего пика, а затем падает до минимальных значений при созревании капсул вокруг бактерий [254].

Таким образом, можно сделать вывод о том, что при определенных ферментационных условиях в варианте (С-/Р+/О+) был достигнут синтез только капсулярного альгината, то есть варьируя параметры ферментации, мы можем регулировать синтез ПОБ и альгинатов культурой *Az. vinelandii* 12, подавлять полностью синтез одного из них и достигать максимального выхода другого полимера.

3.1.3. Физико-химические характеристики поли-3-оксибутирата и альгинатов

Результаты физико-химических исследований показали большие различия по молекулярной массе (ММ) между свободными и капсулярными альгинатами: свободные альгинаты во всех опытах (за исключением (С-/Р+/О+) ввиду отсутствия синтеза полимера) имели массу в районе 100-110 kDa, в тоже время

капсулярный значительно различался между разными опытами в ПФЭ и также имел более высокую ММ сравнительно с свободным альгинатом (Таблица 2 и Рис. 16).

Таблица 2. Молекулярные массы (ММ) свободных альгинатов, капсулярных альгинатов и ПОБ в ПФЭ (2^3)

ПФЭ	Свободный альгинат (kDa)	Капсулярный альгинат (kDa)	ПОБ (kDa)
C-/P-/O-	113 ± 3	333 ± 17	1692 ± 28
C+/P-/O-	103 ± 3	212 ± 15	1296 ± 15
C-/P+/O-	106 ± 5	425 ± 34	1225 ± 9
C+/P+/O-	100 ± 2	574 ± 19	1698 ± 33
C-/P-/O+	98 ± 4	438 ± 23	331 ± 9
C+/P-/O+	110 ± 3	392 ± 9	1645 ± 30
C-/P+/O+	0	408 ± 12	49 ± 2
C+/P+/O+	104 ± 5	463 ± 36	1374 ± 21

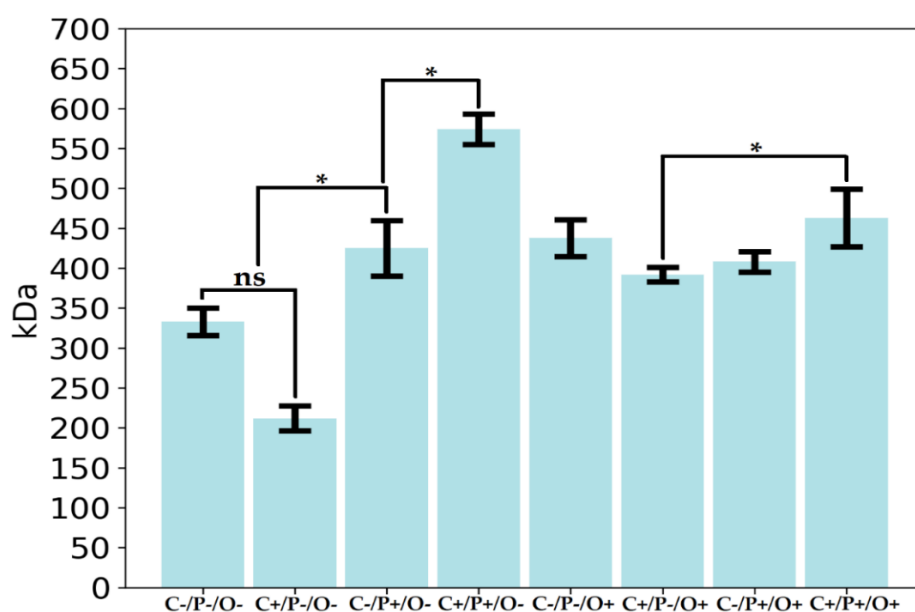


Рисунок 16. Молекулярные массы (ММ) капсулярных альгинатов в ПФЭ (2^3)

Вариант при высокой концентрации углерода и низких фосфатах с кислородом в среде (C+/P-/O-) имеет самую низкую ММ среди всех опытов в ПФЭ — 212 кДа, а опыт с выращиванием культуры при высоком углероде с фосфатами и низком уровне аэрации (C+/P+/O-) обладает самой высокой ММ — 574 кДа. Отсюда следует, что фосфаты имеют определяющую роль для синтеза высокомолекулярного капсулярного альгината. Влияние низкого уровня аэрации для полимеризации альгинатной цепи с большой ММ также подтверждается в работе Лозано, где синтез альгината с максимальной ММ (550 кДа) был достигнут при сниженных показателях скорости передачи кислорода (OTR) [255]. Данные по влиянию уровня сахарозы на ММ капсулярного альгината при сравнении вышеприведенных вариантов показали минимальную и максимальную ММ альгината при высокой концентрации сахарозы в обоих вариантах, то есть ограничение содержание фосфатов в среде при избытке источника углерода является определяющим фактором при полимеризации альгинатной цепи [244].

Исследование ММ ПОБ в ПФЭ показал неоднородные результаты (Таблица 2). Все полимеры показали ММ свыше 1200 кДа за исключением опыта (C-/P-/O+) (331 кДа) и (C-/P+/O+) (49 кДа). По-видимому, сочетание высокой аэрации и низкий уровень сахарозы в среде для синтеза высокомолекулярного ПОБ является критичным. Это также подтверждается тем, что бактерии *A. vinelandii* 12 именно в этих опытах после 48 часов вступают в стационарную фазу (Рис. 14). Из работ известно, что ММ ПОБ изменяется при переходе из экспоненциальной в стационарную фазу [256]. Так в момент экспоненциального роста бактерий, ММ ПОБ за счет высокой экспрессии гена *PhbC*, транслирующей ПОБ-синтазу, увеличивается и в момент вступления бактериальных клеток в стационарную фазу, начинается активная экспрессия гена деполимеразы (*PhbZ*), участвующий в разложении ПОБ и тем самым ММ снижается [256].

По данным ИК-спектров бактериальных альгинатов во всех опытах мы можем определить мономерный состав полимера по M/G и уровень ацетилирования. Из данных Рис. 17А видно, что спектры альгината имели полосы поглощения различной интенсивности при 1600 см^{-1} (COO^-), 1720 см^{-1} (COCH_3),

1030 cm^{-1} (CO), 1254 cm^{-1} (COOR), 816 cm^{-1} (M-блоки) и 785 cm^{-1} (G-блоки) [64]. Полос поглощения, соответствующим белкам и нуклеиновым кислотам не обнаружено, что говорит о высокой чистоте полученных полимеров.

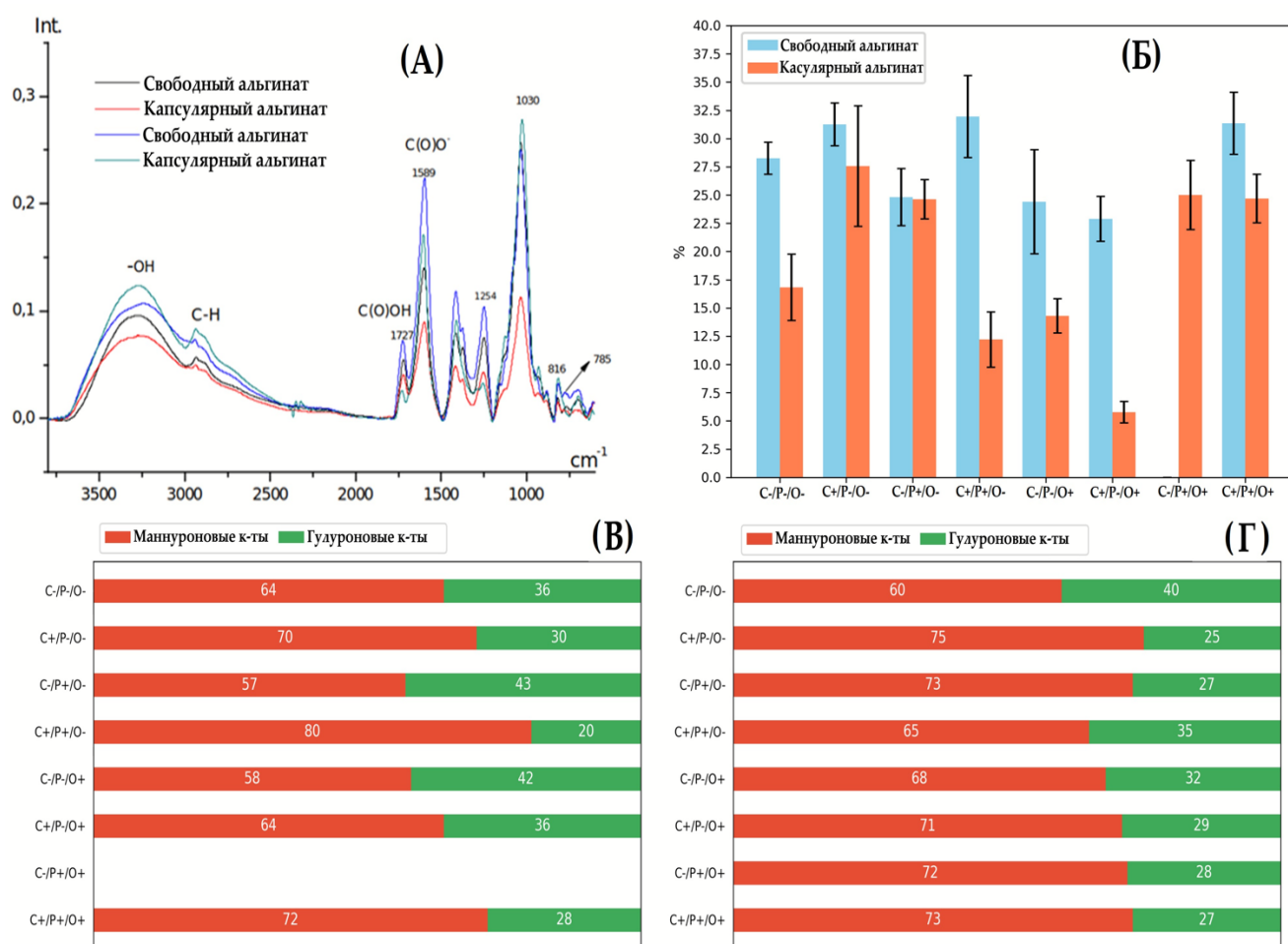


Рисунок 17. Физико—химические свойства бактериальных альгинатов. (А) — спектры поглощения свободных и капсулярных альгинатов. (Б) —уровень ацетилирования свободных и капсулярных альгинатов и (В, Г) — М/Г состав свободных и капсулярных альгинатов

Соотношение маннуроновых и гулурановых кислот в альгинатной цепи определялось по отношению полосы 816 cm^{-1} , которая показывает валентное колебание пиранозного кольца маннуронов (М) к полосе поглощения в области 785 cm^{-1} , соответствующая гулурановой кислоте (G) [257]. Процентные соотношения М/Г альгинатной цепи во всех опытах ПФЭ 2³ свободных альгинатов и капсулярных альгинатов показаны на Рис. 17В и Г, соответственно.

Распределение уроновых кислот свободных и капсулярных альгинатов показало, что во всех образцах преобладают маннуриновые блоки в цепи. В настоящий момент мало исследований проведено по влиянию различных факторов культивирования бактерий на распределение M/G. Большая часть работ в этой области посвящены функциям C5-эпимераз [258, 259]. Для бактерий *A. vinelandii* известно 7 ферментов (*AlgE1-AlgE7*), ответственных за эпимеразную активность. Среди этих эпимераз только *AlgE1* обладает ярко-выраженным действием создавать длинные поли-G блоки из поли-M блоков. Такая активность очень важна в создании сильных и прочных альгинатных гидрогелей [258]. Поэтому для оценки влияния факторов среды на распределение уроновых кислот синтезированных альгинатов желательны дополнительные транскриптомные и протеомные исследования по продуктам генов C5-эпимераз бактерии *A. vinelandii* 12.

Уровень ацетилирования определяли по соотношению полос 1600 см^{-1} к 1720 см^{-1} . Известно, что полосы 1030 см^{-1} и 1254 см^{-1} также показывают сигналы полос поглощения ацетильных групп [64]. Результаты уровня ацетилирования свободных и капсулярных альгинатов отображены на Рис. 17Б, соответственно.

Из полученных данных можно видеть, что количество ацетильных групп на маннуриновых остатках свободных альгинатов во всех вариантах опытов различается незначительно (23-32 %) и выше в сравнении с капсулярными (6-27%). Это может определяться не только особенностью свободных альгинатов, но и быть связано с дополнительной обработкой биомассы раствором NaCl с ЭДТА при выделении капсулярного альгината.

По результатам данных спектров поглощения капсулярных альгинатов можно видеть значительный разброс в различных вариантах ПФЭ по уровню ацетилирования. Стоит заметить, что вариант (C+/P-/O+) показал самый низкий уровень ацетилирования (Рис. 17Б) и одновременно с этим максимальный выход ПОБ (Рис. 15). И наоборот, высокий уровень ацетилирования (25%) и почти полное отсутствие синтеза ПОБ (0.027 г/г , $\text{MM} = 49\text{ кДа}$) наблюдался в варианте (C-/P+/O+). Известно, что ацетил-КоА является донором ацетила для ацетилирования альгината, и одновременно является предшественником ПОБ [260]. К

аналогичному выводу пришли и Баррера с соавт., которые считают, что в условиях уровня аэрации у бактерий *Azotobacter vinelandii* ацетил-КоА в большей степени расходуется на ацетилирование альгината, чем на синтез ПОБ [261]. В нашем случае, помимо аэрации были задействованы факторы сахарозы и фосфатов, где как раз между вариантами (С+/Р-/О+) и (С-/Р+/О+) были различия в концентрации сахарозы. А как ранее было отмечено, что для ПОБ уровень сахарозы в ростовой среде является определяющим показателем его синтеза [250, 251]. Таким образом, можно заключить, что снижение концентрации сахарозы и увеличение уровня аэрации напрямую переключает потоки ацетил-КоА из цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) с синтеза ПОБ [83] на ацетилирование маннуроновых остатков альгинатов.

Важно отметить, что вариант (С-/Р+/О+), в котором мы наблюдаем только капсулярный альгинат, имеет высокое ацетилирование (25%), поэтому мы можем предполагать, что в этих условиях *A. vinelandii* 12 может синтезировать избирательно (без ПОБ и свободного альгината) альгинат высокой молекулярной массы, М/Г = 70/30 и с высоким уровнем ацетилирования, что может быть важно для многих биомедицинских задач.

Химическая структура ПОБ была подтверждена методом ¹Н-ЯМР (Рис. 18).

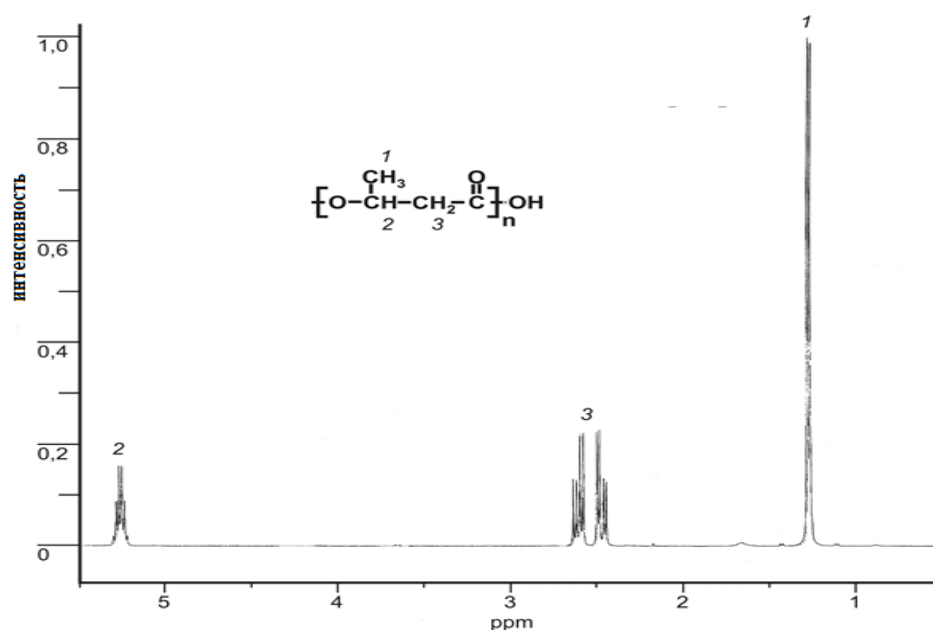


Рисунок 18. ¹Н—ЯМР спектр бактериального ПОБ *A. vinelandii* 12: 1 — CH₃ — группа, 2 — CH-группа и 3 — CH₂ — группа

Анализ спектров ^1H -ЯМР показал, что боковую метильную группу отображает только выраженный пик при 1.27 ppm. Полимер является гомополимером, который состоит только из мономеров 3-гидроксимасляной кислоты [44].

Данные по термогравиметрии показывают информацию о влажности и зольности полимеров. Скорость нагрева оказывает серьезное влияние на разрешение кривой ТГ. Этот параметр является фундаментальным для термогравиметрического исследования [262, 263]. Данное исследование проведено при стабильной скорости нагрева 10 °С/мин. На Рис. 19 показаны результаты термического поведения разложения избранных бактериальных альгинатов и ПОБ. Также термогравиметрическому анализу был подвергнут альгинат из водорослей в качестве контрольного образца.

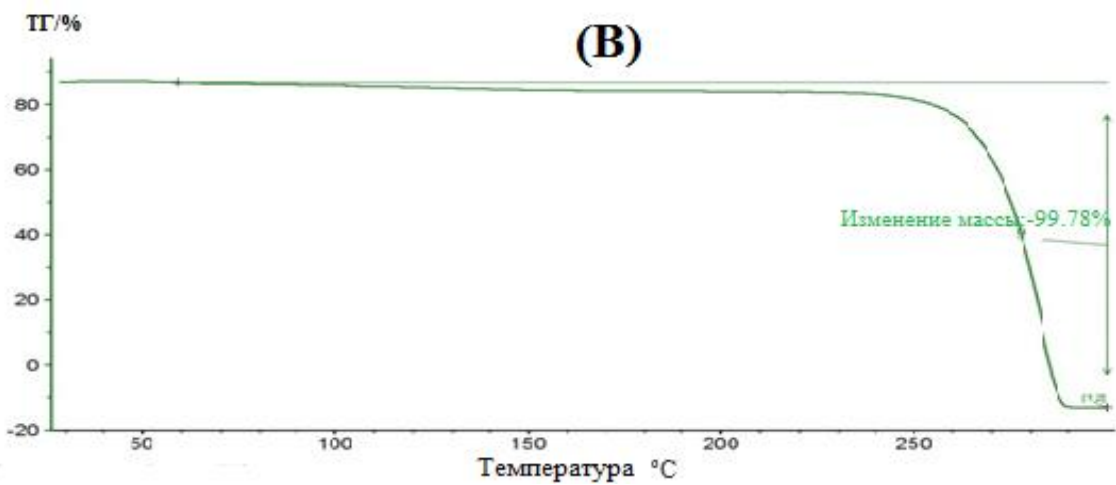
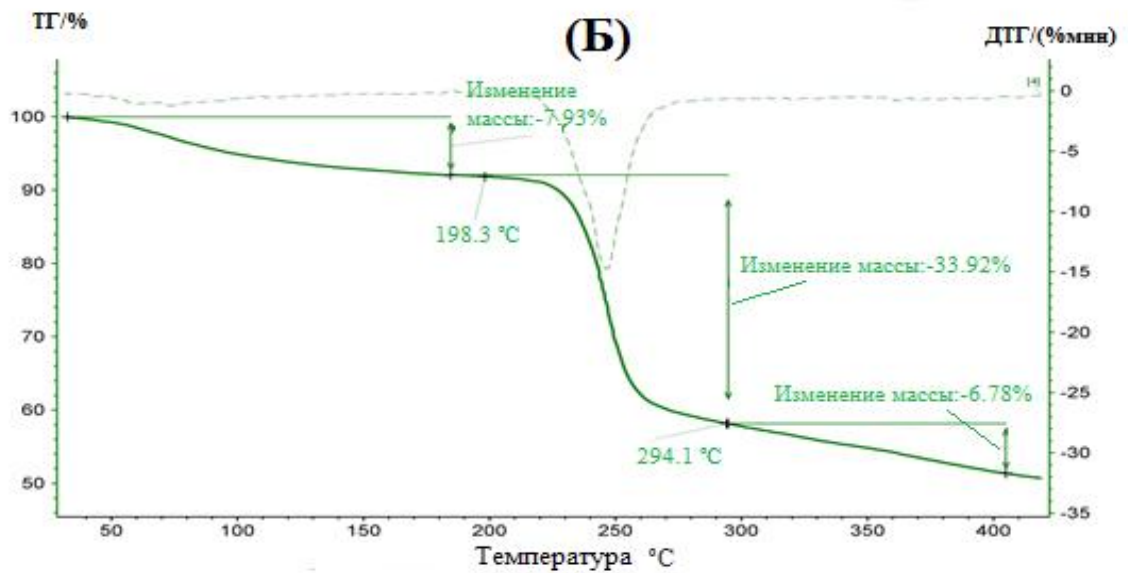
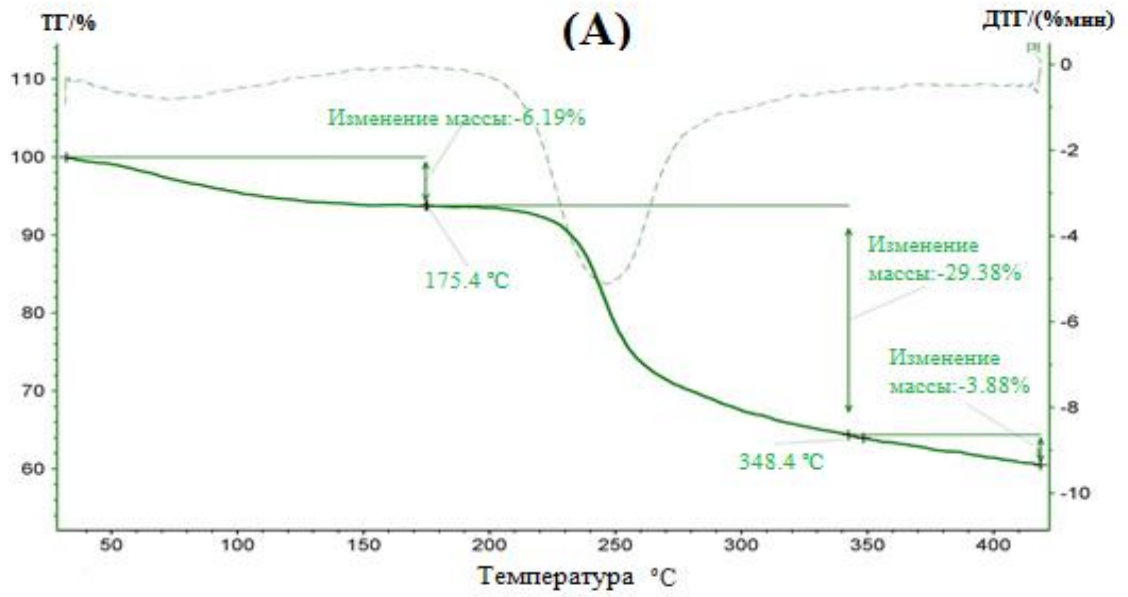


Рисунок 19. Кривые ТГ. Бактериальный капсулярный альгинат (А), альгинат из водорослей (Б) и бактериальный ПОБ (В)

Для ТГА бактериальных альгинатов был выбран капсулярный альгинат, синтезированный при высоких концентрациях сахарозы с фосфатами и низкого уровня аэрации, так как по результатам физико-химических свойств данный полимер демонстрировал самую высокую ММ и хорошее М/Г распределение.

