

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Москва 2022

Работа выполнена в лаборатории биохимии азотфиксации и метаболизма азота Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

Научные руководители: **Бонарцева Гарина Александровна**

кандидат биологических наук

Официальные оппоненты: **Кураков Александр Васильевич**

доктор биологических наук, доцент, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», биологический факультет, заведующий кафедрой микологии и альгологии

Попов Анатолий Анатольевич

доктор химических наук, профессор, ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, заместитель директора по научной и научно-образовательной работе, заведующий лабораторией физико-химии композиций синтетических и природных полимеров

Тощаков Степан Владимирович

кандидат биологических наук, ФГБУ «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»», Курчатовский геномный центр, начальник лаборатории геномики прокариот

Защита состоится «23» декабря 2022 г. в 17⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета МГУ.015.2 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, МГУ, д. 1, стр. 12, биологический факультет, аудитория М-2.

Тел. 8(495)939-35-46 эл. почта: *nvkostina@mail.ru*

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/509568848/>

Автореферат разослан «17» ноября 2022 года.

Ученый секретарь

диссертационного совета МГУ.015.2,

к.б.н.



Н.В. Костина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В настоящее время использование эндопротезов и скаффолдов на основе биополимерных конструкций получило широкое применение в области тканевой инженерии. Физико-химические и биологические свойства биополимерных материалов позволяют использовать медицинские изделия на их основе для различных тканей в самом широком диапазоне: для мягкой соединительной, костной, мышечной, а в перспективе и для нервной ткани. Основные требования, которым должны удовлетворять биополимеры для их непосредственного использования в качестве имплантов или скаффолдов — это их способность к биосовместимости и биодеградации. Одними из таких биополимеров являются гидрофобный поли-3-оксибутират (ПОБ), относящийся семейству полиоксиалканоатов и гидрофильный экзополисахарид - альгинат. 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. 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.

Одним из важных, активно разрабатываемым применением различных биополимерных конструкций является регенерация толстого кишечника. Механические повреждения, воспалительные заболевания кишечника, множественный сепсис, болезнь Крона, язвенный колит, рак кишки и многие другие заболевания требуют современных методов лечения. 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. В настоящее время кишечную микробиоту можно представить в качестве отдельного органа, который принимает непосредственное участие в поддержании здоровья человека. 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.

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 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 молекулярной массы (ММ) и мономерного состава (М/Г) 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 антибиотиком 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.

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.

Степень достоверности 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. По результатам работы были опубликованы 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.

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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение. Во введении кратко изложена актуальность темы работы, научная новизна и практическая ценность работы.

Обзор литературы. В обзоре литературы описаны бактериальные полимеры - альгинат и поли-3-оксибутират, продуцируемые бактерией рода *Azotobacter*. Проведен обзор влияния различных условий культивирования на синтез альгинатов. Приведены примеры применения альгината и ПОБ в различных областях тканевой инженерии и медицины. Рассмотрены различные биополимерные конструкции для регенерации толстого кишечника. Продемонстрированы различные методики секвенирования и анализа кишечной микробиоты.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Биосинтез ПОБ и Альгината в полном факторном эксперименте (ПФЭ 2³) и определение физико-химических свойств синтезированных биополимеров.

Биосинтез ПОБ и Альгината при различных условиях. Синтез ПОБ и Альгината проводили микробиологическим способом. Продукентом для синтеза был выбран штамм *Azotobacter vinelandii* 12, так как данный микроорганизм способен к продукции двух полимеров одновременно. Культура *A. vinelandii* 12 представляет из себя колонии бактериальных клеток темно-оранжевого цвета, бактерии плеоморфны в

зависимости от условий окружающей среды, грамотрицательные, строгие аэробы, подвижные.

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, сахара — 20 г/л, agar — 20 г/л. Микробиологический инокулянт выращивали на жидкой среде Берка в качалочных колбах объемом 750 мл с содержанием 100 мл среды в течение 48 ч, при 28°C, pH среды – 7.2, возраст посевного материала - 1 сутки; объем внесенного посевного материала — 4%.

Согласно выбранным условиям культивирования ПФЭ 2³ стандартную среду Берка, состава: $MgSO_4$ — 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, сахара — 20 г/л, варьировали по трем параметрам, а именно, по концентрации фосфатов (K_2HPO_4 и KH_2PO_4), по концентрации сахара и по уровню аэрации за счет скорости перемешивания среды в качалочных колбах. 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, сахара и скорости перемешивания (Таблица 1).

Таблица 1. План полного факторного эксперимента (ПФЭ 2³).

Вариант	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7	№ 8
Уровни факторов	C-/P-/O-	C+/P-/O-	C-/P+/O-	C+/P+/O-	C-/P-/O+	C+/P-/O+	C-/P+/O+	C+/P+/O+
Сахароза г/л (X_1) (+) 35 (-) 15	-	+	-	+	-	+	-	+
K_2HPO_4 г/л (X_2) (+) 1.25 (-) 0.05	-	-	+	+	-	-	+	+
Аэрация г/л (X_3) (+) 210 (-) 150	-	-	-	-	+	+	+	+

Планирование всех возможных комбинаций в ПФЭ требует постановки 2ⁿ опытов, где n — количество исследуемых факторов. Данный полный факторный эксперимент (ПФЭ 2³) позволяет определить, какие факторы или их взаимодействия оказались ключевыми в синтезе альгината и ПОБ. 8 опытов в различных сочетаниях исследуемых факторов имели по три повторности с целью дальнейшего статистического анализа.

Выделение и очистка бактериального ПОБ и альгината. По функциям и физико-химическим свойствам альгината можно разделить на два типа: свободный и капсулярный альгинат. Свободный альгинат синтезируется и выделяется в среду, снижая концентрацию кислорода в среде и затрудняя его диффузию в культуральной жидкости *Azotobacter vinelandii* 12. Капсулярный альгинат покрывает стенку бактериальной клетки плотным полисахаридным слоем – капсулой, тем самым выполняя защитную функцию нитрогеназы от кислорода.

Первым этапом для выделения свободного альгината является разделение клеточной биомассы после выращивания и культуральной жидкости методом центрифугирования при 11000 g в течение 30 минут. Затем супернатант осаждали 3

объемами охлажденного 80% этилового спирта при 4400 g в течение 15 минут. Полученный осадок лиофилизировали в течение суток, используя лиофильную сушику (Martin Christ Alpha 1-2 LD plus, Германия). Капсулярный альгинат выделяли из клеточной биомассы путем добавления к ней 1M раствора NaCl и 100 mM EDTA 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. Супернатант получали центрифугированием полученной смеси при 11000 g в течение 30 минут. Далее супернатант осаждали 3 объемами охлажденного 80% этилового спирта при 4400 g в течение 15 минут, после чего полученный осадок лиофилизировали 24 часа. Заключительная стадия очистки свободного и капсулярного альгината заключалась в растворении осадков в 1M растворе NaCl и диализе полученного раствора против 1 л 0.1M NaCl в течение 30 часов. Для дополнительной очистки альгинатов супернатанты после диализа снова осаждали 3 объемами этилового спирта и затем альгинаты лиофилизировали.

Выделение ПОБ из клеточной биомассы осуществляли экстракцией хлороформом в течение 12 ч при 37 °С. Полученный экстракт отделяли от клеточных остатков фильтрацией и далее 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.

Определение физико-химических свойств полимеров.