Кривые ТГ в воздушной атмосфере для альгинатов имели три стадии потери массы: первая связана с дегидратацией, а следующие две – с разложением органического вещества до образования углеродистого остатка [44]. Первая стадия характеризовала дегидратацию (потеря массы в диапазоне от 6 до 8%) при температуре нагревания от 20 до 200°C. Вторая стадия показывала эндотермический процесс разложения полимера (от 30 до 35%) при температуре от 200 до 300°C. Последняя стадия сопровождалась вторым разложением с низкой потерей массы (от 4 до 7%) в диапазоне температур от 325 до 450°C [44]. Капсулярный альгинат демонстрировал более крутой эндотермический пик в сравнении с водорослевым альгинатом. Вероятно, это можно объяснить наличием более высокой ММ у капсулярного альгината (574 кДа) в сравнении с альгинатом водорослей (“Sigma Aldrich”, Германия; 120-180 кДа).

ПОБ имел только одну стадию разложения при температурах от 220 до 330°C с низкой потерей массы (1.25%) на стадии дегидратации (Рис. 19В) [44].

3.1.4. Многомерный дисперсионный анализ полного факторного эксперимента

Исследование влияния значимости трех факторов, а именно сахарозы, фосфатов и уровня аэрации и их взаимодействий в ПФЭ 2³ было проведено методом трехмерного дисперсионного анализа (ANOVA). Для оценки влияния данных факторов были выбраны три независимые переменные: выход свободного альгината, выход капсулярного альгината и выход ПОБ (Рис. 20). Значение *p*-value менее 0,05 указывало на то, что модель с указанными факторами оказалась значимой при уровне достоверности 95% (Таблица 3) [264].

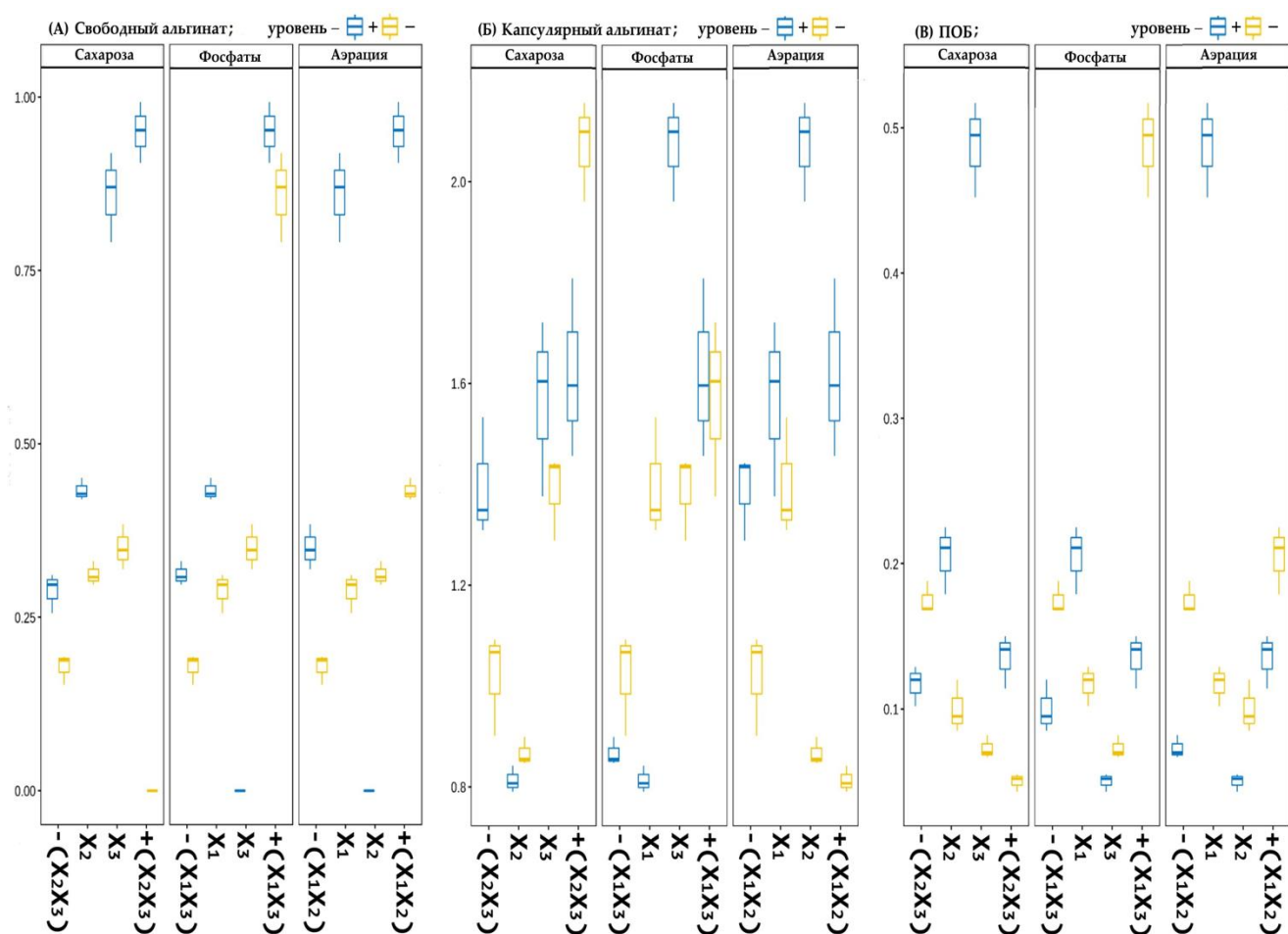


Рисунок 20. ПФЭ 2^3 для синтеза свободного альгината (А), капсулярного альгината (Б) и ПОБ (В)

На рисунке 20 отображен график синтеза всех полимеров бактерии *A. vinelandii* 12 в виде боксплотов, который показывает, что наибольшее влияние на синтез всех биополимеров оказывала скорость перемешивания бактериальной культуры в качалочных колбах (уровень аэрации). Согласно таблице 3, в порядке ортогональных переменных к общему синтезу полимеров, в соответствии с значениями F-value и p-value, по значимости факторы расположились в таком порядке: X_3 (аэрация) > X_1 (сахароза) > X_2 (фосфаты). Следует отметить, что только фактор аэрации (X_3) был значимым ($p < 0,05$) для синтеза всех полимеров, тогда как фактор сахарозы (X_1) оказался незначимым для синтеза капсулярного альгината, а фактор концентрации фосфатов (X_2) был незначим для синтеза альгинатов обоих типов (Таблица 3).

Таблица 3. Дисперсионный статистический анализ (ANOVA) биополимеров в ПФЭ 2³. Значимость индивидуальных факторов и их взаимодействий представлены в виде звездочек: не значимо – NC; * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$ и *** – $p < 0.001$

Свободный альгинат				
Факторы	Ср. квадрат	F-value	p-value	Значимость
Сахароза (X ₁)	1.07	950.52	1.12e-15	***
Фосфаты (X ₂)	0.0001	0.12	0.73	NC
Аэрация (X ₃)	0.34	299.37	8.82e-12	***
X ₁ X ₂	0.08	67.61	3.88e-07	***
X ₁ X ₃	0.57	502.09	1.65e-13	***
X ₂ X ₃	0.11	96.57	3.50e-08	***
X ₁ X ₂ X ₃	0.0690	61.18	7.42e-07	***
Капсулярный альгинат				
Сахароза (X ₁)	0.0009	0.07	0.79	NC
Фосфаты (X ₂)	0.00	0.00	1.00	NC
Аэрация (X ₃)	2.44	183.52	3.49e-10	***
X ₁ X ₂	0.42	31.83	3.68e-05	***
X ₁ X ₃	0.13	10.02	0.00599	**
X ₂ X ₃	0.81	61.32	7.31e-07	***
X ₁ X ₂ X ₃	0.01	1.13	0.30	NC
ПОБ				
Сахароза (X ₁)	0.11	327.24	4.47e-12	***
Фосфаты (X ₂)	0.04	144.12	2.05e-09	***
Аэрация (X ₃)	0.01	24.28	0.000151	***
X ₁ X ₂	0.01	30.50	4.63e-05	***
X ₁ X ₃	0.07	224.44	7.79e-11	***
X ₂ X ₃	0.06	165.50	7.46e-10	***
X ₁ X ₂ X ₃	0.09	265.82	2.18e-11	***

Важность аэрации, как главного фактора, объясняется тем, что при разных уровнях аэрации будет изменяться и количество растворенного кислорода в среде, что, в свою очередь, изменяет активность клеточного дыхания бактерий *A.*

vinelandii [265]. Такого рода модификации сопровождаются изменением активности нитрогеназного комплекса у бактерий. Они активируют различные нитрогеназные системы защиты от окисления кислородом, одним из протекторов которых является альгинат [58].

Взаимодействие факторов в ПФЭ 2^3 было также подсчитано методом дисперсионного анализа и результаты представлены в Таблице 3. Взаимодействия факторов при синтезе свободного альгината показали сильное влияние во всех случаях и были расположены в следующем порядке: $X_1X_3 > X_2X_3 > X_1X_2 > X_1X_2X_3$. Стоит отметить особенно сильное взаимодействие факторов сахарозы и аэрации (F-value = 502,09). Ранее по данным биосинтеза полимеров уже было отмечено, что положительные значения концентрации углерода и уровня аэрации (C+/O+) индуцируют продукцию свободного альгината до максимальных значений. В работе Флореса было показано, что максимальный синтез свободного низкомолекулярного альгината происходит в условиях повышенной концентрации растворенного кислорода в среде за счет высокого уровня аэрации (X_3), что в свою очередь увеличивает удельную скорость потребления различных источников углерода, в данном случае сахарозы (X_1) [220]. Таким образом можно сказать, что взаимодействие двух данных факторов имеет синергический эффект на синтез свободного альгината, так как при увеличенной скорости потребления углерода бактериями *Azotobacter vinelandii* 12 ускоряется общий метаболизм клеток и тем самым активируется синтез ферментов альгинат-лиаз, ответственных за разрыв альгинатных цепей.

Взаимодействия факторов при синтезе капсулярного альгината показали, что взаимодействие всех факторов ($X_1X_2X_3$) не было статистически значимым (p – value = 0,3). Интересно, что изолированный эффект фосфатов не был значительным для продукции капсулярного альгината, но его взаимодействие с кислородом (X_2X_3) и сахарозой (X_1X_2) показало самое сильное влияние на выход капсулярного альгината (Таблица 3), необходимого для образования капсул с целью защиты нитрогеназного комплекса от кислорода. В работе Цая с сотр. также показано, что фосфаты играют важную роль в синтезе альгинатов. Образование

цист, которое формируется в основном из альгината, не происходило без участия данного компонента [243].

Результаты дисперсионного анализа по синтезу ПОБ показали, что все комбинации факторов вносят существенный вклад в систему (p – value < 0,05). Наиболее сильный отклик на синтез ПОБ показало одновременное взаимодействие всех трех факторов ($X_1X_2X_3$, F – value = 265,82). Эти данные показывают, что осуществляемый клетками процесс накопления ПОБ регулируется большим количеством сигнальных молекул и регуляторных белков, которые, в свою очередь, взаимодействуют с кластером генов синтеза ПОБ [266]. Каждый из трех факторов (сахароза, фосфат и аэрация) может индуцировать экспрессию генов, которые могут действовать как ингибиторы, так и активаторы локуса *pha* на транскрипционном (транскрипционные факторы) или посттранскрипционном (сРНК) уровне [267, 268].

3.1.5. Реологические свойства альгинатного гидрогеля

Во многих исследованиях механических свойств различных альгинатов было показано, что альгинаты с высокой ММ и высоким содержанием гулурановых остатков в альгинатной цепи создают более плотные гидрогели [269, 270]. По результатам наших исследований в ПФЭ только капсулярные альгинаты имели высокую молекулярную массу. Свободные альгинаты во всех восьми экспериментах имели среднюю молекулярную массу в диапазоне 100 кДа; гелеобразование альгинатов с такой низкой молекулярной массой сопровождается ограничением в создании гидрогелей на их основе. Для создания гидрогелей на основе свободных альгинатов, которые бы подходили для реометрических исследований, концентрация CaCl_2 и самого полимера должна быть выше, и как показано на Рис. 15, штамм *Azotobacter vinelandii* 12 имеет тенденцию продуцировать больше капсулярного альгината, чем свободного.

Для изучения реологических свойств капсулярных альгинатов по результатам ММ и ИК-спектроскопии были отобраны альгинаты С+/Р-/О- с наименьшей ММ и альгинат С+/Р+/О- с наибольшей ММ. В качестве контроля

был выбран коммерческий альгинат водорослей со средней ММ 120—180 кДа (Sigma-Aldrich, Германия).

На основании результатов динамической вязкоупругости альгинатов, представленных на рисунке 21, было обнаружено, что капсулярный альгинат с высокой молекулярной массой (574 кДа) образует гидрогели наивысшей плотности. Модуль накопления (G') показывает отношение приложенного напряжения к гелю в фазе с деформацией к величине этой деформации. Этот показатель напрямую коррелирует со способностью альгината образовывать ионотропные сети остатков гулурановой кислоты с кальцием, тем самым показывая общее количество сшивок Ca-Gul [271].

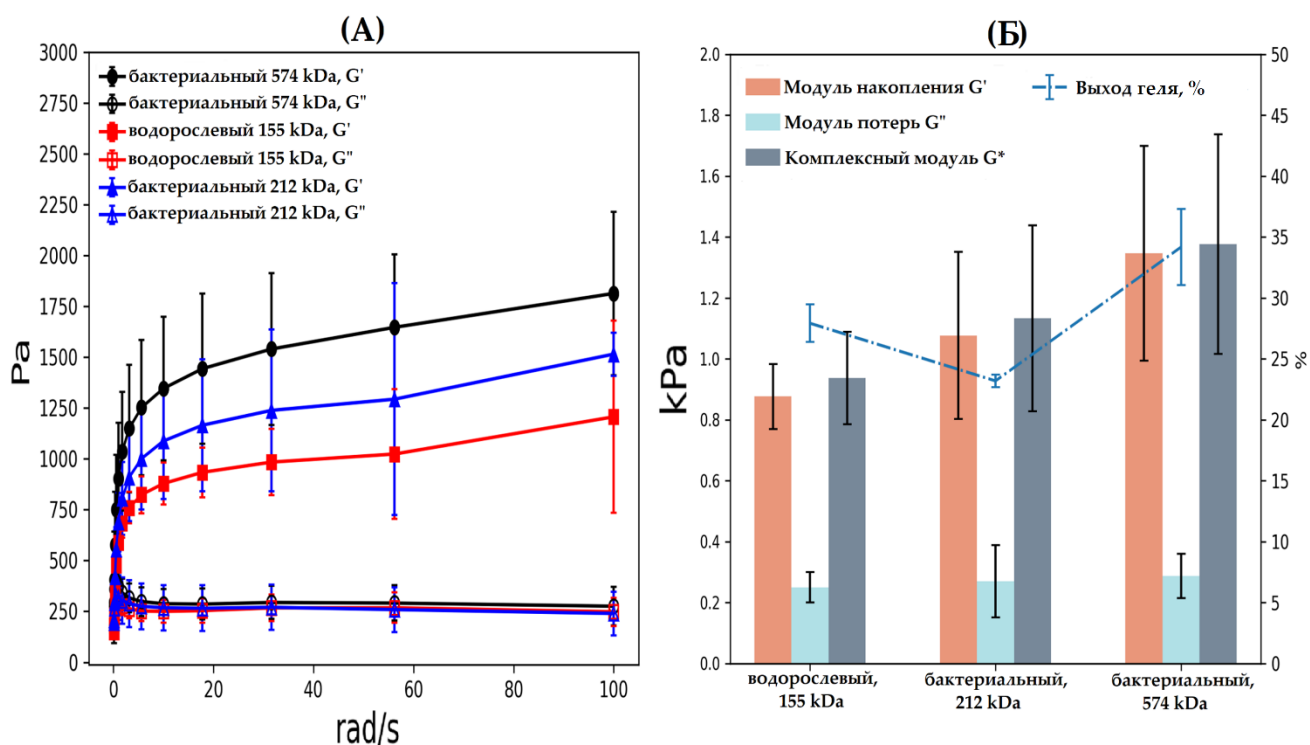


Рисунок 21. А) Частотные измерения вязкоупругости альгинатных гидрогелей. Б) Корреляция полученных результатов вязкоупругости при 10 рад/с с общим выходом альгината после гелеобразования

На Рис. 21А представлен график частотных измерений альгинатных гидрогелей с различными физико-химическими свойствами и различным происхождением полимера (водорослевым и бактериальным). Из представленных на рисунке 21А данных можно видеть, что прочность гидрогелей исследованных

альгинатов кальция (бактериального 212 кДа и 574 кДа и водорослевого 155 кДа) не имеет линейной зависимости от ММ. Нелинейная зависимость между прочностью гидрогеля и добавлением кальция обусловлена различными видами ионотропных сшивок между альгинатными цепями [272]. При высоком содержании ионов натрия в альгинатном растворе происходит лишь частичное замещение натрия на ионы кальция, что приводит к низкой плотности сшивки [273]. Кроме того, случайный характер расположения гулурановых мономеров в цепи не позволяет создавать плотные гомогенные гели из-за образования сильно сшитых и отдельно агрегированных областей внутри гидрогеля [274, 275]. Такие альгинаты кальция приводят к агрегации частиц с пониженной общей силой 3-мерной ионной сети [272, 276]. При уменьшении частоты всех трех полимеров до 0,1 рад/с видно, что модуль потерь (G''), который показывает ту часть энергии, которая уходит в тепло за один период колебаний, становится больше, чем G' ($G' < G''$). Такие данные указывают на то, что наши полимеры ведут себя в таких условиях больше, как жидкости, чем твердые тела.

Результаты реологических данных при постоянной частоте (10 рад/с) и выход полимера не имели прямой зависимости (Рисунок 21Б). Хотя средние значения комплексного модуля (G^*), который рассчитывается из G' и G'' , различны для всех полимеров, нельзя с уверенностью сказать, что есть различия между тремя образцами согласно однофакторному дисперсионному анализу ($p > 0,05$). Однако выход полимера при гелеобразовании альгината был различным для всех трех образцов (Рис. 21Б).

Капсулярный альгинат с высокой ММ (574 кДа) имеет самый высокий выход полимера при смешивании растворов альгината и хлорида кальция, хотя результаты не являются линейными, существует прямая корреляция между образованием гидрогелей альгината кальция и ММ ($r = 0,83$). Хаотичное ионотропное связывание остатков гулурановой кислоты в полимерах приводит к нелинейному увеличению выхода образующегося гидрогеля из альгинатов с разной ММ. Капсулярный альгинат с низкой молекулярной массой (212 кДа) имеет самый низкий выход полимера (23,19%) в первую очередь из-за небольшого

количества гулурановых мономеров в цепи ($M/G = 75/25$), поэтому можно предположить, что ММ и М/Г содержание являются лимитирующими параметрами при создании гидрогелей. Высокий выход полимера во время гелеобразования важен для многих биомедицинских задач таких как в лечении эндоваскулярных окклюзий [227] или экранирование раневых поверхностей [277, 278].

3.1.6. Водопоглощение бактериальных поли-3-оксибутирата и альгинатного гидрогеля

Результаты теста по водопоглощению показали некоторые различия в отношении водопоглощения или набухания между капсулярным альгинатом с ММ = 574 кДа и двумя другими полимерами, а именно, альгинатом водорослей и капсулярным альгинатом с ММ = 212 кДа (Рис. 22).

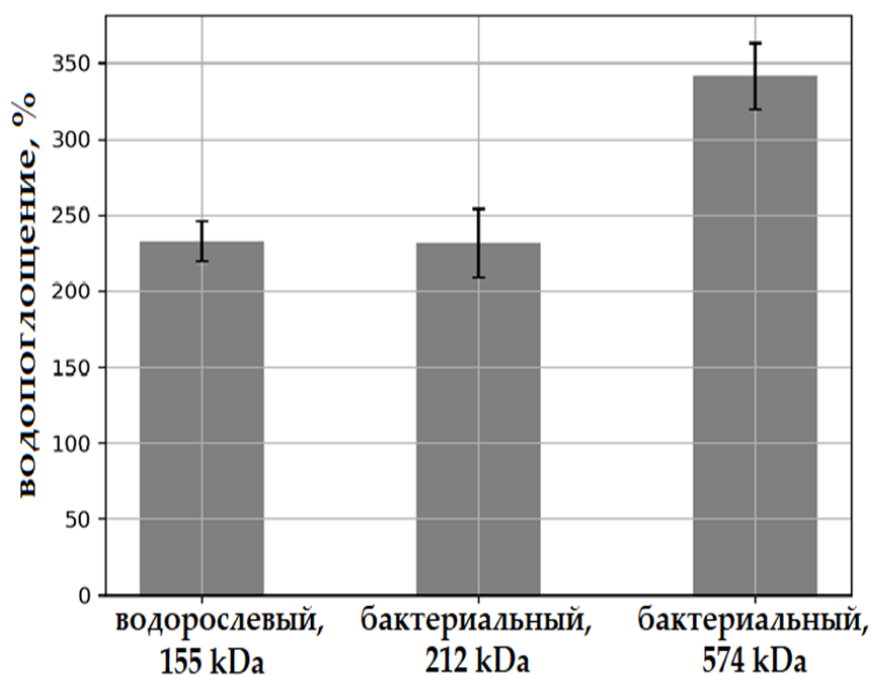


Рисунок 22. Водопоглощение водорослевого и бактериальных альгинатов кальция

Более высокая степень набухания капсулярного альгината из четвертого варианта ПФЭ (С+/Р+/О-) была достигнута за счет высокой молекулярной массы.

Из-за более высокой молекулярной массы данный альгинат кальция создает больше точек сшивания гулурановых остатков с ионами кальция в первичной альгинатной цепи, тем самым создавая более обширную полимерную сеть для проникновения молекул воды [271]. Кроме того, удлинение альгинатных полисахаридных цепей способствует образованию более плотных гидрогелей, за счет увеличения количества швов и переплетений полимерных цепей [279].

Водопоглощение бактериального ПОБ показало всего 1.2%, причина такого низкого водопоглощения объясняется гидрофобной природой полимера [44, 280].

3.1.7. Тест на цитотоксичность альгинатного гидрогеля

Гидрогели альгината кальция были протестированы на цитотоксичность с целью будущего использования бактериального полимера для применения *in vivo* в тканевой инженерии (Рис. 23).

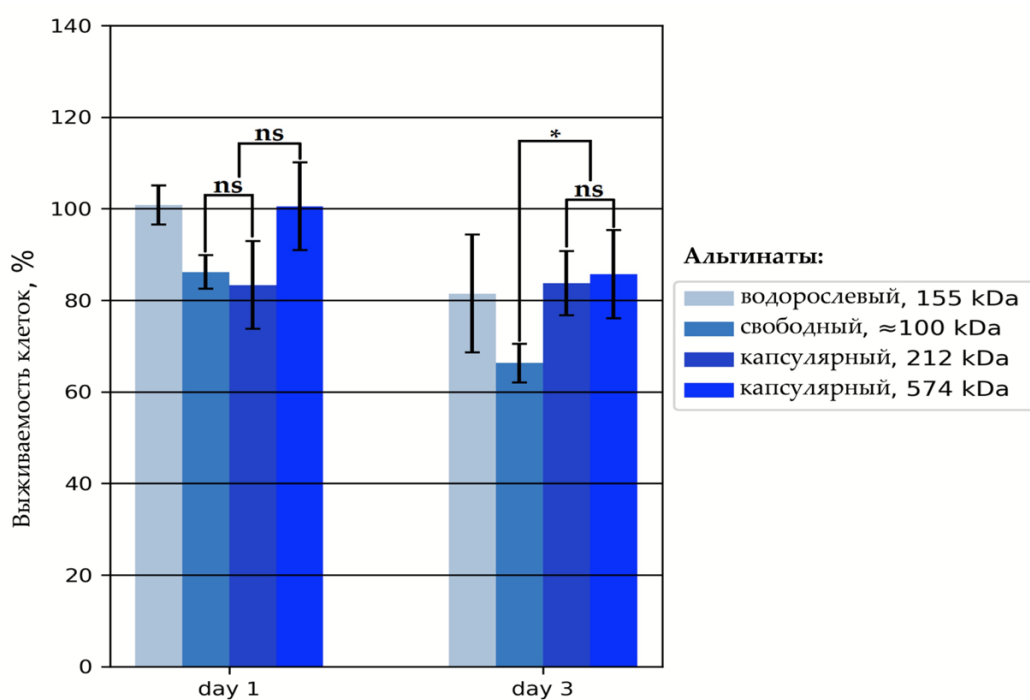


Рисунок 23. Оценка цитотоксичности на основе жизнеспособности МСК.

Жизнеспособность клеток в процентах рассчитывали относительно отрицательного контроля (НК)

Данные по водорослевому и капсулярному альгинатному гидрогелю ММ = 574 кДа не показывали наличие цитотоксичности к МСК и были сопоставимы с

контролем через 24 часа. На третьи сутки роста клеток все альгинаты (водорослевый, капсулярный ММ = 212 кДа и капсулярный ММ = 574 кДа) проявляли незначительную токсичность по отношению к МСК за исключением свободного альгината, в котором количество жизнеспособных клеток оказалось менее 70%. На данный момент имеется мало информации о влиянии ММ альгинатов на цитотоксичность и биосовместимость. На основании этих данных можно предположить, что наиболее выраженное токсическое действие на клетки оказывают альгинаты с наименьшей молекулярной массой.

3.2. Кишечная микробиота

Наша работа показывает влияние эндопротезирования биополимерной конструкции в толстый кишечник крысам линии Wistar и таким образом становится возможно определить, какие бактерии, а именно какие таксономические операционные единицы (ОТЕ) вносят вклад в регенерацию кишечной ткани или в развитие воспалительных реакций.

Общий массив при фильтрации данных, количество прочтений после обрезки и демультимплексирования, а также удаления контаминаций (митохондриальной, хлоропластной и эукариотич. ДНК) уменьшилось более чем в два раза.

По результатам кластеризации последовательностей с дистанцией менее 3% (97% идентичности) было получено 86594 ОТЕ, из них 1044 встречались во всем массиве данных более 5 раз. После проведения *in silico* деконтаминации с использованием информации о последовательностях, полученных по результатам секвенирования отрицательных контролей, осталось 650 ОТЕ.

Для удобства все эти суммарные данные представлены в виде филогенетического дерева, таксономия которого была построена с использованием модели наивного Байесовского классификатора в биоинформатическом обеспечении QIIME 2. Визуализация дерева была выполнена в онлайн приложении iTOL (Рис. 24).

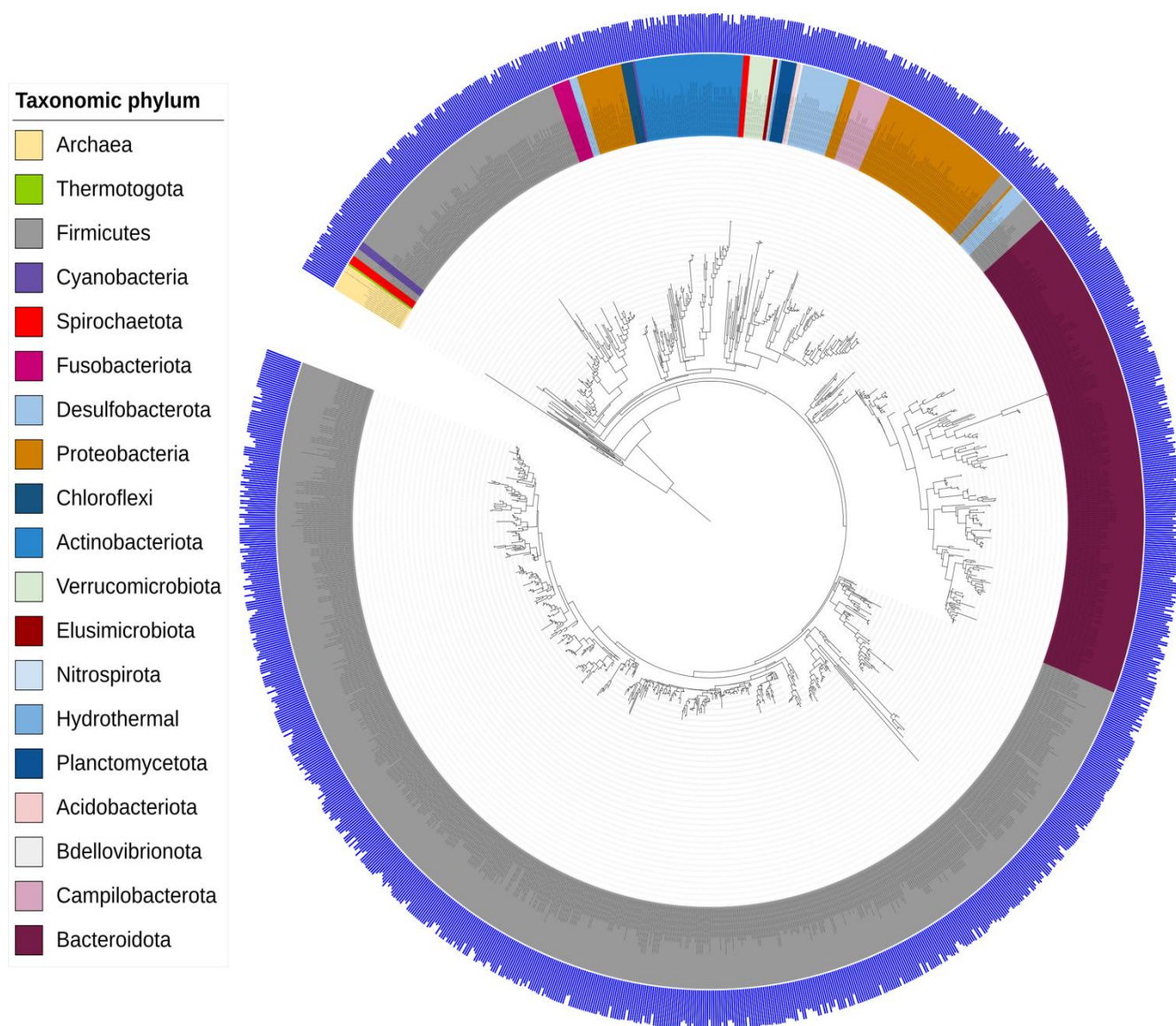


Рисунок 24. Укорененное круговое филогенетическое дерево всех ОТЕ кишечной микробиоты крыс линии Wistar

На основе построенного дерева разными цветами были выделены группы с разрешением до бактериального филума (Рис. 24). Как видно по 16S метагеномным данным было всего идентифицировано 19 филумов. Доминирующим филумом в кишечной микробиоте крыс линии Wistar оказались представители *Firmicutes*, что полностью соответствует литературным данным [281, 282].

3.2.1. α -разнообразие

Оценка α -разнообразия является одним из самых распространенных математических методов, применяемый для метагеномных данных. Данный показатель демонстрирует сложность биологической системы внутри бактериального сообщества, которое определяется количеством ОТЕ и численностью отдельных этих ОТЕ внутри анализируемого сообщества [209]. Как видно из Рисунка 25А—Б, анализ метрики α -разнообразия по индексу Шеннона и Симпсона показали низкое разнообразие кишечной микробиоты у крыс с имплантированной конструкцией ПОБ-альгинат и альгинатными сферами инкапсулированными лактобактериями (заплата-Л).

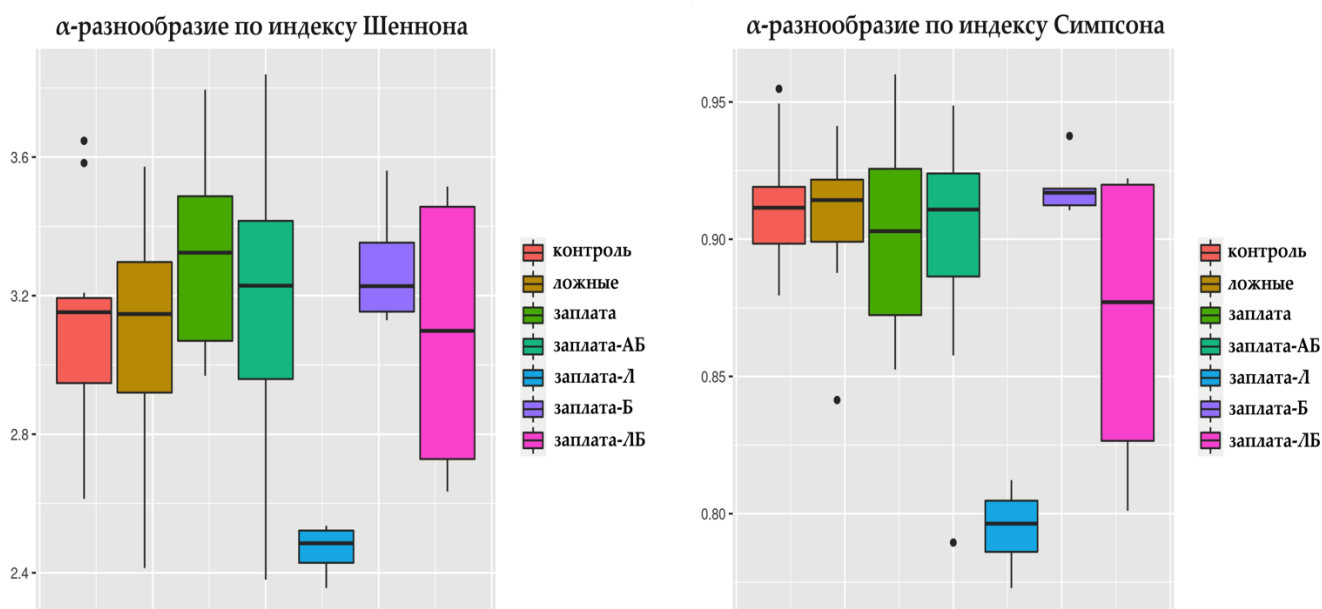


Рисунок 25. α —разнообразие. (А) — по Шеннону и по Симпсону (Б)

Данные результаты показывают, что сферы на основе лактобактерий способствовали агрессивному росту одной отдельной или нескольких таксономических групп, заместивших множество других микроорганизмов толстого кишечника. Возможно, продукты метаболизма инкапсулированных бактерий дали резкий толчок к росту немногочисленных таксономических групп микроорганизмов. Данный процесс, называемый «cross-feeding», стимулирует рост одних микробов за счет метаболитов другой бактериальной группы и резко подавляет рост остальных групп бактерий [283].

Необходимо отметить, что уровень α -разнообразия (за исключением группы крыс с сферами лактобактерий) не снижался у разных групп крыс в сравнении с контрольной группой. Такое наблюдение подчеркивает, что не всегда изменение условий, таких как операционное вмешательство или создание искусственных условий, снижает уровень бактериальных сообществ в кишечной микробиоте млекопитающих [212].

3.2.2. β -разнообразие

Когда требуется сравнить несколько сообществ по степени их схожести или различия, то данный параметр обычно называют β -разнообразием. Для метагеномных данных распространены методы ординации для оценки β -разнообразия, так как бактериальные сообщества по причине большого количества таксономических групп и их численности достаточно сложны, чтобы анализировать их стандартными методами. Для оценки β -разнообразия между образцами и их группами были применены методы ординации микробных сообществ при помощи алгоритмов NMDS (неметрическое многомерное шкалирование) и PcoA (Анализ основных компонент) [211] (Рисунок 26).

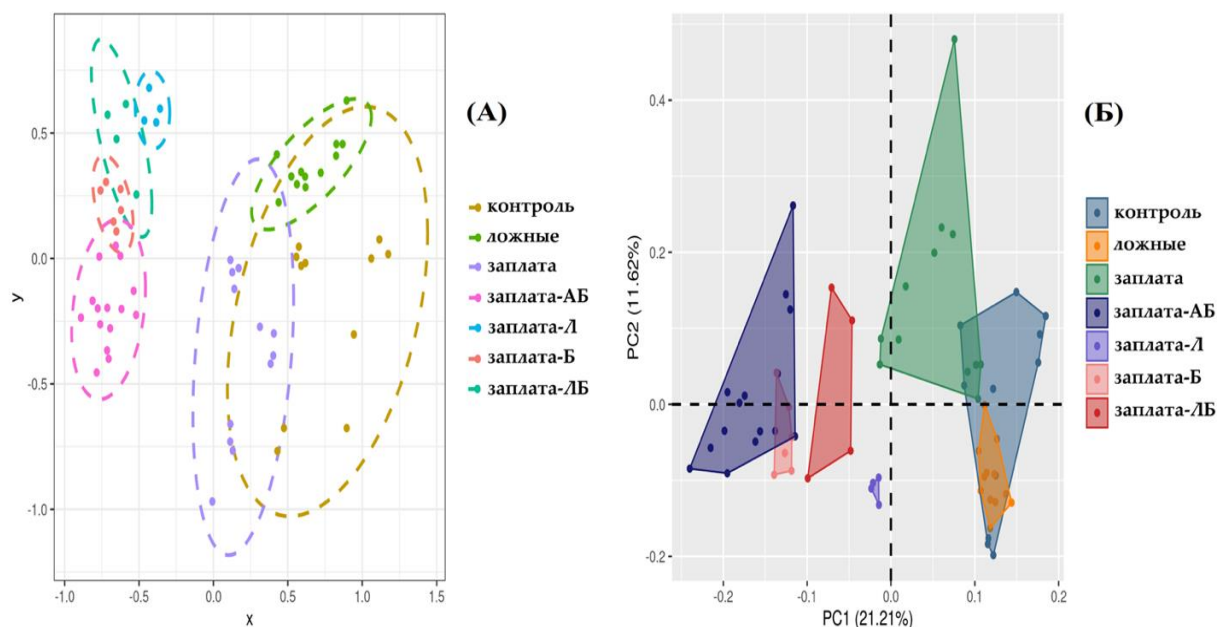


Рисунок 26. Оценка β —разнообразия. А) Непараметрическое многомерное шкалирование (NMDS) и Б) Анализ основных компонент (PcoA)

Данные демонстрируют, что качественный состав микробиоты значительно изменяется, причем по направленности изменений можно выделить две группы образцов.

Первая группа — это крысы, которым либо не проводили операцию, либо проводили, но без инкапсуляции пробиотиков или терапии антибиотиком. Во второй группе были крысы с операционным вмешательством и терапией антибиотиком или пробиотическими бактериями. Таким образом, можно заключить, что влияние антибиотика азитромицина и пробиотиков-лакто и бифидобактерий вносили более значительный вклад в качественный состав кишечного сообщества, чем факт самой операции. Многие работы действительно показывают, что терапия антибиотиками или пробиотиками сдвигали кишечную микробиоту в сторону одних или других таксономических бактериальных групп [284—286]. Но ранее еще не проводилось сравнений влияния лекарственных препаратов при хирургическом вмешательстве.

3.2.3. Качественный и количественный анализ бактериальных таксономических групп

Состав микробиоты на уровне бактериальных классов обозначил 2 главные доминирующие группы во всех образцах (Рис. 27).

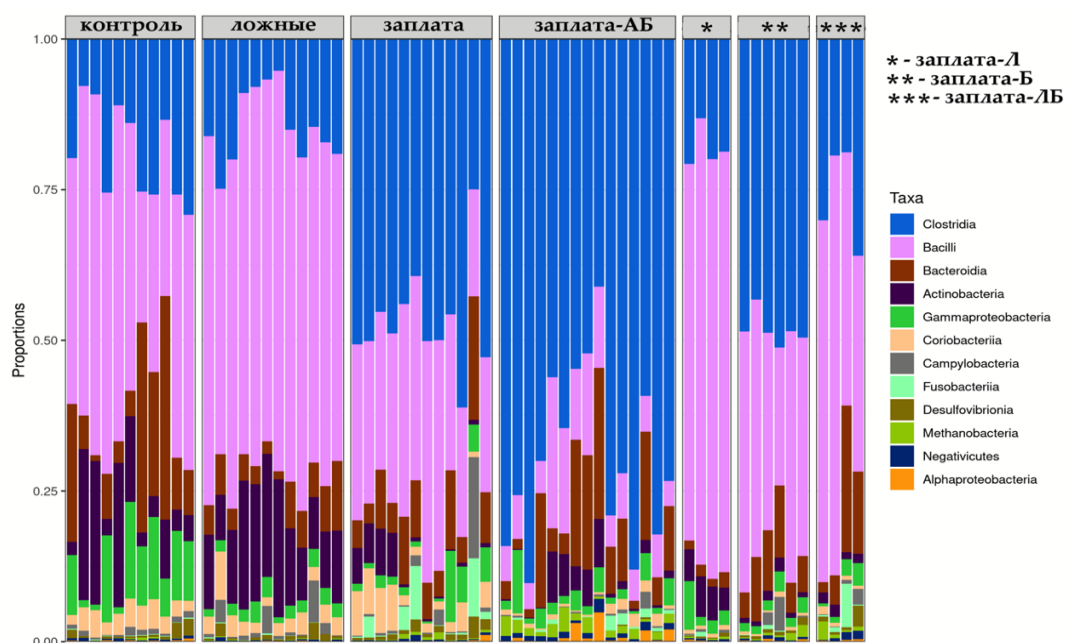


Рисунок 27. Относительная бактериальная численность на уровне класса

Главное представительство во всех группах заняли бактерии класса *Clostridia* и *Bacilli*. Можно заметить, что самую большую представленность *Clostridia* имела группа крыс с имплантацией биополимерной конструкции при использовании антибиотика (заплата-АБ). Такое наблюдение показывает, что большинство бактерий класса *Clostridia* имеют устойчивость к данному антимикробному препарату. Этот факт весьма интересен, так как в современном представлении принято считать, что бактерии класса *Clostridia*, такие как *Clostridium difficile* являются патогенными организмами для человека и ответственны за многие воспалительные и онкологические заболевания кишечника [287, 288]. На самом деле большинство представителей класса *Clostridia* в кишечной микробиоте играют комменсальную роль и поддерживают гомеостаз организма [289]. Они обладают защитной функцией кишечника, синтезируя γ -гидроксимасляные и другие жирные кислоты, которые в свою очередь проявляют барьерные и противовоспалительные функции в ЖКТ [290, 291]. Более того, наличие благотворных *Clostridia* необходимо для ингибирования роста патогенных штаммов того же класса. Как показано в одной из последних работ, комменсальные *Clostridia* с *bai* опероном подавляют рост *Clostridia difficile* за счет продукции вторичных желчных кислот [292]. Также логично ведет, что данная группа крыс является самой гетерогенной по представительству различных бактерий, что вероятно можно связать с тем, что антибиотик в отличие от пробиотиков подавляет рост определенных таксономических групп, тем самым вызывая серьезные перестроения в кишечном сообществе. В данном случае намного важнее не применение антимикробного препарата, а состав нативной кишечной микробиоты перед непосредственным его введением [293].

Остальные группы имеют относительно сходное строение по классовому микробному представительству с небольшими отличиями. Так в группе крыс с фиктивным хирургическим вмешательством во всех образцах имеется равная представленность таксономической группы *Actinobacteria*. Возможно многие представители данного класса бактерий защищают кишечник против механических повреждений. Так, к примеру, штамм *Bifidobacterium breve* Bif195

демонстрирует защитные механизмы против множественных язв кишечника [294]. Также было показано, что бифидобактериальный поверхностный белок адгезин защищает эпителиальные клетки кишечника от липополисахаридов и перекиси водорода, и в дополнение к этому способствует балансу между пролиферацией и апоптозом клеток [295].

При увеличении таксономического разрешения с точностью до родовой принадлежности, база данных SILVA фрагментов V4 гена рибосомальной 16S РНК определяет большое количество ОТЕ для каждой группы. К сожалению, к многим ОТЕ не удастся точно установить к какому роду принадлежит тот или иной микроорганизм (Рис. 28).