Определение молекулярной массы ПОБ и Альгинатов. Молекулярную массу полимеров определяли методом вискозиметрии и вычисляли по уравнению Марка-Хаувинка-Куна.

Подготовка пленок ПОБ. 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). Толщина полимерных пленок составляла 50 ± 4 мкм.

ИК-спектроскопия альгинатов. Методом инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье (FTIR) были исследованы высокоочищенные бактериальные альгинаты. ИК-спектры регистрировали в режиме отражения в ИК-микроскопе Nupregion-2000, связанным с ИК- спектрометром IFS-66 v/s FTIR (Gecrystal, разрешение 2 см^{-1} , диапазон $4000\text{--}600 \text{ см}^{-1}$, сканирование – 50, “Bruker”, США).

¹H-ЯМР анализ ПОБ. Методом протонного магнитного резонанса была исследована химическая структура бактериального ПОБ. ПОБ растворяли в дейтерированном хлороформе (CDCl₃) 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 (CDCl₃), 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.

Термогравиметрический (ТГА) анализ ПОБ 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 (°С).

Формирование альгината кальция. Гидрогели альгината кальция были получены для исследования физических и реологических свойств. Раствор 1% альгината

натрия смешивали с 10% раствором CaCl₂ 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:

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

Реология альгинатного гидрогеля. Эксперименты по изучению механических свойств отобранных альгинатов из ПФЭ проводили на реометре MCR 302 (Anton Paar, Австрия). Исследования проводили 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 проводили 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 по формуле:

$$G^* = \sqrt{(G')^2 + (G'')^2}$$

Тест на водопоглощение ПОБ и альгинатного гидрогеля. Сухие образцы альгината кальция и ПОБ определенной массы (m₁) погружали в деионизированную воду (25 °C) на 3 часа. После удаления капель воды влажные образцы взвешивали. Водопоглощение гидрогеля альгината кальция и пленок ПОБ рассчитывали по формуле, где m₁ и m₂ - массы сухого и водонасыщенного образца соответственно:

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

где m₁ и m₂ - массы сухого и водонасыщенного образца соответственно.

Тест на цитотоксичность альгинатного гидрогеля. Для оценки на цитотоксичность, мезенхимальные стволовые клетки (МСК) были выращены в присутствии трех разных альгинатов, синтезированных бактерией *Azotobacter vinelandii* 12 в ПФЭ, а именно, низкомолекулярный свободный альгинат (около 100 кДа), капсулярный альгинат ММ = 212 кДа и капсулярный альгинат ММ = 574 кДа. Для сравнения с альгинатами бактериального происхождения использовали водорослевый альгинат (Merck (бывш. Sigma Aldrich), Германия) со средней ММ около 155 кДа. МСК, выращенные на пластике, использовали в качестве отрицательного контроля (НК). Гидрогели альгината кальция для цитотоксичности были заготовлены в виде сфер 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 (PBS). Далее альгинаты кальция в количестве 1 сферы на 1 лунку размещали на 96-луночном культуральном планшете с засеянными МСК в количестве 4000 клеток на лунку. Рост клеток 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). Количество жизнеспособных клеток определяли по калибровочной кривой, основанной на их ХТТ-реактивности. Результаты представляли как рост жизнеспособных клеток по отношению к положительному контролю, где к последнему не добавляли альгинатов.

Эндопротезирование конструкции на основе ПОБ и альгината в толстый кишечник крысам линии Wistar.

Инкапсуляция пробиотических бактерий в сферы из альгинатного гидрогеля.

Для имплантации биополимерной конструкции в толстый кишечник крысам линии Wistar сначала были получены сферы из альгинатного гидрогеля с включением в него пробиотических бактерий, а именно бактерий рода *Lactobacillus sp.* и *Bifidobacterium sp.* Альгинат перед инокуляцией пробиотических бактерий пастеризовали. Использовали 1% раствор альгината для инкапсулирования бактерий. Один грамм бактериального альгината растворяли в 90 мл MRS-бульона, затем проводили посев пробиотических бактерий. Посев производили по 10 мл суспензии бактерий, выращенных на MRS-бульоне для достижения 1% концентрации альгината; полученную смесь тщательно перемешивали на магнитной мешалке. Конечным этапом было внесение по каплям полученного раствора в 50 мМ раствор CaCl_2 . За счет ионотропного связывания ионов кальция с гулуруновыми мономерами формировались сферы, заполненные альгинатным гелем и бактериями. Затем сферы отмывали раствором для промывания и разведения (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 вышеперечисленных родов одновременно.

Получение 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. 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.

Эксперименты 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.

Имплантация конструкции ПОБ-Альгинат в виде заплаты в толстый кишечник крысам линии Wistar. Была разработана модель повреждения стенки толстого кишечника крысы in vivo с помощью хирургического метода с целью дальнейшего отбора фекальных образцов для 16S метагеномного анализа.

Для надежной фиксации заплаты в желудочно-кишечный тракте (ЖКТ) крысы использовали толстый кишечник. 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 производили лапаротомию и выведение толстого кишечника из брюшной полости с фиксацией участка толстого 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.

Повреждение толстого кишечника было проведено хирургическими ножницами по центру между двумя зажимами Кохера шириной в 3-4 мм. Затем на крысах был проведен операции на месте повреждения кишечника наложением кишечной заплаты длиной 1.5-2 см и шириной 0.5 см.

При наложении швов для закрытия поврежденного участка в толстом кишечнике был использован модифицированный шов Ламбера: использование стандартного шва было затруднено из-за того, что он захватывает только серозно-мышечную (внешний футляр) ткань кишечника, поэтому был использован модифицированный «сквозной» шов Ламбера (Рис. 1). Толща толстого кишечника прошивалась строго перпендикулярно.

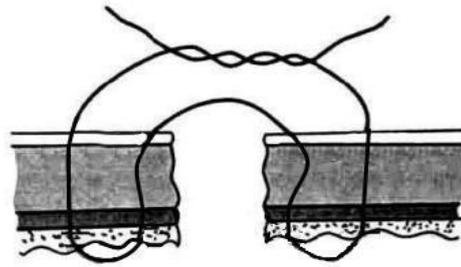


Рисунок 1. Сквозной шов Ламбера.

При 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 стрептоцидом.

После операции одной группе крыс с включенной конструкцией без сфер каждый день вводили раствор антибиотика азитромицина в концентрации 30 мг/кг веса крысы. Все послеоперационные крысы на третьи сутки получали жидкое углеводно-белковое питание. В итоге было создано семь экспериментальных групп крыс линии Wistar. После 7 суток животных умервщляли путем перенаркотизации и проводили релапоротомию 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.

16S метагеномное профилирование.

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) и 1200 мкл теплого лизирующего буфера. Все это перемешивали на вортексе до однородного состояния и гомогенизировали с помощью MiniBeadBeater (BioSpec Products, США) в течение 3 мин. Полученный лизат инкубировали при 70°C в течение 15 мин., после чего образцы центрифугировали 20 мин при 14000 об/мин. Далее супернатант помещали в эппендорфы и ставили в лед. К осадку снова добавляли лизирующий буфер и повторяли процесс. Супернатанты объединяли и добавляли к ним 2 объема 96% спирта и 1/10 объема 3М раствора ацетата натрия. Далее 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. Последний этап состоял в добавлении к элюатам РНКазы А (5 мг/мл) в соотношении к исходному раствору 1:200. Данная стадия необходима для удаления из образцов молекул РНК. Образцы с РНКазой инкубировали 1 час при 37°C и полученный раствор ДНК хранили при -20°C .