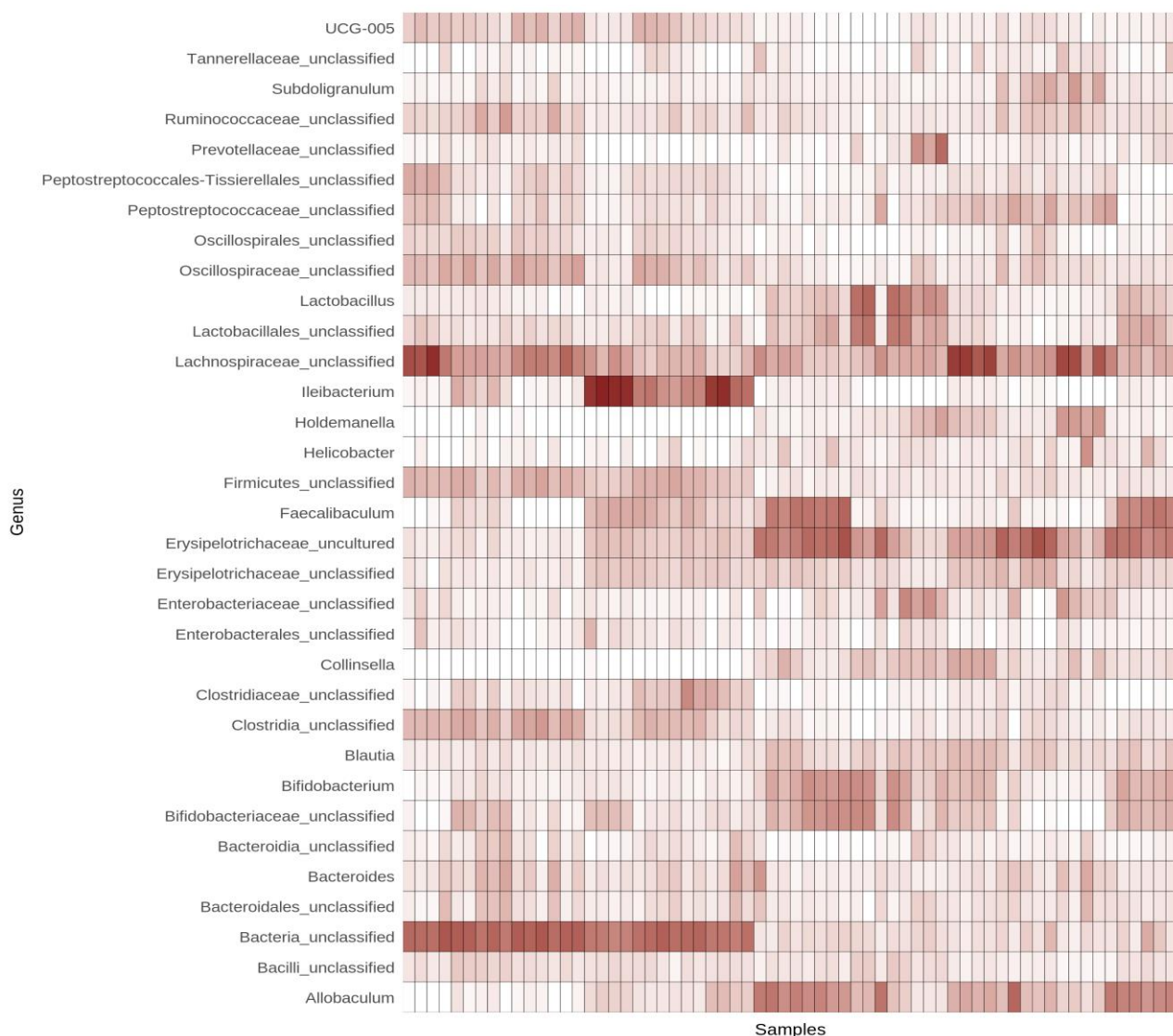


Рисунок 28. Тепловая карта (heatmap) 33 самых многочисленных родов во всех образцах

На основе тепловой карты (Рис. 28.) были отобраны 8 самых многочисленных ОТЕ с точной определенной родовой принадлежностью (Рис. 29).

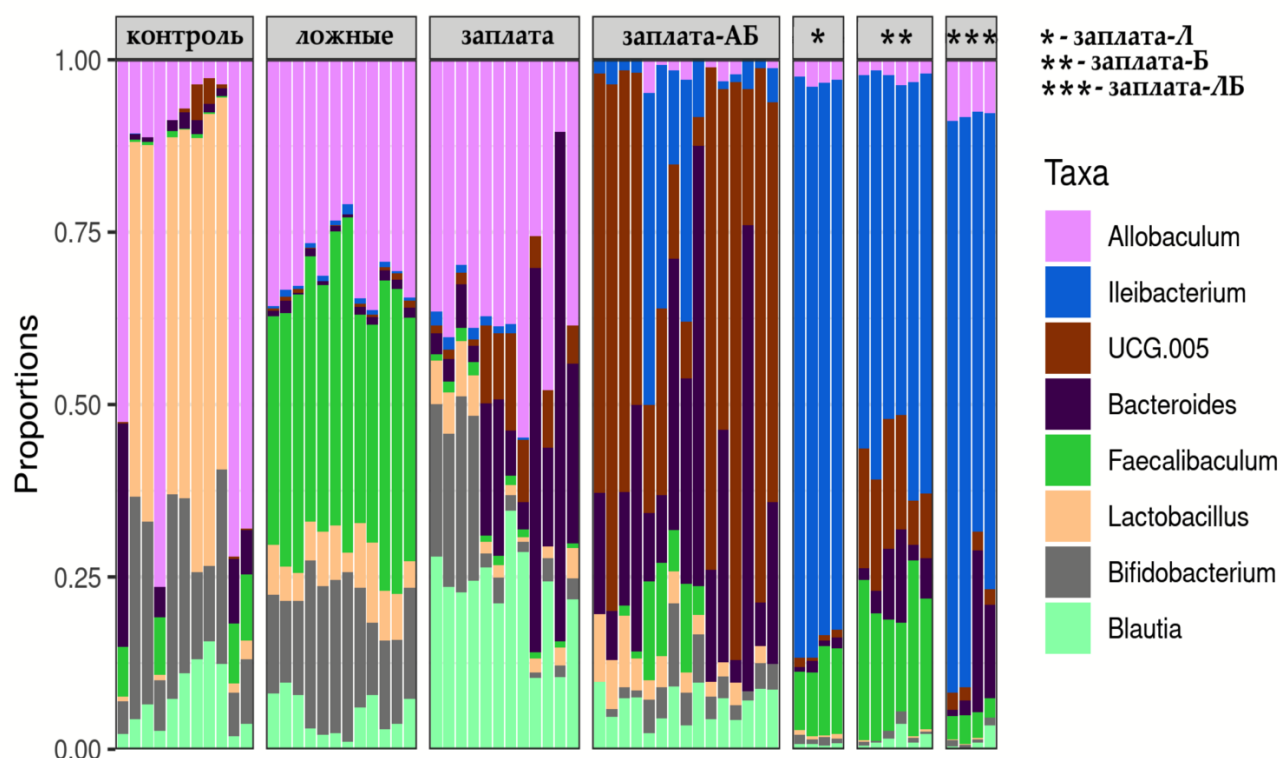


Рисунок 29. Относительная бактериальная численность на уровне рода

Состав микробиоты на уровне самых многочисленных родов показывает, что группы образцов, отобранных у крыс с имплантированной конструкцией включенными в них пробиотическими бактериями, показывали преобладание бактерии рода *Ileibacterium sp.* (заплата-Л, заплата-Б и заплата-ЛБ). Данные по этому роду в литературе достаточно скудны, бактерии этой таксономической группы в первую очередь известны тем, что ответственны за метаболизм моно-и-дисахаридов в широком диапазоне с разложением их до ацетата [296]. Скорее всего именно этот микроб ответственен за низкое α -разнообразие в группе образцов у крыс с инкапсулированными в сферы *Lactobacillus sp.* Как ранее и предполагалось в результатах оценки α -разнообразия, *Ileibacterium sp.* за счет cross-feeding использовала метаболиты инкапсулированных лактобактерий в качестве субстрата для активного роста и деления, тем самым подавляя рост и деление других бактерий кишечного сообщества [283].

Наиболее гетерогенную картину показывает группа образцов при использовании антибиотика в сравнении с другими вариантами опыта причем как на уровне класса, так и на уровне рода (Рис. 27, 29). Контрольная группа имеет также достаточно разнородную кишечную нативную микробиоту. Эти данные согласуются с литературными источниками о том, что композиция кишечной микробиоты человека при применении антимикробных препаратов в первую очередь зависит от изначальной структуры кишечного сообщества [293].

Очень хорошую представленность имеют пробиотические бактерии *Lactobacillus* и *Bifidobacterium sp.* в контрольной группе, где крысам проводили ложные операции. Вероятно, что за счет своих симбиотических связей с организмом хозяином, пробиотики активно способствуют заживлению ЖКТ, имеют противовоспалительный эффект и улучшают перистальтику кишечника [297—300]. Увеличенное количество бактерий рода *Faecalibaculum sp.* демонстрирует та же группа образцов. Кроме того, их количество также увеличено у группы крыс с имплантированной конструкцией и включенными бифидобактериями. Эти микроорганизмы в первую очередь специализируются на ферментации олигосахаридов (в первую очередь на D-мелибиозе и стахиозе) [301]. Их можно в будущем принимать в качестве кандидатов, как новые пробиотические препараты, против раковых заболеваний толстого кишечника, так как в недавнем исследовании показано, что *Faecalibaculum sp.* имеют защитные функции против развития множественных кишечных опухолей [302].

Результаты по группам крыс, которым имплантировали ПОБ-альгинатную конструкцию без антимикробных и пробиотических препаратов (заплата), демонстрировали увеличенное количество бактерий рода *Allobaculum* и *Blautia sp.* Оба организма являются обычными представителями кишечной микробиоты млекопитающих. Бактерии *Allobaculum sp.* растут на органических субстратах и способны ферментировать глюкозу. Конечными продуктами данных представителей являются бутират, лактат и этанол [303]. О бактериях рода *Blautia sp.* известно мало, множество работ посвящено в основном только их выделению и полногеномному секвенированию различных членов этой группы [304, 305], но

существует ряд исследований, где частично раскрывается их роль в кишечной микробиоте. В одном из этих исследований показано, что бактерии *Blautia sp.* снижают вероятность летальности при острой реакции «трансплантат против хозяина», что наделяет эти бактерии ярким противовоспалительным эффектом в процессе трансплантации без системной супрессии иммунитета организма-хозяина [306]. Интересно наблюдение что именно данная таксономическая группа проявила себя лучше всего в имплантации изделия без включения каких-либо дополнительных препаратов.

Хорошую представленность имеют полезные бактерии UCG-005 в группе крыс с имплантированной конструкцией и применением антибиотического препарата. Данная таксономическая группа принадлежит семейству *Ruminococcaceae* и является одним из полезных ПОБ-продуцирующих бактерий [307—310]. Обнаруженные в наших образцах после 7-дневного применения антибиотика превалирующие бактерии *Ruminococcaceae* UCG-005 обладают противовоспалительным эффектом против множества хронических воспалительных заболеваний кишечника [291].

3.2.4. Статистический анализ кишечной микробиоты

Количественные и качественные данные с точностью до бактериального рода были статистически анализированы непараметрическим методом множественного сравнения Краскела-Уоллиса (Рис. 30).

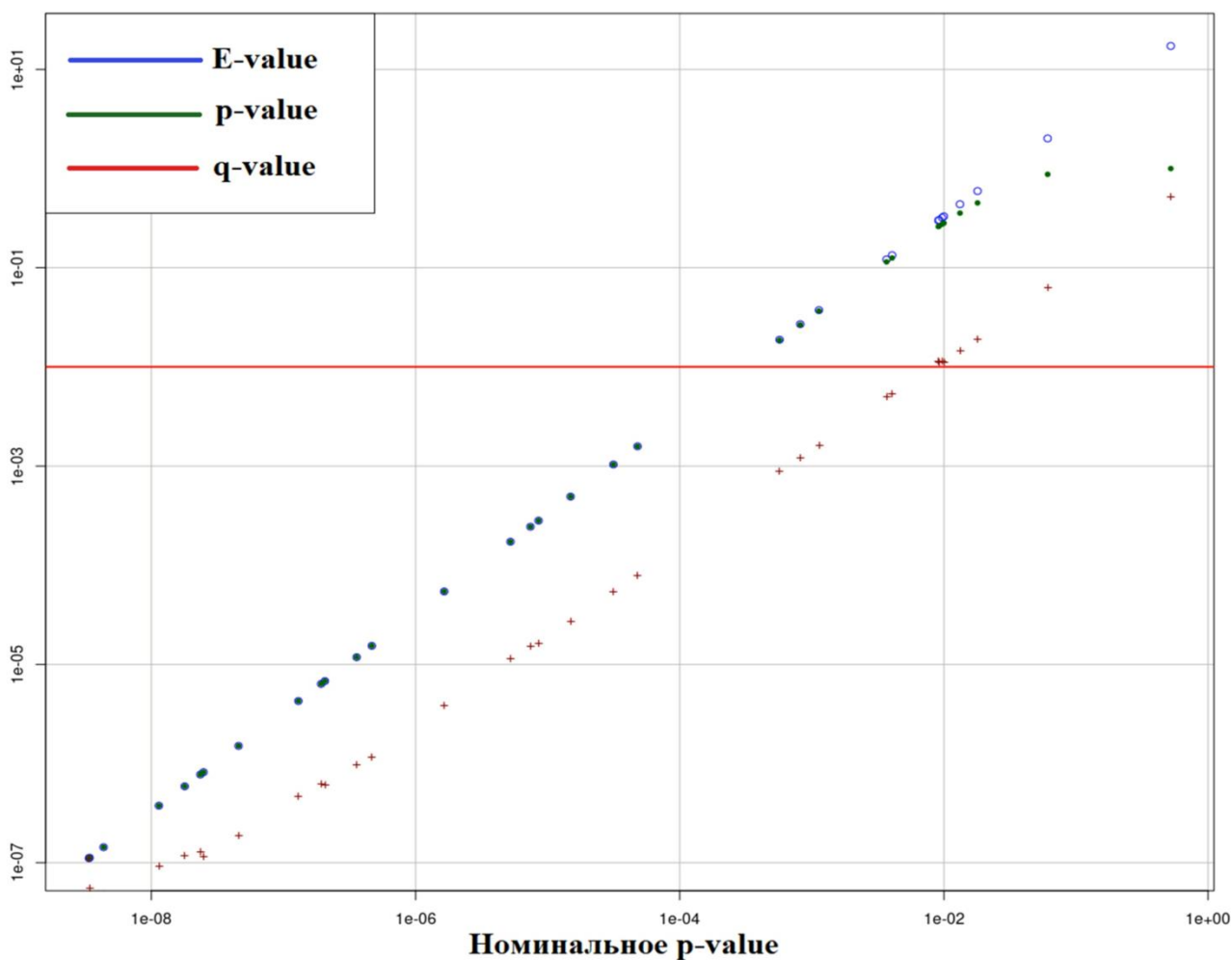


Рисунок 30. Непараметрический метод множественного сравнения по критерию Краскела-Уоллиса. Статистическая значимость отдельных ОТЕ определяется по E-value, *p*-value и *q*-value

На основе этих сравнений можно определить, что только 20 ОТЕ были статистически значимы и из них у девяти была определена родовая принадлежность. На основе множественных сравнений бактерии рода *Faecalibaculum sp.* и *Bacteroides sp.*, которые ранее были количественно рассмотрены нами ранее (Рис. 29), не являются статистически значимыми по причине высокой вероятности групповой ошибки первого рода (FWER). Все остальные таксономические единицы с разрешением до бактериального рода, показанные на Рисунке 28, удовлетворяли всем критериям и были значимы между исследуемыми группами.

По итогу множественных сравнений был визуализирован график относительной численности всех 20 ОТЕ для наглядного сравнения каждой таксономической единицы между группами (Рис. 31).

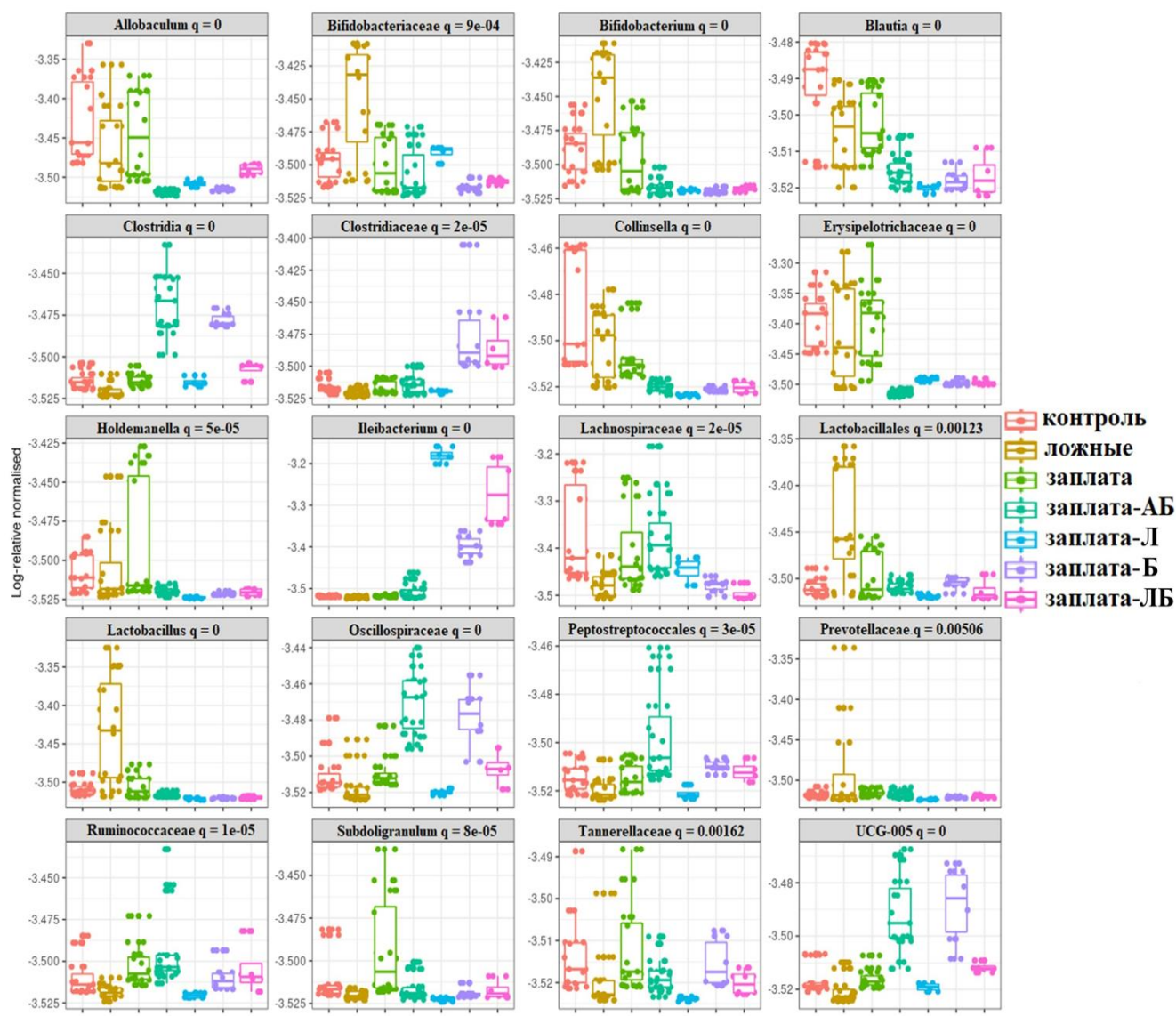


Рисунок 31. Относительная численность 20 ОТЕ между исследуемыми группами

Рисунок 31 представляет аналогичную картину, что и родовой таксономический график (Рис. 29) только в более детальном представлении для каждой бактерии кишечной микробиоты и для всех 20 ОТЕ. Ранее было показано, что результаты β -разнообразия демонстрируют различия по направленности у двух групп образцов: крысы, которым не проводили операцию или проводили без добавления веществ, и вторая группа, которым проводили операцию с инкапсуляцией пробиотиков или применением антибиотика. Данное наблюдение

можно подтвердить по графику относительной численности некоторых ОТЕ (Рис. 31). В первую очередь эти различия можно увидеть по таким бактериям как *Allobaculum sp.*, *Bifidobacterium sp.*, *Blautia sp.*, *Collinsella sp.*, *Holdemanella sp.*, *Peibacterium sp.*, *Lactobacillus sp.*, бактерии семейства *Erysipelotrichaceae* и бактерии класса Clostridia. Таким образом за счет детального рассмотрения таксономически значимых групп, мы можем более наглядно увидеть разницу между двумя большими группами, основываясь на результатах β -разнообразия.

На основании множественных сравнений по Краскелу-Уоллиса был также подсчитан и показан ранговый корреляционный анализ Спирмана (Рис. 32).

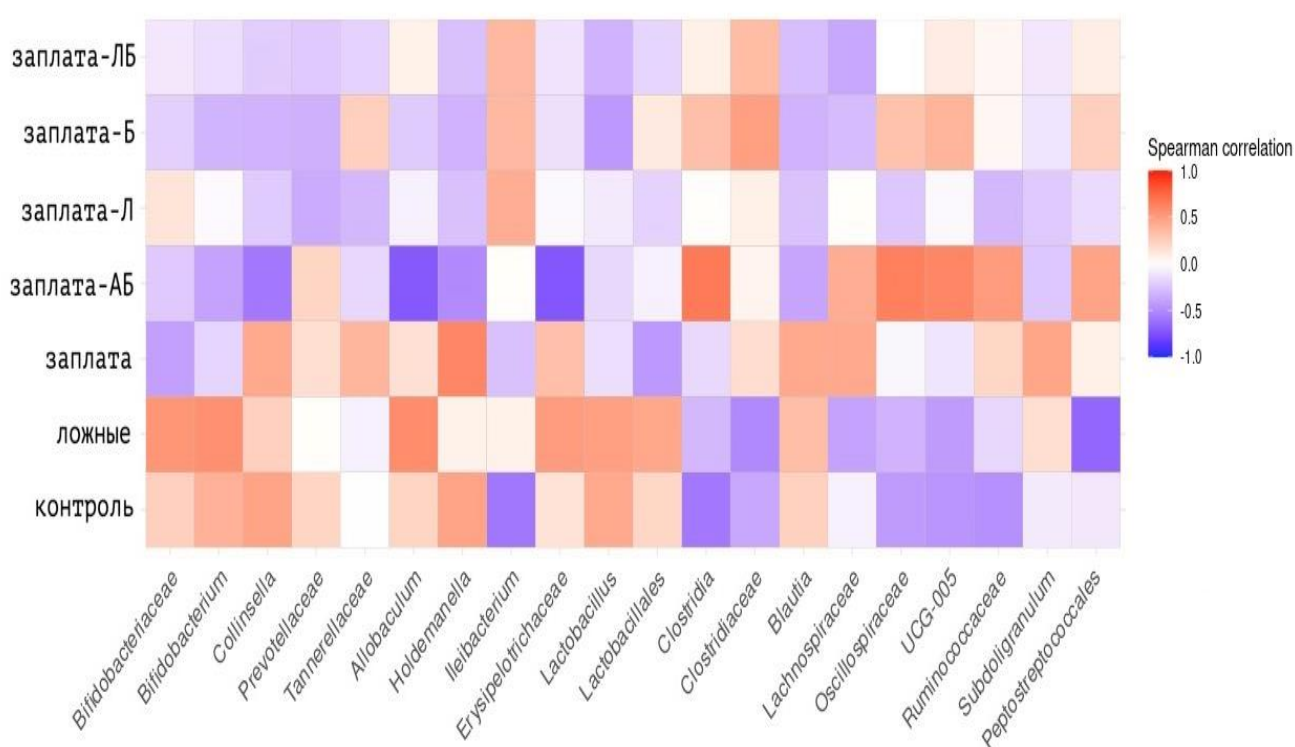


Рисунок 32. Ранговый корреляционный анализ Спирмана 20 ОТЕ по группам

Анализ Спирмана позволяет проследить корреляцию конкретной микробиологической группы кишечного сообщества относительно определенного рассматриваемого опытного варианта. Так образцы ПОБ-альгинат с антибиотиком (заплата-АБ) показали положительную корреляцию ПОБ-продуцирующих бактерий класса Clostridia и одновременно с этим негативную корреляцию потенциально-патогенных бактерий семейства *Erysipelotrichaceae*. Напротив,

контрольный вариант и вариант с ложными операциями имели положительную взаимосвязь с ростом пробиотиков (*Bifidobacterium sp.* и *Lactobacillus sp.*) и отрицательную корреляцию у всех бактерий, относящихся к классу Clostridia. Данные результаты четко демонстрируют разные подходы к заживлению толстого кишечника, и какие в таких случаях начинают преобладать определенные таксономические группы кишечной микробиоты. Также стоит отметить группу крыс с имплантированной конструкцией ПОБ-альгинат с инкапсулированными лактобактериями (заплата-Л), где по результатам рангового анализа Спирмана почти ни одна ОТЕ (за исключением положительной корреляции бактерий рода *Peibacterium sp.*) не демонстрировали какой-либо зависимости по отношению к этой группе. Эти результаты еще раз подтверждают, что именно *Peibacterium sp.* заняли всю нишу в кишечной микробиоте, тем самым снизив α -разнообразие, что может свидетельствовать о возможном воспалительном или патогенном процессе у наблюдаемой группы.