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 амплифицировали при помощи форвардного праймера Forward515 и реверсного праймера Reverse806.

Непосредственно перед амплификацией, образцы ДНК были разведены в 500 раз деонизированной 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, США).

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. Очищенные ампликоны смешивали эквимолярно 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).

Биоинформатический анализ. По завершении секвенирования был осуществлен анализ данных в серии различных открытых биоинформатических программных обеспечений (ПО).

Статистический анализ. Для статистической оценки данных был реализован непараметрический критерий Краскела-Уоллиса с использованием пакета tidyverse в среде R. Полученные данные представляли как среднее \pm SD (стандартная ошибка среднего). Для подсчета и визуализации метагеномных данных были использованы пакеты reshape2, vegan, plyr, scales, ggConvexHull и ggfortify в языке R. Критерием отбора достоверных различий между группами было $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

Биосинтез альгината и ПОБ.

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

Синтез ПОБ и альгинатов в ПФЭ 2³. Динамика роста штамма *Azotobacter vinelandii* 12 в жидкой среде Берка в течение 72 часов заметно различалась среди восьми вариантов опыта в ПФЭ 2³ (Рис. 2А).

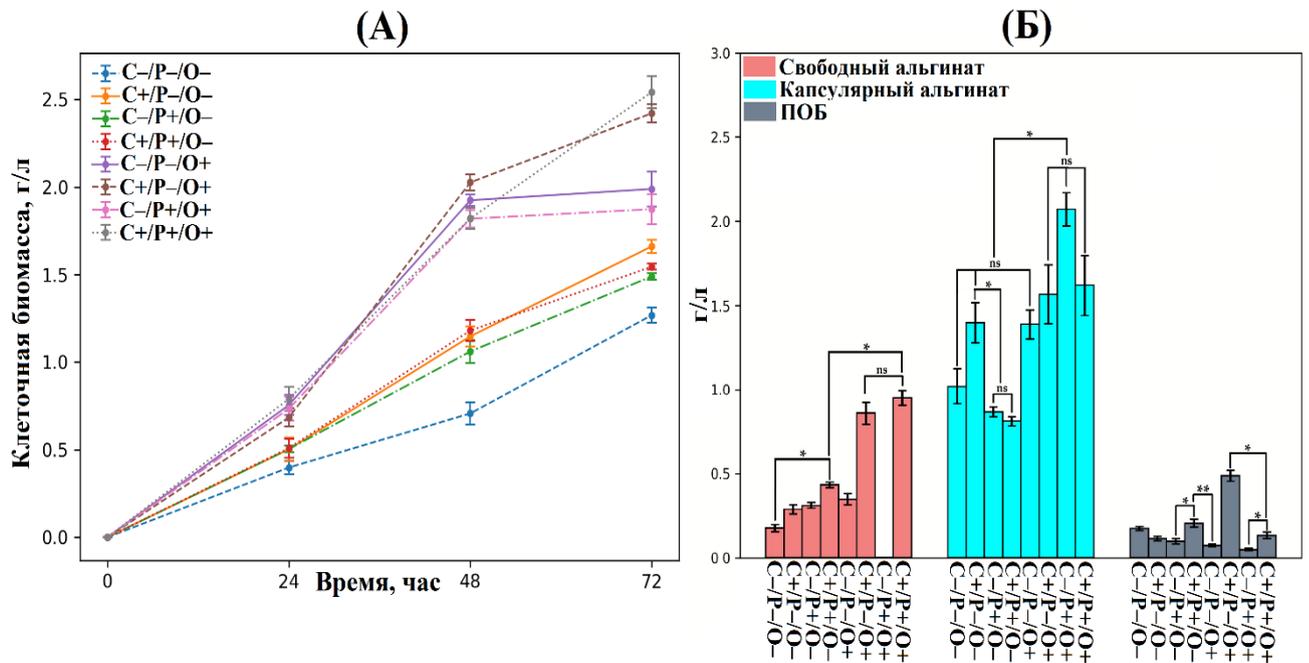


Рисунок 2. А) Динамика роста *Azotobacter vinelandii* 12 в полном факторном эксперименте ПФЭ 2³. Б) Общий выход свободного альгината, капсулярного альгината и ПОБ в ПФЭ 2³.

Как видно из результатов, представленных на рисунке 2А, можно провести четкую границу между экспериментами с низкой аэрацией (О-) и высокой аэрацией (О+). Эти результаты ясно показывают, что бактерии более активно растут при высоких концентрациях молекулярного кислорода, что связано с тем, что бактерии рода *Azotobacter sp.* являются строгими аэробами. Из результатов также можно сделать вывод, что бактерии при высокой аэрации и при низких концентрациях сахарозы не имеют достаточно источника углерода для постоянного экспоненциального роста и поэтому через 48 часов их рост переходит в стационарную фазу (С-/О+).

Данные по синтезу полимеров в конце ферментации ПФЭ 2³ бактериальными клетками, также как и по динамике роста бактерий, были разнородны (Рис. 2Б).

Свободный альгинат, который синтезируется и выделяется непосредственно в среду, показал высокие результаты синтеза в вариантах ПФЭ, соответствующих высоким концентрациям сахарозы и высокой аэрации. Эти результаты можно объяснить тем, что при высоких концентрациях растворенного кислорода увеличивается скорость потребления источника углерода бактериями *Azotobacter sp.* Таким образом можно предположить, что культивирование при высоких уровнях аэрации и высоких концентрациях сахарозы увеличивает скорость потребления сахарозы микроорганизмами и индуцирует синтез альгинат-лиаз. Также стоит заметить, что максимальная активность альгинат-лиаз достигается в логарифмическую фазу клеточного роста, что хорошо согласуется с нашими данными по синтезу свободного альгината. Отдельно следует отметить вариант эксперимента (С-/Р+/О+), где низкие концентрации углерода, высокие концентрации фосфата и высокая аэрация в среде, наоборот, предотвращают и полностью нивелируют синтез свободного альгината и способствует синтезу высокомолекулярного капсулярного альгината (2,07 г/л), который образует капсулы вокруг бактериальных клеток (Рис. 2Б). По-видимому, фосфаты в среде Берка очень важны для образования капсул, которые состоят из высокомолекулярного альгината. Этот факт представляет большой интерес в области биотехнологии, поскольку здесь мы наблюдаем тот редкий случай, когда можно избирательно получать только высокомолекулярный капсулярный альгинат без примеси свободного

низкомолекулярного альгината.

Синтез ПОБ значительно отличался во всех 8 вариантах ПФЭ, но только сочетание высоких значений концентрации сахара в среде и высокого уровня аэрации способствовало эффективному синтезу биополимера. Положительное влияние фактора сахарозы и кислорода для увеличения биосинтеза ПОБ хорошо согласуется со многими литературными источниками.

Физико-химические характеристики ПОБ и альгинатов. Результаты физико-химических исследований биополимеров показали большие различия по молекулярным массам (ММ) между свободными и капсулярными альгинатами: свободные альгинаты во всех опытах (за исключением 7-го (см. Табл. 1) ввиду отсутствия полимера) имели низкую ММ в диапазоне 100- 110 кДа. ММ капсулярного альгината значительно различалась в вариантах ПФЭ и имела более высокое значение в сравнении с ММ свободного альгината (Рис. 3). Ее значение значительно варьировало в разных вариантах ПФЭ (от 212 кДа в 2м варианте до 574 кДа в 4м варианте).

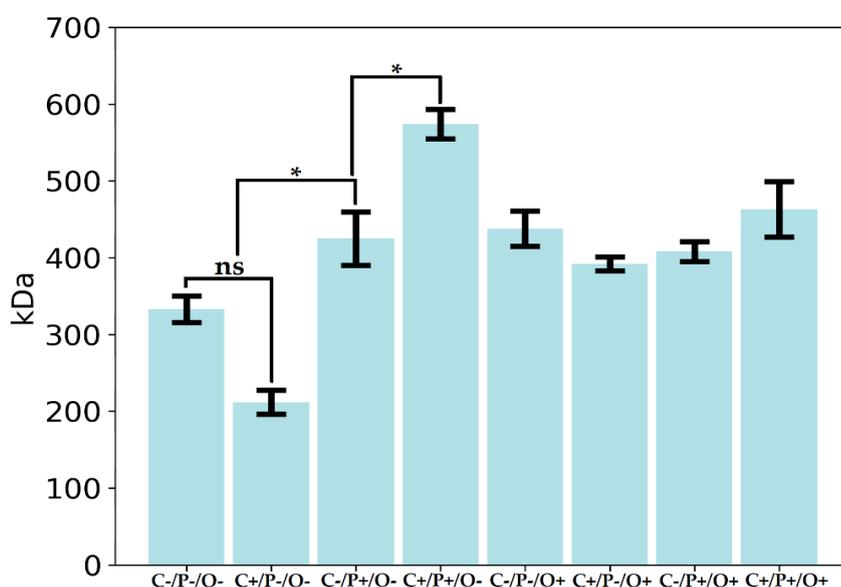


Рисунок 3. Молекулярные массы (ММ) синтезированных капсулярных альгинатов культурой *Azotobacter vinelandii* 12 в ПФЭ 2³.

Таким образом при высокой концентрации сахарозы и фосфатов в среде (C+/P+/O-) возможно достижение высокой ММ массы синтезированного капсулярного альгината (574 кДа).

Определение ММ ПОБ в ПФЭ 2³ дало неоднородные результаты (Рис. 3). Все полимеры показали ММ выше 1200 кДа за исключением опыта (C-/P-/O+) (331 кДа) и (C-/P+/O+) (49 кДа). По-видимому, сочетание высокой аэрации и низкого уровня сахарозы в среде для синтеза высокомолекулярного ПОБ является критичным и не способствует синтезу запасного источника энергии и углерода, которым является для бактериальной клетки ПОБ. Это также подтверждается тем, что бактерии *A. vinelandii* 12 именно в этих опытах после 48 часов резко снижают скорость роста и вступают в стационарную фазу.

Методом ИК-спектроскопии определяли мономерный состав бактериальных альгинатов по соотношению M/G и уровень их ацетилирования (Рис. 4).

Как можно видеть из данных, представленных на рисунке 4А ИК-спектры альгинатов характеризовались мономерным составом, что определяется полосами 785 см⁻¹ (маннуриновая кислота) и 815 см⁻¹ (гулуриновая кислота) и наличием ацетилирования (присутствие полос в районе 1730 см⁻¹ и 1254 см⁻¹). Полос поглощения, соответствующим белкам или нуклеиновым кислотам не было обнаружено, что говорит

о высокой чистоте полученных полимеров.

Процентные соотношения в М/Г альгинатной цепи во всех опытах ПФЭ 2³ у свободных альгинатов и капсулярных альгинатов показаны на Рис. 4В и 4Г, соответственно. Распределение уроновых кислот у свободных и капсулярных альгинатов показало, что во всех образцах преобладают маннуриновые блоки в цепи. В вариантах №1,4 и 5 отмечено максимальное содержание гулуриновой кислоты у капсулярных альгинатов (40%, 35% и 32%). Это является важным параметром, так как ее содержание в совокупности с высокой ММ отвечает за такое важное свойство капсулярного альгината как гелеобразование. В настоящий момент в литературе исследований по влиянию различных факторов культивирования бактерий на распределение М/Г у синтезированных альгинатов не отмечено. Большая часть работ в этой области посвящена функциям С5-эпимераз.

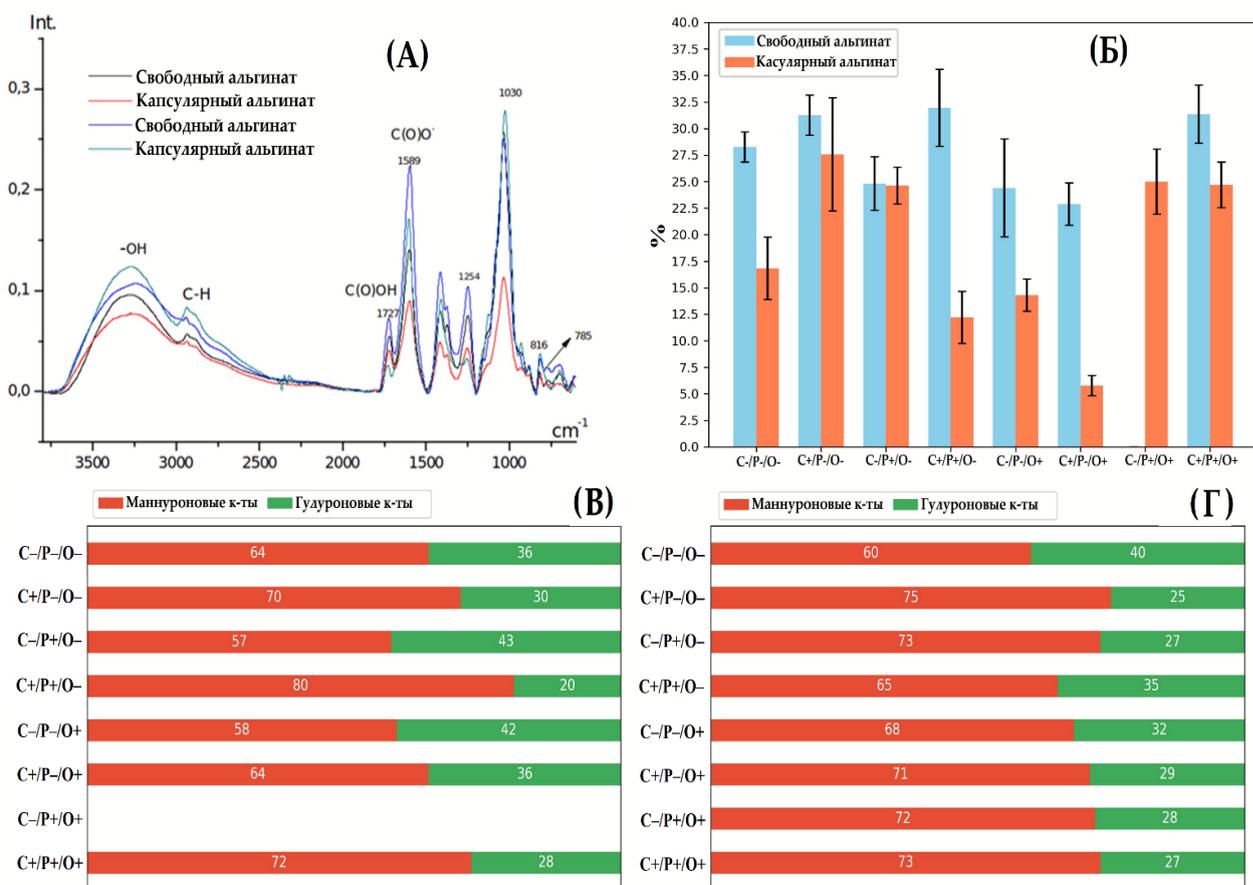


Рисунок 4. Физико-химические свойства бактериальных альгинатов. (А)-ИК-спектры поглощения свободных и капсулярных альгинатов. (Б)-уровень ацетилирования свободных и капсулярных альгинатов и (В,Г)— М/Г состав свободных и капсулярных альгинатов.