Полученные метагеномные результаты показывают, что кишечная микробиота — это большое сообщество микроорганизмов, которое пронизано сложными связями между собой и организмом-хозяином. Внедрение любого объекта или влияние кого-либо фактора может кардинально изменить структуру кишечного сообщества, что подтверждено нашими результатами, где каждая группа образцов обладала своей бактериальной композицией.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе представлены результаты по бактериальному биосинтезу альгината и ПОБ. Методом математического планирования с использованием полного факторного эксперимента показано, что с помощью направленного изменения значений выбранных факторов (сахароза, фосфаты, кислород) можно сдвигать биосинтез полимеров штаммом продуцентом в сторону продукции либо альгинатов, либо ПОБ. Путем варьирования концентраций выбранных факторов в полном факторном эксперименте достигнут избирательный синтез только капсулярного альгината в отсутствие синтеза свободного альгината и ПОБ.

В работе разработана новая методика по выделению и очистке свободных и капсулярных альгинатов. Исследованы физико-химические свойства синтезированных альгинатов. Молекулярная масса капсулярных альгинатов была существенно выше молекулярной массы свободных альгинатов. Результаты исследования механических свойств альгинатов кальция показали прямую зависимость молекулярной массы и количества гулурановых остатков в полимерной цепи альгинатов с их вязкоупругими свойствами и способностью полимеров к водопоглощению.

На основе синтезированных полимеров были разработаны различные конструкции для имплантации в толстый кишечник крысам линии Wistar. Методом 16S профилирования получены данные по бактериальному разнообразию кишечной микробиоты при имплантировании кишечных конструкций на срок 7-ми дней. Численность бактерий класса Clostridia превалировала у крыс с имплантированной конструкцией на основе ПОБ-альгинат и проведенным курсом антибиотика. Крысы с имплантированной конструкцией на основе ПОБ- альгинат, содержащей пробиотические бактерии рода *Lactobacillus sp.* имели самое низкое α - разнообразие в сравнении с другими исследуемыми группами за счет доминирования таксономической бактериальной группы *Heibacterium sp.* в кишечной микробиоте.

Пробиотические бактерии рода *Faecalibaculum sp.* показывали рост у крыс с контрольными операциями и в экспериментальной группе крыс с изделием ПОБ-альгинат, содержащим бактерии *Bifidobacterium sp.*

Все результаты, полученные в данной работе, говорят о том, что бактериальный синтез ПОБ и альгината можно контролировать за счет варьирования различных параметров культивирования *Azotobacter vinelandii* 12. При этом возможно получать полимеры с заданными физико-химическими свойствами, такими как величина молекулярной массы, соотношение маннуроновых к гулууроновым остаткам в молекулярной цепи полимера, ацетилирование, водопоглощение и т.д. Синтезированные биополимеры имеют большой потенциал в создании на их основе различных композитных конструкций для регенерации толстого кишечника. Анализ микробиоты, имеющей тесную симбиотическую связь с организмом-хозяином, позволяет проследить резкий рост или полное исчезновение отдельных бактериальных таксономических единиц в кишечной микробиоте при имплантировании конструкции ПОБ-альгинат в толстый кишечник крыс. Это дает понимание, какие бактерии могут являться маркерами различных заболеваний или воспалительных процессов при хирургических вмешательствах. В настоящей работе использован полный комплекс методов от бактериального синтеза биополимеров до их применения в составе эндопротеза для толстого кишечника и анализа кишечной микробиоты.

ВЫВОДЫ

1. Продемонстрирован контролируемый биосинтез альгината и ПОБ бактериальным штаммом *Azotobacter vinelandii* 12 при использовании метода математического планирования.
2. Разработана новая методика выделения и очистки свободных и капсулярных альгинатов.
3. В условиях пониженных концентраций сахарозы, повышенной концентрации фосфатов и высокого уровня аэрации избирательно достигнут синтез только капсулярного альгината при полном подавлении синтеза свободного альгината.
4. Показано, что ММ капсулярных альгинатов значительно выше ММ свободных альгинатов. ММ капсулярных альгинатов варьирует в зависимости от условий культивирования (от 212 кДа до 574 кДа).
5. Показана корреляция молекулярной массы альгинатов с их водопоглотительными и вязкоупругими свойствами.
6. Разработаны конструкции на основе ПОБ и альгината в виде кишечной заплаты и проведены операции эндопротезирования на толстом кишечнике крысам линии Wistar. Варианты: ПОБ-альгинат, ПОБ-альгинат-антибиотик, ПОБ-альгинат-лакто, ПОБ-альгинат-бифидо и ПОБ-альгинат-лакто-бифидо.
7. Внесение лактобактерий в состав конструкций снижает α -разнообразие микробиоты кишечника. Другие варианты конструкций не оказывают влияния на α -разнообразие микробиоты.
8. Оценка β -разнообразия показывает, что влияние антибиотика и внесение пробиотиков в состав конструкций оказывает большее влияние на состав кишечной микробиоты в отличие от имплантации ПОБ-АЛГ без инкапсулированных пробиотиков.
9. Во всех вариантах опытов имплантация разработанных конструкций на основе ПОБ и альгината влияет на качественный и количественный состав кишечной микробиоты крыс линии Wistar.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность сотрудникам лаборатории «биохимии азотфиксации и метаболизма азота» Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН за возможность проведения работы, в особенности сотрудникам группы «биополимеры», а именно, своему руководителю Бонарцевой Г.А. за помощь в планировании и проведении работы, сотрудникам Жуйкову В.А. и Махиной Т.К. за неоценимую поддержку и помощь в исследовании физико-химических свойств биополимеров. Автор выражает благодарность руководству кафедры биоинженерии Биологического факультета Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова за возможность использования лабораторного оборудования, Бонарцеву А.П. за помощь в планировании, в выполнении работы, а также сотрудникам, аспирантам и студентам кафедры биоинженерии, а именно Акулиной Е.А., Жарковой И.И., Воиновой В.В., Чесноковой Д.В., Демьяновой И.В., Белищеву Н.В., Холиной М.С. за поддержку и помощь в выполнении работы.

Работа, описанная в диссертации, была поддержана грантами Российского Научного Фонда No. 17-74-20104 (в части биосинтеза альгинатов) и 20-64-47008 (в части получения поли-3-оксибутирата).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chen F.-M., Liu X. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering // Progress in Polymer Science, 2016, Vol. 53, P. 86-168.
2. Aslam Khan M.U., Abd Razak S.I., Al Arjan W.S., Nazir S., Sahaya Anand T.J., Mehboob H., Amin R. Recent Advances in Biopolymeric Composite Materials for Tissue Engineering and Regenerative Medicines: A Review // Molecules, 2021, Vol. 26, Recent Advances in Biopolymeric Composite Materials for Tissue Engineering and Regenerative Medicines, No. 3, P. 619.
3. Kim M.G., Park C.H. Tooth-Supporting Hard Tissue Regeneration Using Biopolymeric Material Fabrication Strategies // Molecules, 2020, Vol. 25, No. 20, P. 4802.
4. Liu M., Zeng X., Ma C., Yi H., Ali Z., Mou X., Li S., Deng Y., He N. Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering // Bone Research, 2017, Vol. 5, No. 1, P. 17014.
5. Jarrin S., Cabré S., Dowd E. The potential of biomaterials for central nervous system cellular repair // Neurochemistry International, 2021, Vol. 144, P. 104971.
6. Voinova V., Bonartseva G., Bonartsev A. Effect of poly(3-hydroxyalkanoates) as natural polymers on mesenchymal stem cells // World J Stem Cells, 2019, T. 11, N 10, C. 764-786.
7. Lu J., Tappel R.C., Nomura C.T. Mini-Review: Biosynthesis of Poly(hydroxyalkanoates) // Polymer Reviews, 2009, Vol. 49, Mini-Review, No. 3, P. 226-248.
8. Rhein-Knudsen N., Ale M.T., Ajallouelian F., Meyer A.S. Characterization of alginates from Ghanaian brown seaweeds: Sargassum spp. and Padina spp. // Food Hydrocolloids, 2017, Vol. 71, Characterization of alginates from Ghanaian brown seaweeds, P. 236-244.
9. Mejía M.Á., Segura D., Espín G., Galindo E., Peña C. Two-stage fermentation process for alginate production by Azotobacter vinelandii mutant altered in poly- β -hydroxybutyrate (PHB) synthesis: Two-stage fermentation process for alginate production // Journal of Applied Microbiology, 2010, Vol. 108, Two-stage fermentation

process for alginate production by *Azotobacter vinelandii* mutant altered in poly-Î2-hydroxybutyrate (PHB) synthesis, No. 1, P. 55-61.

10. Tønnesen H.H., Karlsen J. Alginate in Drug Delivery Systems // Drug Development and Industrial Pharmacy, 2002, Vol. 28, No. 6, P. 621-630.

11. Ruginov E., Cohen S. Alginate biomaterial for the treatment of myocardial infarction: Progress, translational strategies, and clinical outlook // Advanced Drug Delivery Reviews, 2016, Vol. 96, Alginate biomaterial for the treatment of myocardial infarction, P. 54-76.

12. Raza Z.A., Noor S., Khalil S. Recent developments in the synthesis of poly(hydroxybutyrate) based biocomposites // Biotechnology Progress, 2019, Vol. 35, No. 5.

13. Hageman J.H., Heinz M.C., Kretzschmar K., Vaart J. van der, Clevers H., Snippert H.J.G. Intestinal Regeneration: Regulation by the Microenvironment // Developmental Cell, 2020, Vol. 54, Intestinal Regeneration, No. 4, P. 435-446.

14. Qi D., Shi W., Black A.R., Kuss M.A., Pang X., He Y., Liu B., Duan B. Repair and regeneration of small intestine: A review of current engineering approaches // Biomaterials, 2020, Vol. 240, Repair and regeneration of small intestine, P. 119832.

15. Weber C. Commensal bacteria and intestinal surgery complications // Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2015, Vol. 12, No. 7, P. 371-371.

16. Lin L., Zhang J. Role of intestinal microbiota and metabolites on gut homeostasis and human diseases // BMC Immunology, 2017, Vol. 18, No. 1, P. 2.

17. Zheng D., Liwinski T., Elinav E. Interaction between microbiota and immunity in health and disease // Cell Research, 2020, Vol. 30, No. 6, P. 492-506.

18. Li Y., Hao Y., Fan F., Zhang B. The Role of Microbiome in Insomnia, Circadian Disturbance and Depression // Frontiers in Psychiatry, 2018, T. 9, C. 669.

19. Kohn J., Welsh W.J., Knight D. A new approach to the rationale discovery of polymeric biomaterials // Biomaterials, 2007, Vol. 28, No. 29, P. 4171-4177.

20. Altomare L., Bonetti L., Campiglio C.E., De Nardo L., Draghi L., Tana F., Farè S. Biopolymer-based strategies in the design of smart medical devices and artificial organs // The International Journal of Artificial Organs, 2018, Vol. 41, No. 6, P. 337-359.

21. George A., Sanjay M.R., Srisuk R., Parameswaranpillai J., Siengchin S. A comprehensive review on chemical properties and applications of biopolymers and their composites // *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, Vol. 154, P. 329-338.
22. Meraldo A. Introduction to Bio-Based Polymers // *Multilayer Flexible Packaging* /. – Elsevier, 2016. – P. 47-52.
23. Mohanty A.K., Misra M., Drzal L.T., eds. Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposites. – 0. – CRC Press, 2005.
24. Yin J., Luan S. Opportunities and challenges for the development of polymer-based biomaterials and medical devices // *Regenerative Biomaterials*, 2016, Vol. 3, No. 2, P. 129-135.
25. Alaribe F.N., Manoto S.L., Motaung S.C.K.M. Scaffolds from biomaterials: advantages and limitations in bone and tissue engineering // *Biologia*, 2016, Vol. 71, Scaffolds from biomaterials, No. 4, P. 353-366.
26. Li J., Nemes P., Guo J. Mapping intermediate degradation products of poly(lactic-co-glycolic acid) in vitro // *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2018, Vol. 106, No. 3, P. 1129-1137.
27. Sivakanthan S., Rajendran S., Gamage A., Madhujith T., Mani S. Antioxidant and antimicrobial applications of biopolymers: A review // *Food Res Int*, 2020, Vol. 136, P. 109327.
28. Kaczmarek M.B., Struszczyk-Swita K., Li X., Szczesna-Antczak M., Daroch M. Enzymatic Modifications of Chitin, Chitosan, and Chitooligosaccharides // *Front Bioeng Biotechnol*, 2019, Vol. 7, P. 243.
29. Zanutto-Elgui M.R., Vieira J.C.S., Prado D.Z.D., Buzalaf M.A.R., Padilha P.M., Elgui de Oliveira D., Fleuri L.F. Production of milk peptides with antimicrobial and antioxidant properties through fungal proteases // *Food Chem*, 2019, Vol. 278, P. 823-831.
30. Koller M. Biodegradable and Biocompatible Polyhydroxy-alkanoates (PHA): Auspicious Microbial Macromolecules for Pharmaceutical and Therapeutic Applications // *Molecules*, 2018, Vol. 23, No. 2, P. 362.

31. Millán M., Salazar M., Segura D., Castillo T., Díaz-Barrera Á., Peña C. Molecular mass of Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) produced by *Azotobacter vinelandii* is influenced by the polymer content in the inoculum // *Journal of Biotechnology*, 2017, Vol. 259, P. 50-55.
32. Slaninova E., Sedlacek P., Mravec F., Mullerova L., Samek O., Koller M., Hesko O., Kucera D., Marova I., Obruca S. Light scattering on PHA granules protects bacterial cells against the harmful effects of UV radiation // *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 2018, Vol. 102. P. 1923–1931.
33. Meyer A. *Praktikum der botanischen bakterienkunde* // Jena, 1903.
34. Stapp C. Über die reserveinhaltsstoffe und den schleim von *Azotobacter chroococcum* // *Zentbl Bakteriol II*, 1924, Vol. 61, P. 276-292.
35. Lemoigne M. Produit de deshydratation et de polymerisation de l' acide b-oxybutyrique // *Bull Soc Chim Biol*, 1926, Vol. 8, P. 770-782.
36. Williamson D.H., Wilkinson J.F. The isolation and estimation of the poly-b-hydroxybutyrate inclusions of *Bacillus* species // *J Gen Microbiol*, 1958, Vol. 19, P. 198-209.
37. Doudoroff M., Stanier R.Y. Role of poly-b-hydroxybutyric acid in the assimilation of organic carbon by bacteria // *Nature*, 1959, Vol. 183, P. 1440-1442.
38. Dawes E.A., Senior P.J. The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms // *Adv Microb Physiol*, 1973, Vol. 10, P. 135-266.
39. Sudesh K., Abe H., Doi Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters // *Prog Polym Sci*, 2000, Vol. 25, P. 1503-1555.
40. Slater S.C., Voige W.H., Dennis D.E. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 poly-beta-hydroxybutyrate biosynthetic pathway // *J Bacteriol*, 1988, Vol. 170, No. 10, P. 4431-6.
41. Rehm B.H.A., Steinbuchel A. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis // *Int J Biol Macromol*, 1999, Vol. 25, P. 3-19.

42. Bonartsev A.P., Bonartseva G.A., Myshkina V.L., Voinova V.V., Mahina T.K., Zharkova I.I., Yakovlev S.G., Zernov A.L., Ivanova E.V., Akoulina E.A., Kuznetsova E.S., Zhuikov V.A., Alekseeva S.G., Podgorskii V.V., Bessonov I.V., Kopitsyna M.N., Morozov A.S., Milanovskiy E.Y., Tyugay Z.N., Bykova G.S., Kirpichnikov M.P., Shaitan K.V. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxy-4-methylvalerate) by Strain *Azotobacter chroococcum* 7B // *Acta Naturae*, 2016, T. 8, N 3, C. 77-87.
43. Bonartsev A.P., Bonartseva G.A., Reshetov I.V., Shaitan K.V., Kirpichnikov M.P. Application of Polyhydroxyalkanoates in Medicine and the Biological Activity of Natural Poly(3-Hydroxybutyrate) // *Acta Naturae*, 2019, T. 11, N 2, C. 4-16.
44. Dudun A.A., Akoulina E.A., Voinova V.V., Makhina T.K., Myshkina V.L., Zhuikov V.A., Bonartsev A.P., Bonartseva G.A. Biosynthesis of Alginate and Poly(3-Hydroxybutyrate) by the Bacterial Strain *Azotobacter agile* 12 // *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2019, Vol. 55, No. 6, P. 654-659.
45. Emadian S.M., Onay T.T., Demirel B. Biodegradation of bioplastics in natural environments // *Waste Management*, 2017, Vol. 59, P. 526-536.
46. Degli Esposti M., Chiellini F., Bondioli F., Morselli D., Fabbri P. Highly porous PHB-based bioactive scaffolds for bone tissue engineering by in situ synthesis of hydroxyapatite // *Materials Science and Engineering: C*, 2019, Vol. 100, P. 286-296.
47. Mohan A., Girdhar M., Kumar R., Chaturvedi H.S., Vadhel A., Solanki P.R., Kumar A., Kumar D., Mamidi N. Polyhydroxybutyrate-Based Nanocomposites for Bone Tissue Engineering, *Pharmaceuticals*, 2021, Vol. 14, No. 11, P. 1163.
48. Soleymani Eil Bakhtiari S., Karbasi S., Toloue E.B. Modified poly(3-hydroxybutyrate)-based scaffolds in tissue engineering applications: A review // *Int J Biol Macromol*, 2021, Vol. 166, P. 986-998.
49. Turco R., Santagata G., Corrado I., Pezzella C., Di Serio M. In vivo and Post-synthesis Strategies to Enhance the Properties of PHB-Based Materials // *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, Vol. 8, P. 619266.
50. Raza A., Abid S., Banat I.M. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications // *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2018, Vol. 126, P. 45-56.

51. Gahlawat G., Soni S.K. Valorization of waste glycerol for the production of poly (3-hydroxybutyrate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer by *Cupriavidus necator* and extraction in a sustainable manner // *Bioresource Technology*, 2017, Vol. 243, P. 492-501.
52. Mangeon C., Michely L., Rios de Anda A., Thevenieau F., Renard E., Langlois V. Natural Terpenes Used as Plasticizers for Poly(3-hydroxybutyrate) // *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2018, Vol. 6, No. 12, P. 16160-16168.
53. Urtuvia V., Maturana N., Acevedo F., Peña C., Díaz-Barrera A. Bacterial alginate production: an overview of its biosynthesis and potential industrial production // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2017, Vol. 33, Bacterial alginate production, No. 11, P. 198.
54. Larsen B.E., Bjørnstad J., Pettersen E.O., Tønnesen H.H., Melvik J.E. Rheological characterization of an injectable alginate gel system // *BMC Biotechnology*, 2015, Vol. 15, No. 1, P. 29.
55. Grant G.T., Morris E.R., Rees D.A., Smith P.J.C., Thom D. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model // *FEBS Letters*, 1973, Vol. 32, Biological interactions between polysaccharides and divalent cations, No. 1, P. 195-198.
56. Gacesa P. Bacterial alginate biosynthesis – recent progress and future prospects // *Microbiology*, 1998, Vol. 144, No. 5, P. 1133-1143.
57. Hay I.D., Wang Y., Moradali M.F., Rehman Z.U., Rehm B.H.A. Genetics and regulation of bacterial alginate production: Regulation of bacterial alginate // *Environmental Microbiology*, 2014, Vol. 16, Genetics and regulation of bacterial alginate production, No. 10, P. 2997-3011.
58. Sabra W., Zeng A.-P., Lünsdorf H., Deckwer W.-D. Effect of Oxygen on Formation and Structure of *Azotobacter vinelandii* Alginate and Its Role in Protecting Nitrogenase // *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, Vol. 66, No. 9, P. 4037-4044.
59. Kennedy C., Dean D. The *nifU*, *nifS* and *nifV* gene products are required for activity of all three nitrogenases of *Azotobacter vinelandii* // *Molecular and General Genetics MGG*, 1992, Vol. 231, No. 3, P. 494-498.

60. Röckel D., Hernando J.J., Vakalopoulou E., Post E., Oelze J. Localization and activities of nitrogenase, glutamine synthetase and glutamate synthase in *Azotobacter vinelandii* grown in oxygen-controlled continuous culture // Archives of Microbiology, 1983, Vol. 136, No. 1, P. 74-78.
61. Oelze J. Respiratory protection of nitrogenase in *Azotobacter* species: is a widely held hypothesis unequivocally supported by experimental evidence? // FEMS Microbiology Reviews, 2000, Vol. 24, Respiratory protection of nitrogenase in *Azotobacter* species, No. 4, P. 321-333.
62. Dudun A., Akoulina E., Zhuikov V., Makhina T., Voinova V., Belishev N., Khaydapova D., Shaitan K., Bonartseva G., Bonartsev A. Competitive Biosynthesis of Bacterial Alginate Using *Azotobacter vinelandii* 12 for Tissue Engineering Applications // Polymers, 2021, Vol.14, No. 1, P. 131.
63. Noar J.D., Bruno-Bárcena J.M. *Azotobacter vinelandii*: the source of 100 years of discoveries and many more to come // Microbiology, 2018, Vol. 164, *Azotobacter vinelandii*, No. 4, P. 421-436.
64. Nivens D.E., Ohman D.E., Williams J., Franklin M.J. Role of Alginate and Its O Acetylation in Formation of *Pseudomonas aeruginosa* Microcolonies and Biofilms // Journal of Bacteriology, 2001, Vol. 183, No. 3, P. 1047-1057.
65. Franklin M.J., Chitnis C.E., Gacesa P., Sonesson A., White D.C., Ohman D.E. *Pseudomonas aeruginosa* AlgG is a polymer level alginate C5-mannuronan epimerase. // Journal of Bacteriology, 1994, Vol. 176, No. 7, P. 1821-1830.
66. Schiller N.L., Monday S.R., Boyd C.M., Keen N.T., Ohman D.E. Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* alginate lyase gene (*algL*): cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli*. // Journal of Bacteriology, 1993, Vol. 175, No. 15, P. 4780-4789.
67. Lee K.Y., Mooney D.J. Alginate: Properties and biomedical applications // Progress in Polymer Science, 2012, Vol. 37, Alginate, No. 1, P. 106-126.
68. Hu C., Lu W., Mata A., Nishinari K., Fang Y. Ions-induced gelation of alginate: Mechanisms and applications // International Journal of Biological Macromolecules, 2021, Vol. 177, P. 578-588.