Результаты по уровню ацетилирования свободных и капсулярных альгинатов отображены на Рис. 4Б, соответственно. По результатам спектров поглощения капсулярных альгинатов виден значительный разброс в различных вариантах ПФЭ по уровню ацетилирования. Стоит заметить, что вариант (C+/P-/O+) показал самый низкий уровень ацетилирования (Рис. 4Б) и одновременно с этим максимальный выход ПОБ. В варианте (C-/P+/O+), наоборот, отмечен высокий уровень ацетилирования капсулярного альгината и минимальный выход ПОБ. Ацетил-КоА является донором ацетила для ацетилирования альгината и одновременно предшественником синтеза ПОБ. Вполне возможно, что снижение концентрации сахарозы и увеличение уровня аэрации напрямую переключает потоки ацетил-КоА с синтеза ПОБ через цикл трикарбоновых кислот (ЦТК) на синтез ацетильных групп в маннуриновых остатках.

Реологические свойства и водопоглощение альгинатного гидрогеля. Во многих исследованиях механических свойств различных альгинатов было показано, что альгинаты с высокой ММ и высоким соотношением гулуруновых остатков в полимерной цепи создают более плотные гидрогели. Поэтому для создания гидрогелей должны быть использованы альгинаты высокой ММ, которые бы подходили для реометрических исследований. Концентрация CaCl_2 и самого полимера для создания гидрогелей также должны быть выше.

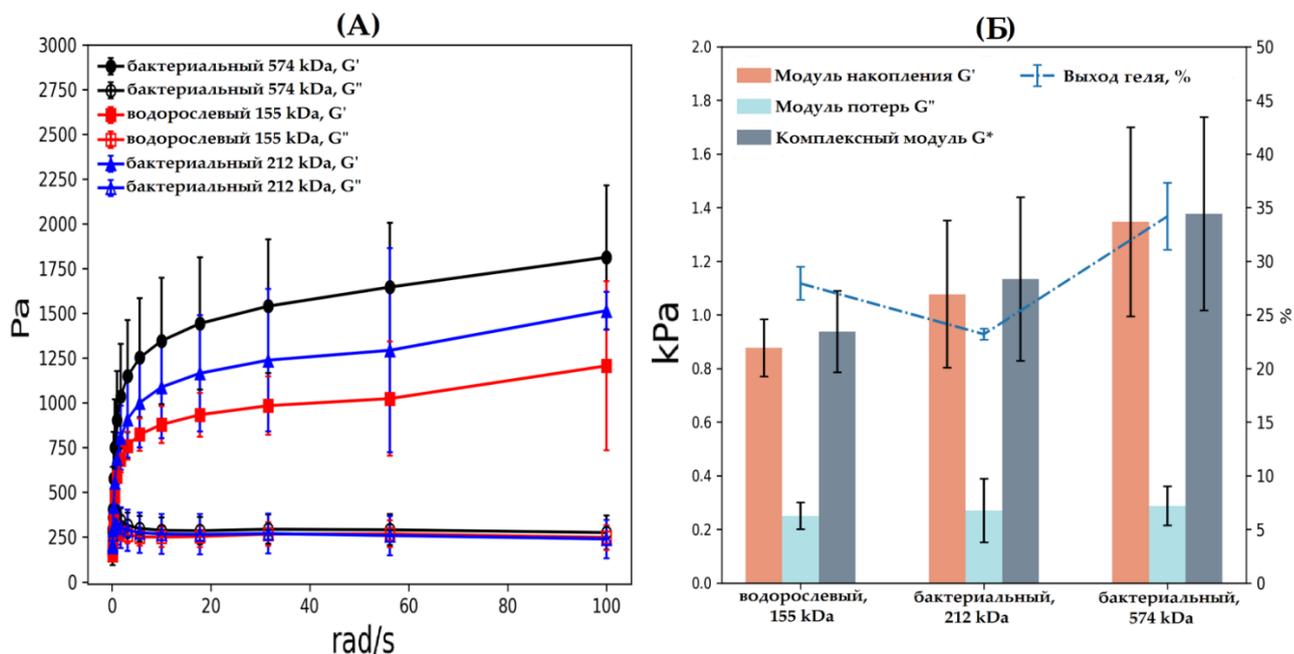


Рисунок 5. А) Частотные измерения вязкоупругости альгинатных гидрогелей. Б) Корреляция результатов вязкоупругости при 10 рад/с с общим выходом альгината после гелеобразования.

На Рисунке 5А продемонстрирован график частотных измерений альгинатных гидрогелей с различными физико-химическими свойствами и различным происхождением полимера (водорослевым и бактериальным). Нелинейная зависимость между прочностью гидрогеля и ММ обусловлена различными видами ионотропных сшивков между альгинатными цепями. 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 большей мере как жидкости, чем твердые тела.

Результаты реологических данных при постоянной частоте (10 рад/с) и выход полимера не имели прямой зависимости (Рисунок 5Б). 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 (Рисунок 5Б).

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 212 кДа. Более высокую степень набухания демонстрировал бактериальный альгинат с ММ = 574 кДа. Из-за более высокой молекулярной массы данный альгинат кальция создает больше точек сшивания остатков гулуруновых кислот с ионами кальция в первичной альгинатной цепи, тем самым создавая более обширную полимерную сеть для

проникновения молекул воды.

Гидрогели альгината кальция были протестированы на цитотоксичность с целью будущего использования бактериального полимера для применения *in vivo* в тканевой инженерии (рис. 6).

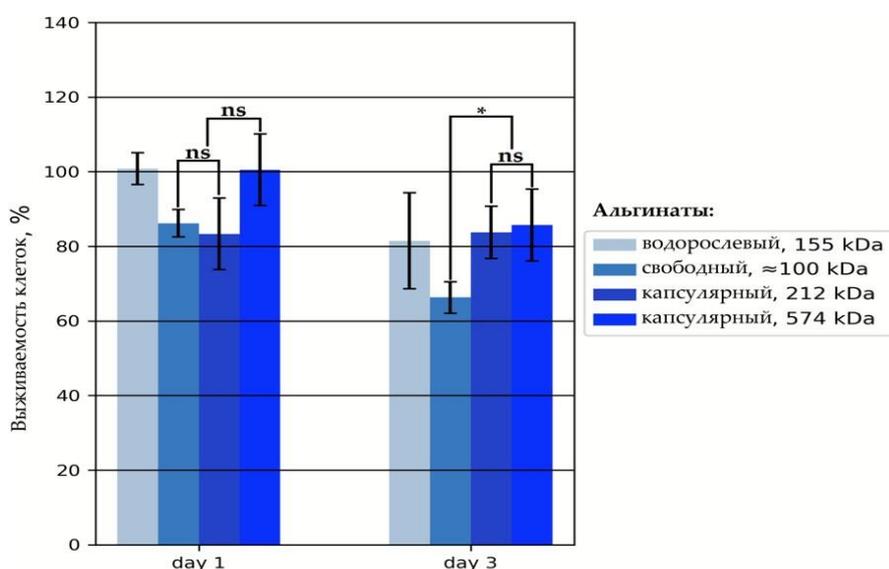


Рисунок 6. Оценка цитотоксичности на основе жизнеспособности МСК. Жизнеспособность клеток в процентах рассчитывали относительно отрицательного контроля (НК).

Данные по водорослевому и капсулярному альгинатному гидрогелю ММ = 574 кДа не показывают наличие цитотоксичности к МСК и были сопоставимы с контролем через 24 часа. На третьи сутки роста клеток все альгинаты (водорослевый ММ = 155 кДа, 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.

Кишечная микробиота.

Целью данной части работы было проведение исследования по влиянию имплантации биополимерной конструкции в толстый кишечник крыс линии Вистар и определение таксономических операционных единиц (ОТЕ), которые вносят вклад в регенерацию толстого кишечника или в развитие воспалительных реакций.

α и β -разнообразие бактериальных сообществ. Альфа-разнообразие демонстрирует сложность биологической системы внутри бактериального сообщества, которое определяется количеством ОТЕ и численностью отдельных ОТЕ внутри анализируемого сообщества. Бета-разнообразие показывает сравнение нескольких сообществ по степени их схожести или различия между образцами. Анализ метрик α -и β -разнообразия показали следующие результаты. Данные рисунка 7А и 7Б α -разнообразие по индексу Шеннона и Симпсона показывают низкое разнообразие кишечной микробиоты у крыс с имплантированной конструкцией ПОБ-альгинат и альгинатными сферами с инкапсулированными лактобактериями.

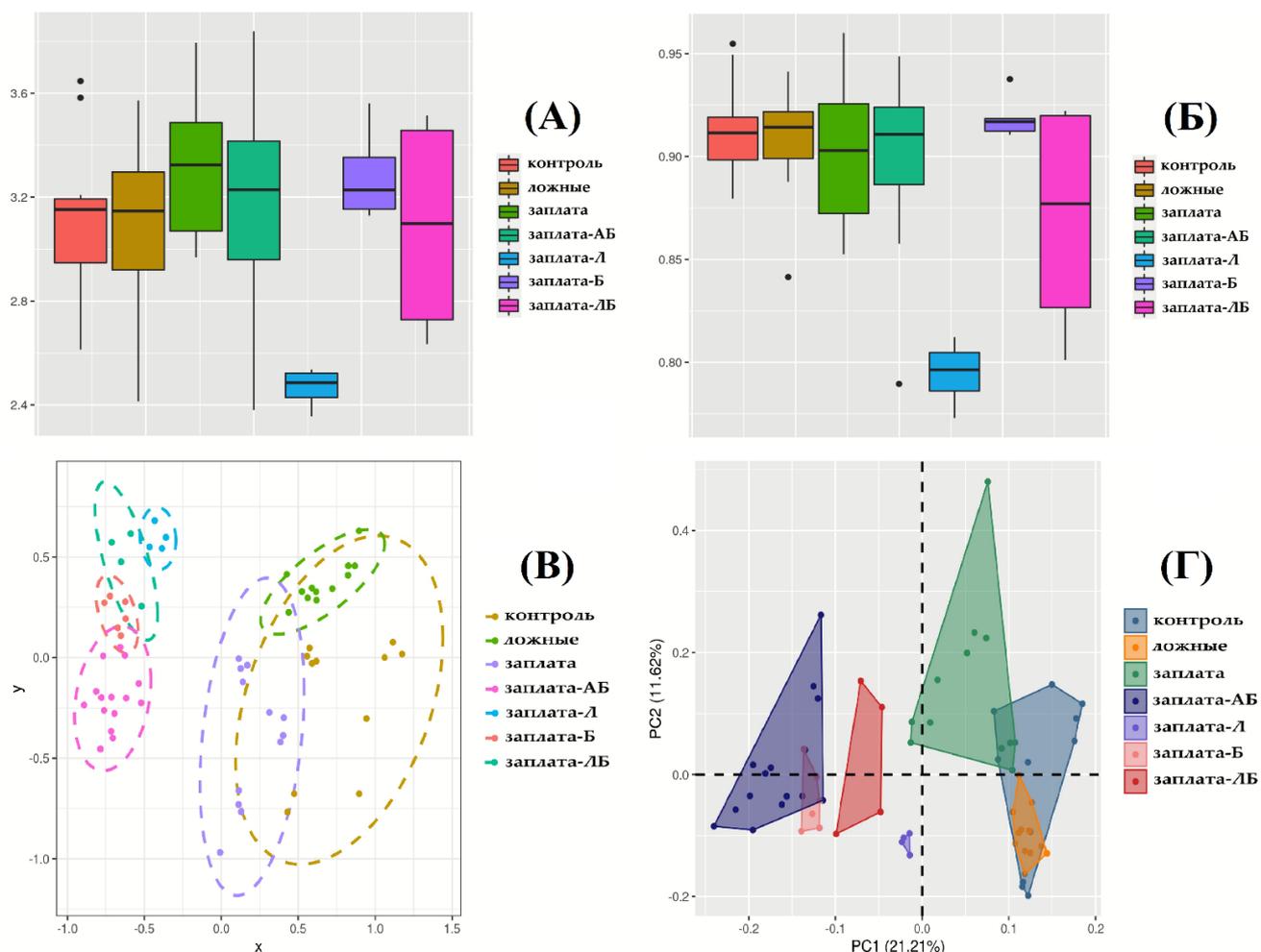


Рисунок 7. А) α -разнообразие по индексу Шеннона. Б) α -разнообразие по индексу Симпсона. В) β -разнообразие по непараметрическому многомерному шкалированию (NMDS). Г) β -разнообразие по анализу основных компонент (РсоА).

Данные α -разнообразия (Рисунок 7А и 7Б) показывают, что сферы на основе лактобактерий способствовали активному 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.

Для оценки β -разнообразия между образцами были применены методы ординации микробных сообществ при помощи алгоритмов NMDS (неметрическое многомерное шкалирование) и РсоА (Анализ основных компонент) (Рисунок 7В и 7Г).

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. Из полученных данных 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.

Качественный и количественный анализ бактериальных таксономических групп. Состав микробиоты на уровне бактериальных классов обозначил 2 главные доминирующие группы во всех образцах (Рис. 8).

Главное представительство во всех группах заняли бактерии класса *Clostridia* и *Bacilli*. Самую большую представленность класса *Clostridia* имела группа крыс с имплантацией биополимерной конструкции при использовании антибиотика. 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 например, *Clostridium difficile* являются патогенными организмами для человека и ответственны за многие воспалительные и онкологические заболевания кишечника. На самом деле большинство представителей класса *Clostridia* в кишечной микробиоте играют комменсальную роль и поддерживают гомеостаз организма.