69. Cattelan G., Gerbolés A.G., Foresti R., Pramstaller P.P., Rossini A., Miragoli M., Malvezzi C.C. Alginate formulations: current developments in the race for hydrogel-based cardiac regeneration // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, Vol. 8, P. 414.
70. Кузнецова Т.А., Андрюков Б.Г., Беседнова Н.Н., Хотимченко Ю.С. Полисахариды морских водорослей в современных технологиях регенеративной медицины // *Биология моря*, 2021, Т. 47, № 1, С. 3-12.
71. Lu Y., Chen J., Wang R., Xu P., Zhang X., Gao B., Guo C., Yang G. Bio-inspired Cu-alginate to smartly enhance safety performance and the thermal decomposition of ammonium perchlorate // *Applied Surface Science*, 2019, Vol. 470, P. 269-275.
72. Haug A., Smidsrød O., Högdahl B., Øye H.A., Rasmussen S., Sunde E., Sørensen N.A. Selectivity of Some Anionic Polymers for Divalent Metal Ions // *Acta Chemica Scandinavica*, 1970, Vol. 24, P. 843-854.
73. Zheng W., Gao C., Shen L., Qu C., Zhang X., Yang L., Feng Q., Tang R. Alginate Hydrogel-Embedded Capillary Sensor for Quantitative Immunoassay with Naked Eye // *Sensors*, 2020, Vol. 20, No. 17, P. 4831.
74. Madzovska-Malagurski I., Vukasinovic-Sekulic M., Kostic D., Levic S. Towards antimicrobial yet bioactive Cu-alginate hydrogels // *Biomedical Materials*, 2016, Vol. 11, No. 3, P. 035015.
75. Galindo E., Peña C., Núñez C., Segura D., Espín G. Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii* // *Microbial Cell Factories*, 2007, Vol. 6, No. 1, P. 7.
76. Setubal J.C., Santos P. dos, Goldman B.S., Ertesvåg H., Espin G., Rubio L.M., Valla S., Almeida N.F., Balasubramanian D., Cromes L., Curatti L., Du Z., Godsy E., Goodner B., Hellner-Burris K., Hernandez J.A., Houmiel K., Imperial J., Kennedy C., Larson T.J., Latreille P., Ligon L.S., Lu J., Mærk M., Miller N.M., Norton S., O'Carroll I.P., Paulsen I., Raulfs E.C., Roemer R., Rosser J., Segura D., Slater S., Stricklin S.L., Studholme D.J., Sun J., Viana C.J., Wallin E., Wang B., Wheeler C., Zhu H., Dean D.R., Dixon R., Wood D. Genome Sequence of *Azotobacter vinelandii*, an Obligate Aerobe

Specialized To Support Diverse Anaerobic Metabolic Processes // Journal of Bacteriology, 2009, Vol. 191, No. 14, P. 4534-4545.

77. Martínez-Salazar J.M., Moreno S., Nájera R., Boucher J.C., Espín G., Soberón-Chávez G., Deretic V. Characterization of the genes coding for the putative sigma factor AlgU and its regulators MucA, MucB, MucC, and MucD in *Azotobacter vinelandii* and evaluation of their roles in alginate biosynthesis. // Journal of bacteriology, 1996, Vol. 178, No. 7, P. 1800-1808.

78. Remminghorst U., Rehm B.H.A. In Vitro Alginate Polymerization and the Functional Role of Alg8 in Alginate Production by *Pseudomonas aeruginosa* // Applied and Environmental Microbiology, 2006, Vol. 72, No. 1, P. 298-305.

79. Franklin M.J., Ohman D.E. Mutant Analysis and Cellular Localization of the AlgI, AlgJ, and AlgF Proteins Required for O Acetylation of Alginate in *Pseudomonas aeruginosa* // Journal of Bacteriology, 2002, Vol. 184, No. 11, P. 3000-3007.

80. Maleki S., Almaas E., Zotchev S., Valla S., Ertesvåg H. Alginate Biosynthesis Factories in *Pseudomonas fluorescens*: Localization and Correlation with Alginate Production Level // Applied and Environmental Microbiology, 2016, Vol. 82, No. 4, P. 1227-1236.

81. Jain S., Franklin M.J., Ertesvåg H., Valla S., Ohman D.E. The dual roles of AlgG in C-5-epimerization and secretion of alginate polymers in *Pseudomonas aeruginosa*: Alginate secretion in *P. aeruginosa* // Molecular Microbiology, 2003, Vol. 47, No. 4, P. 1123-1133.

82. Castañeda M., Sánchez J., Moreno S., Núñez C., Espín G. The Global Regulators GacA and ζ SForm Part of a Cascade That Controls Alginate Production in *Azotobacter vinelandii* // Journal of Bacteriology, 2001, Vol. 183, No. 23, P. 6787-6793.

83. Segura D., Vargas E., Espín G. β -Ketothiolase genes in *Azotobacter vinelandii* // Gene, 2000, Vol. 260, No. 1-2, P. 113-120.

84. Segura D., Cruz T., Espín G. Encystment and alkylresorcinol production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in poly- β -hydroxybutyrate synthesis // Archives of Microbiology, 2003, Vol. 179, No. 6, P. 437-443.

85. Collins L.M., Dziak J.J., Kugler K.C., Trail J.B. Factorial Experiments: efficient tools for evaluation of intervention components // *American Journal of Preventive Medicine*, 2014, Vol. 47, No. 4, P. 498-504.
86. Smith A.M., Senior J.J. Alginate Hydrogels with Tuneable Properties // *Tunable Hydrogels: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* / A. Lavrentieva [et al.] eds.. – Cham: Springer International Publishing, 2021. – Vol. 178. – P. 37-61.
87. Donati I., Asaro F., Paoletti S. Experimental evidence of counterion affinity in alginates: the case of nongelling ion Mg^{2+} // *J Phys Chem B*, 2009, Vol. 113, P. 12877–12886.
88. Bajpai S.K., Sharma S. Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca^{2+} and Ba^{2+} ions // *React Funct Polym*, 2004, Vol. 59, P. 129-140.
89. Jahromi S.H., Grover L.M., Paxton J.Z., Smith A.M. Degradation of polysaccharide hydrogels seeded with bone marrow stromal cells // *J Mech Behav Biomed Mater*, 2011, Vol. 4, P. 1157-1166.
90. Guarino V., Caputo T., Altobelli R., Ambrosio L. Degradation properties and metabolic activity of alginate and chitosan polyelectrolytes for drug delivery and tissue engineering applications // *AIMS Materials Science*, 2015, Vol. 2, No. 4, P. 497-502.
91. Cockburn D.W., Koropatkin N.M. Polysaccharide Degradation by the Intestinal Microbiota and Its Influence on Human Health and Disease // *Journal of Molecular Biology*, 2016, Vol. 428, No. 16, P. 3230-3252.
92. Stender E.G.P., Andersen C.D., Fredslund F., Holck J., Solberg A., Teze D., Peters G.H.J., Christensen B.E., Aachmann F.L., Welner D.H., Svensson B. Structural and functional aspects of mannuronic acid-specific PL6 alginate lyase from the human gut microbe *Bacteroides cellulosilyticus* // *Journal of Biological Chemistry*, 2019, Vol. 294, No. 47, P. 17915-17930.
93. Wang B., Dong S., Li F-L., Ma X.-Q. Structural basis for the exolytic activity of polysaccharide lyase family 6 alginate lyase BcAlyPL6 from human gut microbe *Bacteroides clarus* // *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2021, Vol. 547, P. 111-117.

94. Byrom D. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics // Trends in Biotechnology, 1987, Vol. 5, No. 9, P. 246-250.
95. Kliem S., Kreutzbruck M., Bonten C. Review on the Biological Degradation of Polymers in Various Environments // Materials, 2020, Vol. 13, No. 20, P. 4586.
96. Mergaert J., Webb A., Anderson C., Wouters A., Swings J. Microbial degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in soils // Appl. Environ. Microbiol, 1993, Vol. 59, P. 3233–3238.
97. Bagheri A.R., Laforsch C., Greiner A., Agarwal S. Fate of So-Called Biodegradable Polymers in Seawater and Freshwater // Glob. Chall, 2017, Vol. 1, P. 1700048.
98. Volova T.G., Boyandin A.N., Vasiliev A.D., Karpov V.A., Prudnikova S.V., Mishukova O.V., Boyarskikh U.A., Filipenko M.L., Rudnev V.P., Bá Xuân B., et al. Biodegradation of polyhydroxyalkanoates (PHAs) in tropical coastal waters and identification of PHA-degrading bacteria // Polym. Degrad. Stab, 2010, Vol. 95, P. 2350–2359.
99. Tsuji H., Suzuyoshi K. Environmental degradation of biodegradable polyesters 2. Poly(ϵ -caprolactone), poly[(R)-3-hydroxybutyrate], and poly(L-lactide) films in natural dynamic seawater // Polym. Degrad. Stab, 2002, Vol. 75, P. 357–365.
100. Mergaert J., Wouters A., Anderson C., Swings J. In situ biodegradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in natural waters // Can. J. Microbiol, 1995, Vol. 41(Suppl. 1), P. 154–159.
101. Reusch R.N. Physiological Importance of Poly-(R)-3-hydroxybutyrates // Chemistry & Biodiversity, 2012, Vol. 9, No. 11, P. 2343-2366.
102. Tokiwa Y., Calabria B., Ugwu C., Aiba S. Biodegradability of Plastics // International Journal of Molecular Sciences, 2009, Vol. 10, No. 9, P. 3722-3742.
103. Saito T., Suzuki K., Yamamoto J., Fukui T., Miwa K., Tomita K., Nakanishi S., Odani S., Suzuki J., Ishikawa K. Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the gene for poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Alcaligenes faecalis* // Journal of Bacteriology, 1989, Vol. 171, No. 1, P. 184-189.
104. Piskin E. Biodegradable polymers as biomaterials // Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 1995, Vol. 6, No. 9, P. 775-795.

105. Yang T.H., Kwon M.-A., Lee J.Y., Choi J-E., Oh J.Y., Song J.K. In Situ Immobilized Lipase on the Surface of Intracellular Polyhydroxybutyrate Granules: Preparation, Characterization, and its Promising Use for the Synthesis of Fatty Acid Alkyl Esters // *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015, Vol. 177, No. 7. – P. 1553-1564.
106. Han J., Wu L.-P., Liu X.-B., Hou J., Zhao L-L., Chen J-Y., Zhao D-H., Xiang H. Biodegradation and biocompatibility of haloarchaea-produced poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymers // *Biomaterials*, 2017, Vol. 139, P. 172-186.
107. Reusch R.N. Poly- -hydroxybutyrate/Calcium Polyphosphate Complexes in Eukaryotic Membranes // *Experimental Biology and Medicine*, 1989, Vol. 191, No. 4, P. 377-381.
108. Zhuikov V.A., Akoulina E.A., Chesnokova D.V., Wenhao Y., Makhina T.K., Demyanova I.V., Zhuikova Y.V., Voinova V.V., Belishev N.V., Surmenev R.A., Surmeneva M.A., Bonartseva G.A., Shaitan K.V., Bonartsev A.P. The Growth of 3T3 Fibroblasts on PHB, PLA and PHB/PLA Blend Films at Different Stages of Their Biodegradation In Vitro // *Polymers*, 2020, Vol. 13, No. 1, P. 108.
109. Ding Y., Yao Q., Li W., Schubert D.W., Boccaccini A.R., Roether J.A. The evaluation of physical properties and in vitro cell behavior of PHB/PCL/sol–gel derived silica hybrid scaffolds and PHB/PCL/fumed silica composite scaffolds // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2015, Vol. 136, P. 93-98.
110. Wang N., Zhou Z., Xia L., Dai Y., Liu H. Fabrication and characterization of bioactive β -Ca₂SiO₄/PHBV composite scaffolds // *Materials Science and Engineering: C*, 2013, Vol. 33, No. 4, P. 2294-2301.
111. Sultana N., Wang M. PHBV/PLLA-based composite scaffolds fabricated using an emulsion freezing/freeze-drying technique for bone tissue engineering: surface modification and in vitro biological evaluation // *Biofabrication*, 2012, T. 4, PHBV/PLLA-based composite scaffolds fabricated using an emulsion freezing/freeze-drying technique for bone tissue engineering, N 1, C. 015003.
112. Augst A.D., Kong H.J., Mooney D.J. Alginate Hydrogels as Biomaterials // *Macromolecular Bioscience*, 2006, Vol. 6, No. 8, P. 623-633.

113. Herlofsen S.R., K uchler A.M., Melvik J.E., Brinchmann J.E. Chondrogenic Differentiation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Self-Gelling Alginate Discs Reveals Novel Chondrogenic Signature Gene Clusters // *Tissue Engineering Part A*, 2011, Vol. 17, No. 7-8, P. 1003-1013.
114. Kelishomi Z.H., Goliaei B., Mahdavi H., Nikoofar A., Rahimi M., Moosavi-Movahedi A.A., Mamashli F., Bigdeli B. Antioxidant activity of low molecular weight alginate produced by thermal treatment // *Food Chemistry*, 2016, Vol. 196, P. 897-902.
115. Pritchard M.F., Powell L.C., Jack A.A., Powell K., Beck K., Florance H., Forton J., Rye P.D., Dessen A., Hill K.E., Thomas D.W. A Low-Molecular-Weight Alginate Oligosaccharide Disrupts Pseudomonal Microcolony Formation and Enhances Antibiotic Effectiveness // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2017, Vol. 61, No. 9, P. e00762-17, e00762-17.
116. Jack A.A., Nordli H.R., Powell L.C., Farnell D.J.J., Pukstad B., Rye P.D., Thomas D.W., Chinga-Carrasco G., Hill K.E. Cellulose Nanofibril Formulations Incorporating a Low-Molecular-Weight Alginate Oligosaccharide Modify Bacterial Biofilm Development // *Biomacromolecules*, 2019, Vol. 20, No. 8, P. 2953-2961.
117. Lee K.Y., Mooney D.J. Hydrogels for Tissue Engineering // *Chemical Reviews*, 2001, Vol. 101, No. 7, P. 1869-1880.
118. Qiu Y., Park K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery // *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001, Vol. 53, No. 3, P. 321-339.
119. Discher D.E., Mooney D.J., Zandstra P.W. Growth Factors, Matrices, and Forces Combine and Control Stem Cells // *Science*, 2009, Vol. 324, No. 5935, P. 1673-1677.
120. Sun J.-Y., Zhao X., Illeperuma W.R.K., Chaudhuri O., Oh K.H., Mooney D.J., Vlassak J.J., Suo Z. Highly stretchable and tough hydrogels // *Nature*, 2012, Vol. 489, No. 7414, P. 133-136.
121. Campbell K.T., Stilhano R.S., Silva E.A. Enzymatically degradable alginate hydrogel systems to deliver endothelial progenitor cells for potential revascularization applications // *Biomaterials*, 2018, Vol. 179, P. 109-121.

122. Straccia M., Ayala G. d', Romano I., Oliva A., Laurienzo P. Alginate Hydrogels Coated with Chitosan for Wound Dressing // *Marine Drugs*, 2015, Vol. 13, No. 5, P. 2890-2908.
123. Peña B., Laughter M., Jett S., Rowland T.J., Taylor M.R.G., Mestroni L., Park D. Injectable Hydrogels for Cardiac Tissue Engineering // *Macromolecular Bioscience*, 2018, Vol. 18, No. 6, P. 1800079.
124. Rey-Rico A., Klich A., Cucchiaroni M., Madry H. Biomedical-grade, high mannuronic acid content (BioMVM) alginate enhances the proteoglycan production of primary human meniscal fibrochondrocytes in a 3-D microenvironment // *Scientific Reports*, 2016, Vol. 6, No. 1, P. 28170.
125. Singh M., Kumar P., Ray S., Kalia V.C. Challenges and Opportunities for Customizing Polyhydroxyalkanoates // *Indian Journal of Microbiology*, 2015, Vol. 55, No. 3, P. 235-249.
126. Castillo T., Flores C., Segura D., Espín G., Sanguino J., Cabrera E., Barreto J., Díaz-Barrera A., Peña C. Production of polyhydroxybutyrate (PHB) of high and ultra-high molecular weight by *Azotobacter vinelandii* in batch and fed-batch cultures: Production of PHB of ultra-high molecular weight // *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2017, Vol. 92, Production of polyhydroxybutyrate (PHB) of high and ultra-high molecular weight by *Azotobacter vinelandii* in batch and fed-batch cultures, No. 7, P. 1809-1816.
127. Wu Q., Wang Y., Chen G.-Q. Medical Application of Microbial Biopolyesters Polyhydroxyalkanoates // *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 2009, Vol. 37, No. 1, P. 1-12.
128. Deng, Y., Zhao K., Zhang X-F., Hu P., Chen G-Q. Study on the three-dimensional proliferation of rabbit articular cartilage-derived chondrocytes on polyhydroxyalkanoate scaffolds // *Biomaterials*, 2002, Vol. 23, No. 20, P. 4049-4056.
129. Shahali Z., Karbasi S., Avadi M.R., Semnani D., Zargar E.N., Beni B.H. Evaluation of structural, mechanical, and cellular behavior of electrospun poly-3-hydroxybutyrate scaffolds loaded with glucosamine sulfate to develop cartilage tissue engineering //

International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials, 2017, Vol. 66, No. 12, P. 589-602.

130. Masaeli E., Morshed M., Nasr-Esfahani M.H., Sadri S., Hilderink J., Apeldoorn A., Blitterswijk C.A., Moroni L. Fabrication, Characterization and Cellular Compatibility of Poly(Hydroxy Alkanoate) Composite Nanofibrous Scaffolds for Nerve Tissue Engineering // PLoS ONE, 2013, Vol. 8, No. 2, P. e57157.

131. Zernov A.L., Bonartsev A.P., Yakovlev S.G., Myshkina V.L., Makhina T.K., Parshina E.S., Kharitonova E.P., Bonartseva G.A., Shaitan K.V. Low molecular weight poly(3-hydroxybutyrate) microparticles synthesized by piezoelectric spray drying for the sustained release of paclitaxel // Nanotechnologies in Russia, 2017, Vol. 12, No. 3-4, P. 218-225.

132. Peery A.F., Dellon E.S., Lund J., Crockett S.D., McGowan C.E., Bulsiewicz W.J., Gangarosa L.M., Thiny M.T., Stizenberg K., Morgan D.R., Ringel Y., Kim H.P., DiBonaventura M.D., Carroll C.F., Allen J.K., Cook S.F., Sandler R.S., Kappelman M.D., Shaheen N.J. Burden of Gastrointestinal Disease in the United States: 2012 Update // Gastroenterology, 2012, Vol. 143, Burden of Gastrointestinal Disease in the United States, No. 5, P. 1179-1187.e3.

133. Peery A.F., Crockett S.D., Murphy C.C., Lund J.L., Dellon E.S., Williams J.L., Jensen E.T., Shaheen N.J., Barritt A.S., Lieber S.R., Kochar B., Barnes E.L., Fan Y.C., Pate V., Galanko J., Baron T.H., Sandler R.S. Burden and Cost of Gastrointestinal, Liver, and Pancreatic Diseases in the United States: Update 2018 // Gastroenterology, 2019, Vol. 156, Burden and Cost of Gastrointestinal, Liver, and Pancreatic Diseases in the United States, No. 1, P. 254-272.e11.

134. O'Neill J.D., Pinezich M.R., Guenthart B.A., Vunjak-Novakovic G. Gut bioengineering strategies for regenerative medicine // American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 2021, Vol. 320, No. 1, P. G1-G11.

135. Yeo C.J., ред. Shackelford's surgery of the alimentary tract. – Eighth edition. – Philadelphia, PA: Elsevier, 2019.

136. Bitar K.N., Zakhem E. Bioengineering the gut: future prospects of regenerative medicine // *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2016, Vol. 13, Bioengineering the gut, No. 9, P. 543-556.
137. Huang J., Ren Y., Wu X., Li Z., Ren J. Gut bioengineering promotes gut repair and pharmaceutical research: a review // *Journal of Tissue Engineering*, 2019, Vol. 10, Gut bioengineering promotes gut repair and pharmaceutical research, P. 204173141983984.
138. Shabtaie S.A., Tan N.Y., Parikh R.S., Papadakis K.A. Concurrent Sweet's syndrome and myopericarditis following mesalamine therapy // *BMJ Case Reports*, 2018, P. bcr-2017-223851.
139. Guerra Veloz M.F., Argüelles-Arias F., Castro Laria L., Maldonado Pérez B., Benítez Roldan A., Perea Amarillo R., Merino Bohórquez V., Calleja M.A., Caunedo Álvarez Á., Vilches Arenas Á. Loss of efficacy and safety of the switch from infliximab original to infliximab biosimilar (CT-P13) in patients with inflammatory bowel disease // *World Journal of Gastroenterology*, 2018, T. 24, N 46, C. 5288-5296.
140. Martin L.Y., Ladd M.R., Werts A., Sodhi C.P., March J.C., Hackam D.J. Tissue engineering for the treatment of short bowel syndrome in children // *Pediatric Research*, 2018, Vol. 83, No. 1-2, P. 249-257.
141. Syed O., Walters N.J., Day R.M., Kim H.-W., Knowles J.C. Evaluation of decellularization protocols for production of tubular small intestine submucosa scaffolds for use in oesophageal tissue engineering // *Acta Biomaterialia*, 2014, Vol. 10, No. 12, P. 5043-5054.
142. Pahari M.P., Raman A., Bloomenthal A., Costa M.A., Bradley S.P., Banner B., Rastellini C., Cicalese L. A Novel Approach for Intestinal Elongation Using Acellular Dermal Matrix: An Experimental Study in Rats // *Transplantation Proceedings*, 2006, Vol. 38, A Novel Approach for Intestinal Elongation Using Acellular Dermal Matrix, No. 6, P. 1849-1850.
143. Da L., Gong M., Chen A., Zhang Y., Huang Y., Guo Z., Li S., Li-Ling J., Zhang L., Xie H. Composite elastomeric polyurethane scaffolds incorporating small intestinal submucosa for soft tissue engineering // *Acta Biomaterialia*, 2017, Vol. 59, P. 45-57.