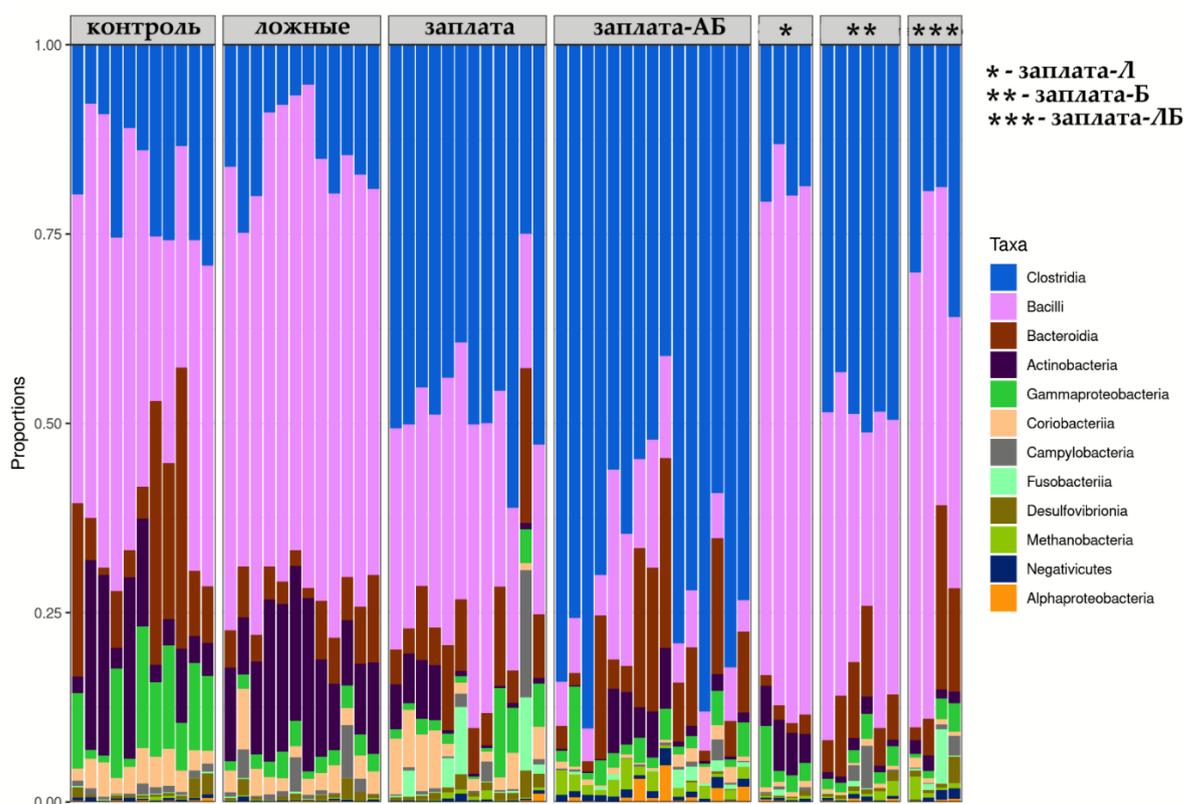


Рисунок 8. Относительная бактериальная численность на уровне класса.

При увеличении таксономического разрешения с точностью до родовой принадлежности, база данных SILVA фрагментов V4 гена рибосомальной 16S РНК определяет большое количество операционных таксономических единиц (ОТЕ) для каждой группы. К сожалению, по многим ОТЕ не удастся точно установить к какому роду принадлежит тот или иной микроорганизм. Поэтому на основе полученных данных были отобраны 8 самых многочисленных ОТЕ с точной родовой принадлежностью (Рис. 9).

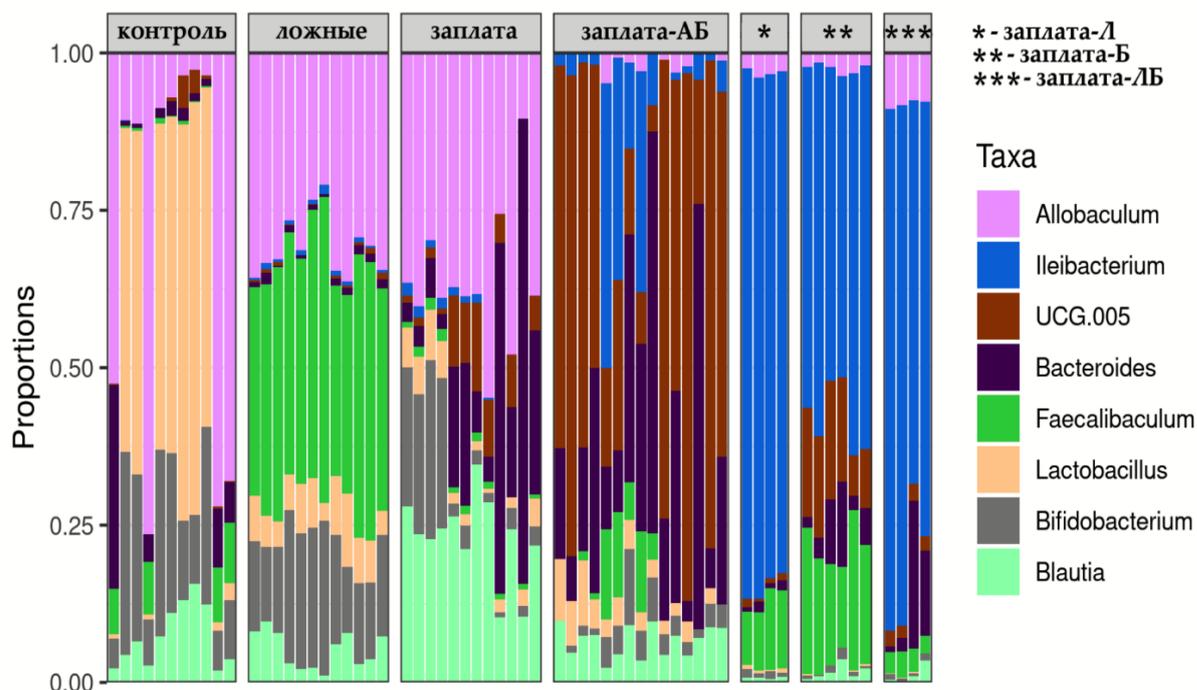


Рисунок 9. Относительная бактериальная численность на уровне роде.

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

Очень хорошую представленность имеют бактерии *Lactobacillus* и *Bifidobacterium sp.* в контрольной группе, где крысам проводили ложные операции. Вероятно, что за счет своих симбиотических связей с организмом-хозяином, *Lactobacillus* и *Bifidobacterium sp.* активно способствуют заживлению ЖКТ, имеют противовоспалительный эффект и улучшают перильстатику кишечника. Увеличенное количество бактерий рода *Faecalibaculum sp.* демонстрирует та же группа образцов. Кроме того, их количество также увеличено у группы крыс с имплантированной конструкцией с включением бифидобактерий. Бактерии рода *Faecalibaculum sp.* в первую очередь специализируются на ферментации олигосахаридов (в первую очередь на D-мелибиозе и стахиозе). Их, вероятно, можно в будущем использовать в качестве кандидатов на новые пробиотические препараты против раковых заболеваний толстого кишечника, так как недавно было показано, что *Faecalibaculum sp.* обладают защитными функциями против развития онкологических кишечных опухолей.

Статистический анализ бактериальных сообществ кишечной микробиоты.

Количественные и качественные данные с точностью до бактериального рода были статистически анализированы непараметрическим методом множественного сравнения Краскела-Уоллиса (Рис. 10).