144. Diemer P., Markoew S., Le D.Q.S., Qvist N. Poly- ϵ -caprolactone mesh as a scaffold for in vivo tissue engineering in rabbit esophagus: In vivo tissue engineering in rabbits // *Diseases of the Esophagus*, 2015, Vol. 28, Poly- ϵ -caprolactone mesh as a scaffold for in vivo tissue engineering in rabbit esophagus, No. 3, P. 240-245.
145. Ghobril C., Grinstaff M.W. The chemistry and engineering of polymeric hydrogel adhesives for wound closure: a tutorial // *Chemical Society Reviews*, 2015, Vol. 44, The chemistry and engineering of polymeric hydrogel adhesives for wound closure, No. 7, P. 1820-1835.
146. Huang J., Deng Y., Ren J., Chen G., Wang G., Wang F., Wu X. Novel in situ forming hydrogel based on xanthan and chitosan re-gelifying in liquids for local drug delivery // *Carbohydrate Polymers*, 2018, Vol. 186, P. 54-63.
147. Wu X., Ren J., Wang G., Wang J., Wang F., Fan Y., Li Y., Han G., Zhou Y., Song X., Quan B., Yao M., Li J. Evaluating the use of fibrin glue for sealing low-output enterocutaneous fistulas: study protocol for a randomized controlled trial // *Trials*, 2015, Vol. 16, Evaluating the use of fibrin glue for sealing low-output enterocutaneous fistulas, No. 1, P. 445.
148. Huang J., Li Z., Hu Q., Chen G., Ren Y., Wu X., Ren J. Bioinspired Anti-digestive Hydrogels Selected by a Simulated Gut Microfluidic Chip for Closing Gastrointestinal Fistula // *iScience*, 2018, Vol. 8, P. 40-48.
149. Hardy J.G., Lee J.Y., Schmidt C.E. Biomimetic conducting polymer-based tissue scaffolds // *Current Opinion in Biotechnology*, 2013, Vol. 24, No. 5, P. 847-854.
150. Huang J., Ren J., Chen G., Li Z., Liu Y., Wang G., Wu X. Tunable sequential drug delivery system based on chitosan/hyaluronic acid hydrogels and PLGA microspheres for management of non-healing infected wounds // *Materials Science and Engineering: C*, 2018, Vol. 89, P. 213-222.
151. Cruz-Acuña R., Quirós M., Huang S., Siuda D., Spence J.R., Nusrat A., García A.J. PEG-4MAL hydrogels for human organoid generation, culture, and in vivo delivery // *Nature Protocols*, 2018, Vol. 13, No. 9, P. 2102-2119.
152. Kumar A., Nune K.C., Misra R.D.K. Design and biological functionality of a novel hybrid Ti-6 Al-4 V /hydrogel system for reconstruction of bone defects // *Journal of*

Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2018, Vol. 12, Design and biological functionality of a novel hybrid Ti-6 <span style="font-variant, No. 4, P. 1133-1144.

153. Griffin D.R., Weaver W.M., Scumpia P.O., Di Carlo D., Segura T. Accelerated wound healing by injectable microporous gel scaffolds assembled from annealed building blocks // Nature Materials, 2015, Vol. 14, No. 7, P. 737-744.

154. Costello C.M., Hongpeng J., Shaffiey S., Yu J., Jain N.K., Hackam D., March J.C. Synthetic small intestinal scaffolds for improved studies of intestinal differentiation: Synthetic Small Intestinal Scaffolds for Improved // Biotechnology and Bioengineering, 2014, Vol. 111, Synthetic small intestinal scaffolds for improved studies of intestinal differentiation, No. 6, P. 1222-1232.

155. Nakase Y., Hagiwara A., Nakamura T., Kin S., Nakashima S., Yoshikawa T., Fukuda K.-I., Kuriu Y., Miyagawa K., Sakakura C., Otsuji E., Shimizu Y., Ikada Y., Yamagishi H. Tissue Engineering of Small Intestinal Tissue Using Collagen Sponge Scaffolds Seeded with Smooth Muscle Cells // Tissue Engineering, 2006, Vol. 12, No. 2, P. 403-412.

156. Walthers C.M., Lee M., Wu B.M., Dunn J.C.Y. Smooth Muscle Strips for Intestinal Tissue Engineering // PLoS ONE, 2014, Vol. 9, No. 12, P. e114850.

157. Chen Y., Zhou W., Roh T., Estes M.K., Kaplan D.L. In vitro enteroid-derived three-dimensional tissue model of human small intestinal epithelium with innate immune responses // PLOS ONE, 2017, Vol. 12, No. 11, P. e0187880.

158. Lee S.B., Han S.-H., Park S. Long-Term Culture of Intestinal Organoids // Epithelial Cell Culture / : Methods in Molecular Biology / ред. M. Baratta. – New York, NY: Springer New York, 2018. – T. 1817. – C. 123-135.

159. Sato T., Vries R.G., Snippert H.J., Wetering M. van de, Barker N., Stange D.E., Es J.H. van, Abo A., Kujala P., Peters P.J., Clevers H. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche // Nature, 2009, Vol. 459, No. 7244, P. 262-265.

160. Jung P., Sato T., Merlos-Suárez A., Barriga F.M., Iglesias M., Rossell D., Auer H., Gallardo M., Blasco M.A., Sancho E., Clevers H., Batlle E. Isolation and in vitro

expansion of human colonic stem cells // *Nature Medicine*, 2011, Vol. 17, No. 10, P. 1225-1227.

161. Spence J.R., Mayhew C.N., Rankin S.A., Kuhar M.F., Vallance J.E., Tolle K., Hoskins E.E., Kalinichenko V.V., Wells S.I., Zorn A.M., Shroyer N.F., Wells J.M. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro // *Nature*, 2011, Vol. 470, No. 7332, P. 105-109.

162. Liu Y., Cromeens B.P., Wang Y., Fisher K., Johnson J., Chakroff J., Besner G.E. Comparison of Different In Vivo Incubation Sites to Produce Tissue-Engineered Small Intestine // *Tissue Engineering Part A*, 2018, Vol. 24, No. 13-14, P. 1138-1147.

163. Cortez A.R., Poling H.M., Brown N.E., Singh A., Mahe M.M., Helmrath M.A. Transplantation of human intestinal organoids into the mouse mesentery: A more physiologic and anatomic engraftment site // *Surgery*, 2018, Vol. 164, Transplantation of human intestinal organoids into the mouse mesentery, No. 4, P. 643-650.

164. Aarnoutse R., Ziemons J., Penders J., Rensen S.S., Vos-Geelen J. de, Smidt M.L. The Clinical Link between Human Intestinal Microbiota and Systemic Cancer Therapy // *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, Vol. 20, No. 17, P. 4145.

165. Larsson E., Tremaroli V., Lee Y.S., Koren O., Nookaew I., Fricker A., Nielsen J., Ley R.E., Bäckhed F. Analysis of gut microbial regulation of host gene expression along the length of the gut and regulation of gut microbial ecology through MyD88 // *Gut*, 2012, Vol. 61, No. 8, P. 1124-1131.

166. Morrison D.J., Preston T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism // *Gut Microbes*, 2016, Vol. 7, No. 3, P. 189-200.

167. Walker R.W., Clemente J.C., Peter I., Loos R.J.F. The prenatal gut microbiome: are we colonized with bacteria in utero?: Colonization of the gut microbiome in utero // *Pediatric Obesity*, 2017, Vol. 12, The prenatal gut microbiome, P. 3-17.

168. Zhang M., Sun K., Wu Y., Yang Y., Tso P., Wu Z. Interactions between Intestinal Microbiota and Host Immune Response in Inflammatory Bowel Disease // *Frontiers in Immunology*, 2017, T. 8, C. 942.

169. Clemente J.C., Ursell L.K., Parfrey L.W., Knight R. The Impact of the Gut Microbiota on Human Health: An Integrative View // *Cell*, 2012, Vol. 148, The Impact of the Gut Microbiota on Human Health, No. 6, P. 1258-1270.
170. Дудун А., Бонарцев А., Жаркова И., Воинова В. Роль кишечной микробиоты в лечении различных заболеваний и антибактериальные препараты нового поколения. – Общество с ограниченной ответственностью "Издательство «Мир науки», 2020. – 129 с.
171. Hiergeist A., Gläsner J., Reischl U., Gessner A. Analyses of Intestinal Microbiota: Culture versus Sequencing: Figure 1 // *ILAR Journal*, 2015, Vol. 56, Analyses of Intestinal Microbiota, No. 2, P. 228-240.
172. Rajilić-Stojanović M., Vos W.M. de The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota // *FEMS Microbiology Reviews*, 2014, Vol. 38, No. 5, P. 996-1047.
173. Almeida A., Mitchell A.L., Boland M., Forster S.C., Gloor G.B., Tarkowska A., Lawley T.D., Finn R.D. A new genomic blueprint of the human gut microbiota // *Nature*, 2019, Vol. 568, No. 7753, P. 499-504.
174. Pace N.R., Stahl D.A., Lane D.J., Olsen G.J. The Analysis of Natural Microbial Populations by Ribosomal RNA Sequences // *Advances in Microbial Ecology* / : *Advances in Microbial Ecology* / ред. K.C. Marshall. – Boston, MA: Springer US, 1986. – Т. 9. – С. 1-55.
175. Alves L. de F., Westmann C.A., Lovate G.L., Siqueira G.M.V. de, Borelli T.C., Guazzaroni M.-E. Metagenomic Approaches for Understanding New Concepts in Microbial Science // *International Journal of Genomics*, 2018, Vol. 2018, P. 1-15.
176. Handelsman J., Rondon M.R., Brady S.F., Clardy J., Goodman R.M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products // *Chemistry & Biology*, 1998, Vol. 5, Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes, No. 10, P. R245-R249.
177. Sleator R.D., Shortall C., Hill C. Metagenomics // *Letters in Applied Microbiology*, 2008, Vol. 47, No. 5, P. 361-366.

178. Handelsman J. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2005, Vol. 69, Metagenomics, No. 1, P. 195-195.
179. Tringe S.G. Comparative Metagenomics of Microbial Communities // *Science*, 2005, Vol. 308, No. 5721, P. 554-557.
180. Vieites J.M., Guazzaroni M.-E., Beloqui A., Golyshin P.N., Ferrer M. Metagenomics approaches in systems microbiology // *FEMS Microbiology Reviews*, 2009, Vol. 33, No. 1, P. 236-255.
181. Schmeisser C., Steele H., Streit W.R. Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes // *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, Vol. 75, No. 5, P. 955-962.
182. Guazzaroni M., Silva-Rocha R., Ward R.J. Synthetic biology approaches to improve biocatalyst identification in metagenomic library screening // *Microbial Biotechnology*, 2015, Vol. 8, No. 1, P. 52-64.
183. Louca S., Polz M.F., Mazel F., Albright M.B.N., Huber J.A., O'Connor M.I., Ackermann M., Hahn A.S., Srivastava D.S., Crowe S.A., Doebeli M., Parfrey L.W. Function and functional redundancy in microbial systems // *Nature Ecology & Evolution*, 2018, Vol. 2, No. 6, P. 936-943.
184. Li M., Wang B., Zhang M., Rantalainen M., Wang S., Zhou H., Zhang Y., Shen J., Pang X., Zhang M., Wei H., Chen Y., Lu H., Zuo J., Su M., Qiu Y., Jia W., Xiao C., Smith L.M., Yang S., Holmes E., Tang H., Zhao G., Nicholson J.K., Li L., Zhao L. Symbiotic gut microbes modulate human metabolic phenotypes // *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, Vol. 105, No. 6, P. 2117-2122.
185. Langille M.G.I., Zaneveld J., Caporaso J.G., McDonald D., Knights D., Reyes J.A., Clemente J.C., Burkepile D.E., Vega Thurber R.L., Knight R., Beiko R.G., Huttenhower C. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences // *Nature Biotechnology*, 2013, Vol. 31, No. 9, P. 814-821.
186. Hunt D.E., Lin Y., Church M.J., Karl D.M., Tringe S.G., Izzo L.K., Johnson Z.I. Relationship between Abundance and Specific Activity of Bacterioplankton in Open

Ocean Surface Waters // Applied and Environmental Microbiology, 2013, Vol. 79, No. 1, P. 177-184.

187. Sanger F., Air G.M., Barrell B.G., Brown N.L., Coulson A.R., Fiddes J.C., Hutchison C.A., Slocombe P.M., Smith M. Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA // Nature, 1977, Vol. 265, No. 5596, P. 687-695.

188. Sunagawa S., Coelho L.P., Chaffron S., Kultima J.R., Labadie K., Velayoudon D., et al. Structure and function of the global ocean microbiome // Science, 2015, Vol. 348, No. 6237, P. 1261359-1261359.

189. Klindworth A., Pruesse E., Schweer T., Peplies J., Quast C., Horn M., Glöckner F.O. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies // Nucleic Acids Research, 2013, Vol. 41, No. 1, P. e1-e1.

190. Oulas A., Pavludi C., Polymenakou P., Pavlopoulos G.A., Papanikolaou N., Kotoulas G., Arvanitidis C., Iliopoulos Ioannis Metagenomics: Tools and Insights for Analyzing Next-Generation Sequencing Data Derived from Biodiversity Studies // Bioinformatics and Biology Insights, 2015, Vol. 9, Metagenomics, P. BBI.S12462.

191. Kircher M., Kelso J. High-throughput DNA sequencing - concepts and limitations // BioEssays, 2010, Vol. 32, No. 6, P. 524-536.

192. Backhed F. Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine // Science, 2005, Vol. 307, No. 5717, P. 1915-1920.

193. Kataoka K. The intestinal microbiota and its role in human health and disease // The Journal of Medical Investigation, 2016, Vol. 63, No. 1.2, P. 27-37.

194. Cryan J.F., Dinan T.G. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour // Nature Reviews Neuroscience, 2012, Vol. 13, Mind-altering microorganisms, No. 10, P. 701-712.

195. Rajilić-Stojanović M. Function of the microbiota // Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, 2013, Vol. 27, No. 1, P. 5-16.

196. Kamada N., Chen G.Y., Inohara N., Núñez G. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota // Nature Immunology, 2013, Vol. 14, No. 7, P. 685-690.

197. Servin A.L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens // *FEMS Microbiology Reviews*, 2004, Vol. 28, No. 4, P. 405-440.
198. Jandhyala S.M. Role of the normal gut microbiota // *World Journal of Gastroenterology*, 2015, Vol. 21, No. 29, P. 8787.
199. Grainger J., Daw R., Wemyss K. Systemic instruction of cell-mediated immunity by the intestinal microbiome // *F1000Research*, 2018, Vol. 7, P. 1910.
200. Belkaid Y., Harrison O.J. Homeostatic Immunity and the Microbiota // *Immunity*, 2017, Vol. 46, No. 4, P. 562-576.
201. Ellegaard K.M., Engel P. Beyond 16S rRNA Community Profiling: Intra-Species Diversity in the Gut Microbiota // *Frontiers in Microbiology*, 2016, T. 7, Beyond 16S rRNA Community Profiling.
202. Fulde M., Hornef M.W. Maturation of the enteric mucosal innate immune system during the postnatal period // *Immunological Reviews*, 2014, Vol. 260, No. 1, P. 21-34.
203. Ijssennagger N., Belzer C., Hooiveld G.J., Dekker J., Mil S.W.C. van, Müller M., Kleerebezem M., Meer R. van der Gut microbiota facilitates dietary heme-induced epithelial hyperproliferation by opening the mucus barrier in colon // *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015, Vol. 112, No. 32, P. 10038-10043.
204. Reinhardt C., Bergentall M., Greiner T.U., Schaffner F., Östergren-Lundén G., Petersen L.C., Ruf W., Bäckhed F. Tissue factor and PAR1 promote microbiota-induced intestinal vascular remodelling // *Nature*, 2012, Vol. 483, No. 7391, P. 627-631.
205. Neuman H., Debelius J.W., Knight R., Koren O. Microbial endocrinology: the interplay between the microbiota and the endocrine system // *FEMS Microbiology Reviews*, 2015, Vol. 39, Microbial endocrinology, No. 4, P. 509-521.
206. Bäckhed F., Roswall J., Peng Y., Feng Q., Jia H., Kovatcheva-Datchary P., Li Y., Xia Y., Xie H., Zhong H., Khan M.T., Zhang J., Li J., Xiao L., Al-Aama J., Zhang D., Lee Y.S., Kotowska D., Colding C., Tremaroli V., Yin Y., Bergman S., Xu X., Madsen L., Kristiansen K., Dahlgren J., Wang J. Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life // *Cell Host & Microbe*, 2015, Vol. 17, No. 6, P. 852.

207. Yatsunenکو T., Rey F.E., Manary M.J., Trehan I., Dominguez-Bello M.G., Contreras M., Magris M., Hidalgo G., Baldassano R.N., Anokhin A.P., Heath A.C., Warner B., Reeder J., Kuczynski J., Caporaso J.G., Lozupone C.A., Lauber C., Clemente J.C., Knights D., Knight R., Gordon J.I. Human gut microbiome viewed across age and geography // *Nature*, 2012, Vol. 486, No. 7402, P. 222-227.
208. Cheng J., Ringel-Kulka T., Heikamp-de Jong I., Ringel Y., Carroll I., Vos W.M. de, Salojärvi J., Satokari R. Discordant temporal development of bacterial phyla and the emergence of core in the fecal microbiota of young children // *The ISME Journal*, 2016, Vol. 10, No. 4, P. 1002-1014.
209. Hollister E.B., Riehle K., Luna R.A., Weidler E.M., Rubio-Gonzales M., Mistretta T.-A., Raza S., Doddapaneni H.V., Metcalf G.A., Muzny D.M., Gibbs R.A., Petrosino J.F., Shulman R.J., Versalovic J. Structure and function of the healthy pre-adolescent pediatric gut microbiome // *Microbiome*, 2015, Vol. 3, No. 1, P. 36.
210. Lynch S.V., Pedersen O. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease // *New England Journal of Medicine*, 2016, Vol. 375, No. 24, P. 2369-2379.
211. Claesson M.J., Jeffery I.B., Conde S., Power S.E., O'Connor E.M., Cusack S., Harris H.M.B., Coakley M., Lakshminarayanan B., O'Sullivan O., Fitzgerald G.F., Deane J., O'Connor M., Harnedy N., O'Connor K., O'Mahony D., Sinderen D. van, Wallace M., Brennan L., Stanton C., Marchesi J.R., Fitzgerald A.P., Shanahan F., Hill C., Ross R.P., O'Toole P.W. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly // *Nature*, 2012, Vol. 488, No. 7410, P. 178-184.
212. Klimenko N., Tyakht A., Popenko A., Vasiliev A., Altukhov I., Ischenko D., Shashkova T., Efimova D., Nikogosov D., Osipenko D., Musienko S., Selezneva K., Baranova A., Kurilshikov A., Toshchakov S., Korzhenkov A., Samarov N., Shevchenko M., Tepliuk A., Alexeev D. Microbiome Responses to an Uncontrolled Short-Term Diet Intervention in the Frame of the Citizen Science Project // *Nutrients*, 2018, Vol. 10, No. 5, P. 576.
213. Wang S., Charbonnier L.-M., Noval Rivas M., Georgiev P., Li N., Gerber G., Bry L., Chatila T.A. MyD88 Adaptor-Dependent Microbial Sensing by Regulatory T Cells

Promotes Mucosal Tolerance and Enforces Commensalism // *Immunity*, 2015, Vol. 43, No. 2, P. 289-303.

214. David L.A., Maurice C.F., Carmody R.N., Gootenberg D.B., Button J.E., Wolfe B.E., Ling A.V., Devlin A.S., Varma Y., Fischbach M.A., Biddinger S.B., Dutton R.J., Turnbaugh P.J. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome // *Nature*, 2014, Vol. 505, No. 7484, P. 559-563.

215. Johnson C.C., Ownby D.R., Alford S.H., Havstad S.L., Williams L.K., Zoratti E.M., Peterson E.L., Joseph C.L.M. Antibiotic exposure in early infancy and risk for childhood atopy // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2005, Vol. 115, No. 6, P. 1218-1224.

216. Knights D., Silverberg M.S., Weersma R.K., Gevers D., Dijkstra G., Huang H., Tyler A.D., Sommeren S. van, Imhann F., Stempak J.M., Huang H., Vangay P., Al-Ghalith G.A., Russell C., Sauk J., Knight J., Daly M.J., Huttenhower C., Xavier R.J. Complex host genetics influence the microbiome in inflammatory bowel disease // *Genome Medicine*, 2014, Vol. 6, No. 12, P. 107.

217. Hansen T.H., Gøbel R.J., Hansen T., Pedersen O. The gut microbiome in cardio-metabolic health // *Genome Medicine*, 2015, Vol. 7, No. 1, P. 33.

218. Eckburg P.B. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora // *Science*, 2005, Vol. 308, No. 5728, P. 1635-1638.

219. Wang X., Heazlewood S.P., Krause D.O., Florin T.H.J. Molecular characterization of the microbial species that colonize human ileal and colonic mucosa by using 16S rDNA sequence analysis // *Journal of Applied Microbiology*, 2003, Vol. 95, No. 3, P. 508-520.

220. Bonartseva G.A., Akulina E.A., Myshkina V.L., Voinova V.V., Makhina T.K., Bonartsev A.P. Alginate biosynthesis by *Azotobacter* bacteria // *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2017, Vol. 53, No. 1, P. 52-59.

221. Funari N., Ozawa H., Hirata A., Horinouchi S. Phenolic lipid synthesis by type III polyketide synthases is essential for cyst formation in *Azotobacter vinelandii* // *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, Vol. 103, No. 16, P. 6356-6361.

222. Tilak K.V.B.R., Krishna Murti G.S.R. Nitrogen Fixation by *Azospirillum* spp. in Certain Saline and Saline-Alkali Soils of India // Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Zweite Naturwissenschaftliche Abteilung: Mikrobiologie der Landwirtschaft, der Technologie und des Umweltschutzes, 1981, Vol. 136, No. 8, P. 641-643.
223. Akoulina E., Dudun A., Bonartsev A., Bonartseva G., Voinova V. Effect of bacterial alginate on growth of mesenchymal stem cells // International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials, 2019, Vol. 68, No. 1-3, P. 115-118.
224. Martinsen A., Skjåk-Bræk G., Smidsrød O., Zanetti F., Paoletti S. Comparison of different methods for determination of molecular weight and molecular weight distribution of alginates // Carbohydrate Polymers, 1991, Vol. 15, No. 2, P. 171-193.
225. Akita S., Einaga Y., Miyaki Y., Fujita H. Solution Properties of Poly(D- β -hydroxybutyrate). 1. Biosynthesis and Characterization // Macromolecules, 1976, Vol. 9, No. 5, P. 774-780.
226. Bonartsev A.P., Yakovlev S.G., Zharkova I.I., Boskhomdzhiev A.P., Bagrov D.V., Myshkina V.L., Makhina T.K., Kharitonova E.P., Samsonova O.V., Feofanov A.V., Voinova V.V., Zernov A.L., Efremov Y.M., Bonartseva G.A., Shaitan K.V., Kirpichnikov M.P. Cell attachment on poly(3-hydroxybutyrate)-poly(ethylene glycol) copolymer produced by *Azotobacter chroococcum* 7B // BMC Biochemistry, 2013, Vol. 14, No. 1, P. 12.
227. Becker T.A., Kipke D.R., Brandon T. Calcium alginate gel: a biocompatible and mechanically stable polymer for endovascular embolization // Journal of Biomedical Materials Research, 2001, T. 54, Calcium alginate gel, N 1, C. 76-86.
228. Yi J., Nguyen K.C.T., Wang W., Yang W., Pan M., Lou E., Major P.W., Le L.H., Zeng H. Polyacrylamide/Alginate double-network tough hydrogels for intraoral ultrasound imaging // J. Colloid Interface Sci, 2020, Vol. 578, P. 598–607.
229. Прохоров Г., Фёдоров Н. Прецизионный кишечный шов в условиях перитонита // Казанский медицинский журнал, 2010, Т. 91, N 2, С. 210-212.

230. Винник Ю., Маркелова Н., Соляников А. Анализ эффективности применения биополимера тахокомб для профилактики несостоятельности кишечных анастомозов // Врач-аспирант, 2013, Т. 57, N 2.1, С. 130-134.
231. Шуралкин Б., Горский В., Леоненко И. Проблема надежности кишечного шва // Consilium Medicum, 2004, Т. 6, N 6, С. 442-445.
232. Nickkholgh A., Contin P., Abu-Elmagd K., Golriz M., Gotthardt D., Morath C., Schemmer P., Mehrabi A. Intestinal transplantation: review of operative techniques // Clinical Transplantation, 2013, Vol. 27, Intestinal transplantation, P. 56-65.
233. Bosmans J.W.A.M., Jongen A.C.H.M., Boonen B.T.C., Rijn S. van, Scognamiglio F., Stucchi L., Gijbels M.J.J., Marsich E., Bouvy N.D. Comparison of three different application routes of butyrate to improve colonic anastomotic strength in rats // International Journal of Colorectal Disease, 2017, Vol. 32, No. 3, P. 305-313.
234. Renaud G., Stenzel U., Maricic T., Wiebe V., Kelso J. deML: robust demultiplexing of Illumina sequences using a likelihood-based approach // Bioinformatics, 2015, Vol. 31, deML, No. 5, P. 770-772.
235. Schloss P.D., Westcott S.L., Ryabin T., Hall J.R., Hartmann M., Hollister E.B., Lesniewski R.A., Oakley B.B., Parks D.H., Robinson C.J., Sahl J.W., Stres B., Thallinger G.G., Van Horn D.J., Weber C.F. Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities // Applied and Environmental Microbiology, 2009, Vol. 75, Introducing mothur, No. 23, P. 7537-7541.
236. McMurdie P.J., Holmes S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data // PLoS ONE, 2013, Vol. 8, phyloseq, No. 4, P. e61217.
237. Liland K.H., Vinje H., Snipen L. microclass: an R-package for 16S taxonomy classification // BMC Bioinformatics, 2017, Vol. 18, microclass, No. 1, P. 172.
238. Rohart F., Gautier B., Singh A., Lê Cao K.-A. mixOmics: An R package for 'omics feature selection and multiple data integration // PLOS Computational Biology, 2017, Vol. 13, mixOmics, No. 11, P. e1005752.

239. Castillo T., López I., Flores C., Segura D., García A., Galindo E., Peña C. Oxygen uptake rate in alginate producer (algU⁺) and nonproducer (algU⁻) strains of *Azotobacter vinelandii* under nitrogen-fixation conditions // *Journal of Applied Microbiology*, 2018, Vol. 125, No. 1, P. 181-189.
240. Díaz-Barrera A., Martínez F., Guevara Pezoa F., Acevedo F. Evaluation of Gene Expression and Alginate Production in Response to Oxygen Transfer in Continuous Culture of *Azotobacter vinelandii* // *PLoS ONE*, 2014, Vol. 9, No. 8, P. e105993.
241. Dalton H., Postgate J.R. Effect of Oxygen on Growth of *Azotobacter chroococcum* in Batch and Continuous Cultures // *Journal of General Microbiology*, 1968, Vol. 54, No. 3, P. 463-473.
242. Dalton H., Postgate J.R. Growth and Physiology of *Azotobacter chroococcum* in Continuous Culture // *Journal of General Microbiology*, 1969, Vol. 56, No. 3, P. 307-319.
243. Tsai J.C., Aladegbami S.L., Vela G.R. Phosphate-limited culture of *Azotobacter vinelandii*. // *Journal of Bacteriology*, 1979, Vol. 139, No. 2, P. 639-645.
244. Díaz-Barrera A., Silva P., Berrios J., Acevedo F. Manipulating the molecular weight of alginate produced by *Azotobacter vinelandii* in continuous cultures // *Bioresource Technology*, 2010, Vol. 101, No. 23, P. 9405-9408.
245. Flores C., Moreno S., Espín G., Peña C., Galindo E. Expression of alginases and alginate polymerase genes in response to oxygen, and their relationship with the alginate molecular weight in *Azotobacter vinelandii* // *Enzyme and Microbial Technology*, 2013, Vol. 53, No. 2, P. 85-91.
246. Trujillo-Roldán M.A., Moreno S., Espín G., Galindo E. The roles of oxygen and alginate-lyase in determining the molecular weight of alginate produced by *Azotobacter vinelandii* // *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, T. 63, N 6, C. 742-747.
247. Senior P.J., Beech G.A., Ritchie G.A.F., Dawes E.A. The role of oxygen limitation in the formation of poly- β -hydroxybutyrate during batch and continuous culture of *Azotobacter beijerinckii* // *Biochemical Journal*, 1972, Vol. 128, No. 5, P. 1193-1201.
248. Carter I.S., Dawes E.A. Effect of Oxygen Concentration and Growth Rate on Glucose Metabolism, Poly- β -hydroxybutyrate Biosynthesis and Respiration of

Azotobacter beijerinckii // Journal of General Microbiology, 1979, Vol. 110, No. 2, P. 393-400.

249. Pyla R., Kim T.-J., Silva J.L., Jung Y.-S. Overproduction of poly- β -hydroxybutyrate in the *Azotobacter vinelandii* mutant that does not express small RNA ArrF // Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, Vol. 84, No. 4, P. 717-724.

250. Page WilliamJ. Production of poly- β -hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* strain UWD during growth on molasses and other complex carbon sources // Applied Microbiology and Biotechnology, 1989, Vol. 31, Production of poly- β , No. 4.

251. Page W.J., Knosp O. Hyperproduction of Poly- β -Hydroxybutyrate during Exponential Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD // Applied and Environmental Microbiology, 1989, Vol. 55, No. 6, P. 1334-1339.

252. Liu J., Lee F., Lin C., Yao X., Davenport J.W., Wong T. Alternative Function of the Electron Transport System in *Azotobacter vinelandii*: Removal of Excess Reductant by the Cytochrome d Pathway. // Applied and environmental microbiology, 1995, Vol. 61, Alternative Function of the Electron Transport System in *Azotobacter vinelandii*, No. 11, P. 3998-4003.

253. Moshiri F., Crouse B.R., Johnson M.K., Maier R.J. The “nitrogenase-protective” FeSII protein of *Azotobacter vinelandii*: overexpression, characterization, and crystallization // Biochemistry, 1995, Vol. 34, The “nitrogenase-protective” FeSII protein of *Azotobacter vinelandii*, No. 40, P. 12973-12982.

254. Reusch R.N., Sadoff H.L. Lipid metabolism during encystment of *Azotobacter vinelandii*. // Journal of Bacteriology, 1981, Vol. 145, No. 2, P. 889-895.

255. Lozano E., Galindo E., Peña C.F. Oxygen transfer rate during the production of alginate by *Azotobacter vinelandii* under oxygen-limited and non oxygen-limited conditions // Microbial Cell Factories, 2011, Vol. 10, No. 1, P. 13.

256. Millán M., Segura D., Galindo E., Peña C. Molecular mass of poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) produced by *Azotobacter vinelandii* is determined by the ratio of synthesis and degradation under fixed dissolved oxygen tension // Process Biochemistry, 2016, Vol. 51, No. 8, P. 950-958.

257. Martínez-Gómez F., Mansilla A., Matsuhira B., Matulewicz M.C., Troncoso-Valenzuela M.A. Chiroptical characterization of homopolymeric block fractions in alginates // *Carbohydrate Polymers*, 2016, Vol. 146, P. 90-101.
258. Aarstad O.A., Stanisci A., Sætrum G.I., Tøndervik A., Sletta H., Aachmann F.L., Skjåk-Bræk G. Biosynthesis and Function of Long Guluronic Acid-Blocks in Alginate Produced by *Azotobacter vinelandii* // *Biomacromolecules*, 2019, Vol. 20, No. 4, P. 1613-1622.
259. Stanisci A., Tøndervik A., Gaardløs M., Lervik A., Skjåk-Bræk G., Sletta H., Aachmann F.L. Identification of a Pivotal Residue for Determining the Block Structure-Forming Properties of Alginate C-5 Epimerases // *ACS Omega*, 2020, Vol. 5, No. 8, P. 4352-4361.
260. Castillo T., Heinzle E., Peifer S., Schneider K., Peña M C.F. Oxygen supply strongly influences metabolic fluxes, the production of poly(3-hydroxybutyrate) and alginate, and the degree of acetylation of alginate in *Azotobacter vinelandii* // *Process Biochemistry*, 2013, Vol. 48, No. 7, P. 995-1003.
261. Díaz-Barrera A., Maturana N., Pacheco-Leyva I., Martínez I., Altamirano C. Different responses in the expression of alginases, alginate polymerase and acetylation genes during alginate production by *Azotobacter vinelandii* under oxygen-controlled conditions // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2017, Vol. 44, No. 7, P. 1041-1051.
262. Soares J.P., Santos J.E., Chierice G.O., Cavalheiro E.T.G. Thermal behavior of alginic acid and its sodium salt // *Eclética Química*, 2004, T. 29, N 2, C. 57-64.
263. Bajas D., Vlase G., Mateescu M., Grad O.A., Bunoiu M., Vlase T., Avram C. Formulation and Characterization of Alginate-Based Membranes for the Potential Transdermal Delivery of Methotrexate // *Polymers*, 2021, Vol. 13, No. 1, P. 161.
264. Sabbagh H.A.K., Hussein-Al-Ali S.H., Hussein M.Z., Abudayeh Z., Ayoub R., Abudoleh S.M. A Statistical Study on the Development of Metronidazole-Chitosan-Alginate Nanocomposite Formulation Using the Full Factorial Design // *Polymers*, 2020, Vol. 12, No. 4, P. 772.

265. Post E., Kleiner D., Oelze J. Whole cell respiration and nitrogenase activities in *Azotobacter vinelandii* growing in oxygen controlled continuous culture // Arch. Microbiol, 1983, Vol. 134, P. 68–72.
266. Velázquez-Sánchez C., Espín G., Peña C., Segura D. The Modification of Regulatory Circuits Involved in the Control of Polyhydroxyalkanoates Metabolism to Improve Their Production // Front. Bioeng. Biotechnol, 2020, Vol. 8, P. 386.
267. Lapouge K., Schubert M., Allain F.H.-T., Haas D. Gac/Rsm Signal Transduction Pathway of γ -Proteobacteria: From RNA Recognition to Regulation of Social Behaviour: Regulation of RsmA/CsrA Binding to RNA // Mol. Microbiol, 2007, Vol. 67, P. 241–253.
268. Manzo J., Cocotl-Yañez M., Tzontecomani T., Martínez V.M., Bustillos R., Velásquez C., Goiz Y., Solís Y., López L., Fuentes L.E., et al. Post-Transcriptional Regulation of the Alginate Biosynthetic Gene AlgD by the Gac/Rsm System in *Azotobacter vinelandii* // J. Mol. Microbiol. Biotechnol, 2011, Vol. 21, P. 147–159.
269. Soledad Lencina M.M., Iatridi Z., Villar M.A., Tsitsilianis C. Thermoresponsive hydrogels from alginate-based graft copolymers // European Polymer Journal, 2014, Vol. 61, P. 33-44.
270. Chalanqui M.J., Pentlavalli S., McCrudden C., Chambers P., Ziminska M., Dunne N., McCarthy H.O. Influence of alginate backbone on efficacy of thermo-responsive alginate-g-P(NIPAAm) hydrogel as a vehicle for sustained and controlled gene delivery // Materials Science and Engineering: C, 2019, Vol. 95, P. 409-421.
271. Matyash M., Despang F., Ikonomidou C., Gelinsky M. Swelling and Mechanical Properties of Alginate Hydrogels with Respect to Promotion of Neural Growth // Tissue Engineering Part C: Methods, 2014, Vol. 20, No. 5, P. 401-411.
272. Morrish C., Teimouri S., Istivan T., Kasapis S. Molecular characterisation of hot moulded alginate gels as a delivery vehicle for the release of entrapped caffeine // Food Hydrocolloids, 2020, Vol. 109, P. 106142.
273. Jang J., Seol Y.-J., Kim H.J., Kundu J., Kim S.W., Cho D.-W. Effects of alginate hydrogel cross-linking density on mechanical and biological behaviors for tissue

engineering // Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 2014, Vol. 37, P. 69-77.

274. Blandino A., Macías M., Cantero D. Formation of calcium alginate gel capsules: Influence of sodium alginate and CaCl₂ concentration on gelation kinetics // Journal of Bioscience and Bioengineering, 1999, Vol. 88, Formation of calcium alginate gel capsules, No. 6, P. 686-689.

275. Brus J., Urbanova M., Czernek J., Pavelkova M., Kubova K., Vyslouzil J., Abbrent S., Konefal R., Horský J., Vetchy D., Vyslouzil J., Kulich P. Structure and Dynamics of Alginate Gels Cross-Linked by Polyvalent Ions Probed via Solid State NMR Spectroscopy // Biomacromolecules, 2017, Vol. 18, No. 8, P. 2478-2488.

276. Donati I., Holtan S., Mørch Y.A., Borgogna M., Dentini M. New Hypothesis on the Role of Alternating Sequences in Calcium–Alginate Gels // Biomacromolecules, 2005, Vol. 6, No. 2, P. 1031-1040.

277. Solovieva E.V., Fedotov A.Y., Mamonov V.E., Komlev V.S., Panteleyev A.A. Fibrinogen-modified sodium alginate as a scaffold material for skin tissue engineering // Biomedical Materials, 2018, T. 13, N 2, C. 025007.

278. Zhu T., Jiang J., Zhao J., Chen S., Yan X. Regulating Preparation Of Functional Alginate-Chitosan Three-Dimensional Scaffold For Skin Tissue Engineering // International Journal of Nanomedicine, 2019, Vol. Volume 14, P. 8891-8903.

279. Steinbüchel A., ed. Biopolymers Online: Biology • Chemistry • Biotechnology • Applications. Biopolymers Online. – 1. – Wiley, 2005.

280. Bonartsev A.P., Boskhomodgiev A.P., Iordanskii A.L., Bonartseva G.A., Rebrov A.V., Makhina T.K., Myshkina V.L., Yakovlev S.A., Filatova E.A., Ivanov E.A., Bagrov D.V., Zaikov G.E. Hydrolytic Degradation of Poly(3-hydroxybutyrate), Polylactide and their Derivatives: Kinetics, Crystallinity, and Surface Morphology // Molecular Crystals and Liquid Crystals, 2012, Vol. 556, Hydrolytic Degradation of Poly(3-hydroxybutyrate), Polylactide and their Derivatives, No. 1, P. 288-300.

281. Zhang J., Feng D., Law H.K-W., Wu Y., Zhu G-H., Huang W-Y., Kang Y. Integrative Analysis of Gut Microbiota and Fecal Metabolites in Rats after Prednisone Treatment // Microbiol Spectr, 2021, Vol. 9, No. 3, P. e0065021.

282. Zhou Q., Sun T., Wu F., Li F., Liu Y., Li W., Dai N., Tan L., Li T., Song Y. Correlation of gut microbiota and neurotransmitters in a rat model of post-traumatic stress disorder // *Journal of Traditional Chinese Medical Sciences*, 2020, Vol. 7, No. 4, P. 375-385.
283. De Vuyst L., Leroy F. Cross-feeding between bifidobacteria and butyrate-producing colon bacteria explains bifidobacterial competitiveness, butyrate production, and gas production // *International Journal of Food Microbiology*, 2011, Vol. 149, No. 1, P. 73-80.
284. Mukherjee S., Joardar N., Sengupta S., Sinha Babu S.P. Gut microbes as future therapeutics in treating inflammatory and infectious diseases: Lessons from recent findings // *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2018, Vol. 61, Gut microbes as future therapeutics in treating inflammatory and infectious diseases, P. 111-128.
285. Yoon M.Y., Yoon S.S. Disruption of the Gut Ecosystem by Antibiotics // *Yonsei Medical Journal*, 2018, Vol. 59, No. 1, P. 4.
286. Feng P., Ye Z., Kakade A., Virk A., Li X., Liu P. A Review on Gut Remediation of Selected Environmental Contaminants: Possible Roles of Probiotics and Gut Microbiota // *Nutrients*, 2018, Vol. 11, A Review on Gut Remediation of Selected Environmental Contaminants, No. 1, P. 22.
287. Burke K.E., Lamont J.T. Clostridium difficile Infection: A Worldwide Disease // *Gut and Liver*, 2014, Vol. 8, Clostridium difficile Infection, No. 1, P. 1-6.
288. Shen A., Edwards A.N., Sarker M.R., Paredes-Sabja D. Sporulation and Germination in Clostridial Pathogens // *Microbiology Spectrum*, 2019, Vol. 7, No. 6.
289. Lopetuso L.R., Scaldaferri F., Petito V., Gasbarrini A. Commensal Clostridia: leading players in the maintenance of gut homeostasis // *Gut Pathogens*, 2013, Vol. 5, Commensal Clostridia, No. 1, P. 23.
290. Geirnaert A., Calatayud M., Grootaert C., Laukens D., Devriese S., Smagghe G., De Vos M., Boon N., Van de Wiele T. Butyrate-producing bacteria supplemented in vitro to Crohn's disease patient microbiota increased butyrate production and enhanced intestinal epithelial barrier integrity // *Scientific Reports*, 2017, Vol. 7, No. 1, P. 11450.

291. Lepage P., Häsler R., Spehlmann M.E., Rehman A., Zvirbliene A., Begun A., Ott S., Kupcinskas L., Doré J., Raedler A., Schreiber S. Twin Study Indicates Loss of Interaction Between Microbiota and Mucosa of Patients With Ulcerative Colitis // *Gastroenterology*, 2011, Vol. 141, No. 1, P. 227-236.
292. Reed A.D., Nethery M.A., Stewart A., Barrangou R., Theriot C.M. Strain-Dependent Inhibition of *Clostridioides difficile* by Commensal Clostridia Carrying the Bile Acid-Inducible (bai) Operon // *Journal of Bacteriology*, 2020, Vol. 202, No. 11, P. e00039-20, /jb/202/11/JB.00039-20.atom.
293. Ianiro G., Tilg H., Gasbarrini A. Antibiotics as deep modulators of gut microbiota: between good and evil // *Gut*, 2016, Vol. 65, Antibiotics as deep modulators of gut microbiota, No. 11, P. 1906-1915.
294. Mortensen B., Murphy C., O'Grady J., Lucey M., Elsafi G., Barry L., Westphal V., Wellejus A., Lukjancenko O., Eklund A.C., Nielsen H.B., Baker A., Damholt A., Hylckama Vlieg J.E.T. van, Shanahan F., Buckley M. *Bifidobacterium breve* Bif195 Protects Against Small-Intestinal Damage Caused by Acetylsalicylic Acid in Healthy Volunteers // *Gastroenterology*, 2019, Vol. 157, No. 3, P. 637-646.e4.
295. Zhong S., Zhang Z., Wang J., Lai Z., Pan L. [Effect of Bifidobacterial adhesin on lipopolysaccharide- and H₂O₂-induced proliferation and apoptosis of intestinal epithelial cells in vitro] // *Di 1 jun yi da xue xue bao = Academic journal of the first medical college of PLA*, 2004, T. 24, N 3, C. 264-268.
296. Cox L.M., Sohn J., Tyrrell K.L., Citron D.M., Lawson P.A., Patel N.B., Iizumi T., Perez-Perez G.I., Goldstein E.J.C., Blaser M.J. Description of two novel members of the family Erysipelotrichaceae: *Ileibacterium valens* gen. nov., sp. nov. and *Dubosiella newyorkensis*, gen. nov., sp. nov., from the murine intestine, and emendation to the description of *Faecalibacterium rodentium* // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2017, Vol. 67, Description of two novel members of the family Erysipelotrichaceae, No. 5, P. 1247-1254.
297. Floch M.H. The Role of Prebiotics and Probiotics in Gastrointestinal Disease // *Gastroenterology Clinics of North America*, 2018, Vol. 47, No. 1, P. 179-191.

298. O'Callaghan A., Sinderen D. van Bifidobacteria and Their Role as Members of the Human Gut Microbiota // *Frontiers in Microbiology*, 2016, T. 7.
299. Chassard C., Dapoigny M., Scott K.P., Crouzet L., Del'homme C., Marquet P., Martin J.C., Pickering G., Ardid D., Eschalier A., Dubray C., Flint H.J., Bernalier-Donadille A. Functional dysbiosis within the gut microbiota of patients with constipated-irritable bowel syndrome // *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2012, Vol. 35, No. 7, P. 828-838.
300. Dimidi E., Christodoulides S., Scott S.M., Whelan K. Mechanisms of Action of Probiotics and the Gastrointestinal Microbiota on Gut Motility and Constipation // *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 2017, Vol. 8, No. 3, P. 484-494.
301. Chang D.-H., Rhee M.-S., Ahn S., Bang B.-H., Oh J.E., Lee H.K., Kim B.-C. *Faecalibaculum rodentium* gen. nov., sp. nov., isolated from the faeces of a laboratory mouse // *Antonie van Leeuwenhoek*, 2015, Vol. 108, No. 6, P. 1309-1318.
302. Hindson J. Anti-tumorigenic endogenous gut bacteria in mice and humans // *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2020, Vol. 17, No. 3, P. 132-132.
303. Greetham H.L., Gibson G.R., Giffard C., Hippe H., Merkhoffer B., Steiner U., Falsen E., Collins M.D. *Allobaculum stercoricanis* gen. nov., sp. nov., isolated from canine feces // *Anaerobe*, 2004, Vol. 10, No. 5, P. 301-307.
304. Shin N.-R., Kang W., Tak E.J., Hyun D.-W., Kim P.S., Kim H.S., Lee J.-Y., Sung H., Whon T.W., Bae J.-W. *Blautia hominis* sp. nov., isolated from human faeces // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2018, Vol. 68, No. 4, P. 1059-1064.
305. Paek J., Shin Y., Kook J.-K., Chang Y.-H. *Blautia argi* sp. nov., a new anaerobic bacterium isolated from dog faeces // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2019, Vol. 69, No. 1, P. 33-38.
306. Jenq R.R., Taur Y., Devlin S.M., Ponce D.M., Goldberg J.D., Ahr K.F., Littmann E.R., Ling L., Gobourne A.C., Miller L.C., Docampo M.D., Peled J.U., Arpaia N., Cross J.R., Peets T.K., Lumish M.A., Shono Y., Dudakov J.A., Poeck H., Hanash A.M., Barker J.N., Perales M.-A., Giralt S.A., Pamer E.G., Brink M.R.M. van den Intestinal *Blautia*

Is Associated with Reduced Death from Graft-versus-Host Disease // *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2015, Vol. 21, No. 8, P. 1373-1383.

307. Fu X., Liu Z., Zhu C., Mou H., Kong Q. Nondigestible carbohydrates, butyrate, and butyrate-producing bacteria // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2019, Vol. 59, No. sup1, P. S130-S152.

308. Vital M., Karch A., Pieper D.H. Colonic Butyrate-Producing Communities in Humans: an Overview Using Omics Data // *mSystems*, 2017, Vol. 2, Colonic Butyrate-Producing Communities in Humans, No. 6, P. mSystems.00130-17, e00130-17.

309. Yutin N., Galperin M.Y. A genomic update on clostridial phylogeny: Gram-negative spore formers and other misplaced clostridia: Genomics update // *Environmental Microbiology*, 2013, A genomic update on clostridial phylogeny, P. n/a-n/a.

310. Fomenky B.E., Do D.N., Talbot G., Chiquette J., Bissonnette N., Chouinard Y.P., Lessard M., Ibeagha-Awemu E.M. Direct-fed microbial supplementation influences the bacteria community composition of the gastrointestinal tract of pre- and post-weaned calves // *Scientific Reports*, 2018, Vol. 8, No. 1, P. 14147.