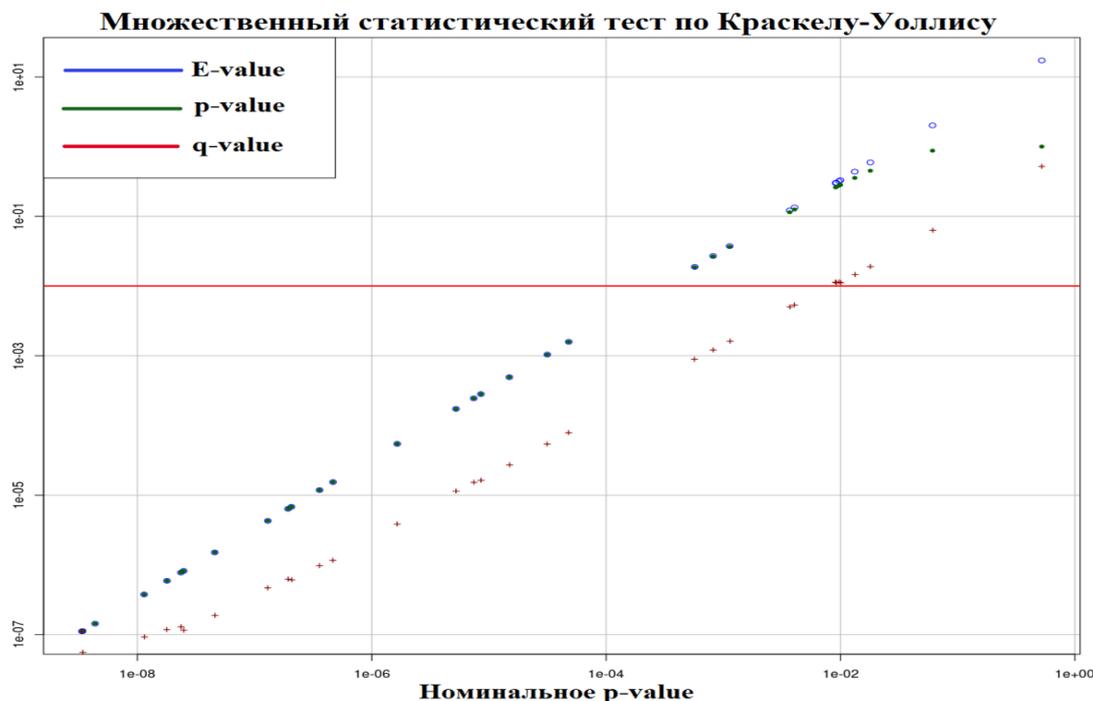


Рисунок 10. Непараметрический метод множественного сравнения по критерию Краскела- Уоллиса. Статистическая значимость отдельных ОТЕ определяется по E-value, p-value и q-value.

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. 9), не являются статистически значимыми по причине высокой вероятности групповой ошибки первого рода (FWER). Все остальные таксономические единицы с разрешением до бактериального рода, показанные на Рис. 9, удовлетворяли всем критериям и были значимы между исследуемыми группами.

На основании множественных сравнений по Краскелу-Уоллису был подсчитан и показан ранговый корреляционный анализ Спирмана (Рис. 11).

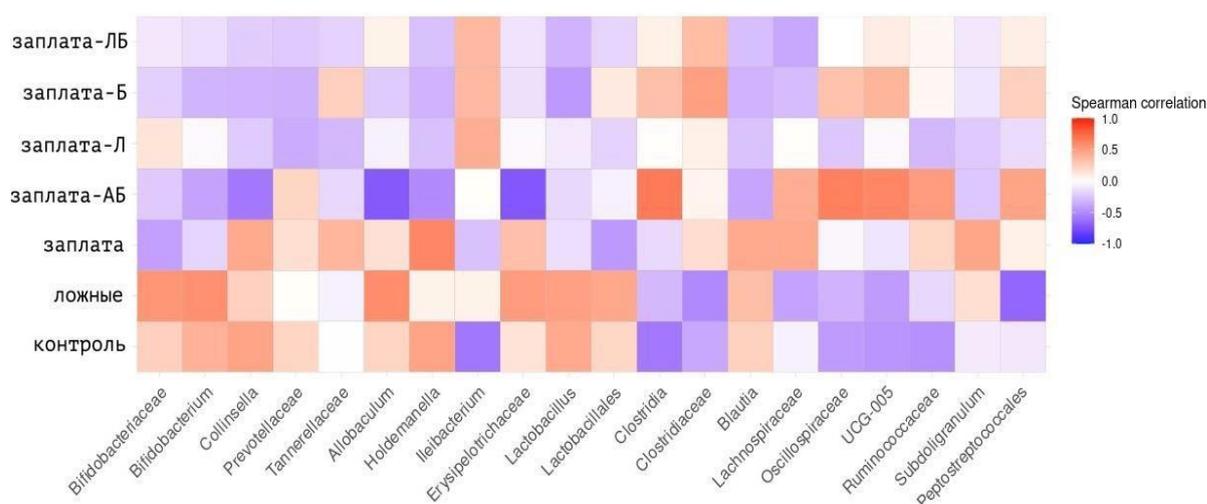


Рисунок 11. Ранговый корреляционный анализ Спирмана 20 ОТЕ по группам.

Анализ Спирмана позволяет проследить корреляцию конкретной микробиологической группы кишечного сообщества относительно определенного

рассматриваемого опытного варианта. Так образцы ПОБ-альгинат с антибиотиком 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, где по результатам рангового анализа Спирмана почти ни одна ОТЕ (за исключением положительной корреляции бактерий рода *Ileibacterium sp.*) не демонстрировали какой-либо зависимости по отношению к этой группе. Эти результаты еще раз подтверждают, что именно *Ileibacterium 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 гулуруновых 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 *Ileibacterium 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 маннуриновых к гулуриновым 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 водопоглощительными 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 конструкции оказывает большее влияние на состав кишечной микробиоты в отличие от имплантации ПОБ-альгинат 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.

Основные результаты работы изложены в следующих публикациях:

Список публикаций в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных WoS, SCOPUS и RSCI:

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. IF WoS = 2.604, Q2; Scopus SJR = 0.435, Q2. DOI: 10.1080/00914037.2018.1525730. Вклад автора в печатных листах: (0,4/0,1) (здесь и далее в скобках приведен объем публикации в печатных листах и вклад автора в печатных листах).

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. IF РИНЦ = 1.579, Q4. DOI: 10.1134/S0555109919060072. [**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. 55, 654–659. IF WoS = 0.886, Q4; Scopus SJR = 0.247, Q4. DOI: 10.1134/S0003683819060073]. (0,8/0,4)

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. IF WoS = 7.328, Q1; Scopus SJR = 1.234, Q1. DOI: 10.1016/j.msec.2020.110991. (1,6/0,16)

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. IF РИНЦ = 0.624, Q3. DOI: 10.32743/2658-6460.2020.4.15.283. [Akoulina E.A., Demianova I.V., Zharkova I.I., Voinova V.V., Zhuikov V.A., Khaydapova D.D., Chesnokova D.V., Menshikh K.A., **Dudun A.A.**, Makhina T.K., Bonartseva G.A., Volkov A.V., Asfarov T.F., Ivanov S.Y., Shaitan K.V., Bonartsev A.P. Growth of mesenchymal stem cells on poly(3-hydroxybutyrate) scaffolds loaded with simvastatin // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2021. 171. 172–177. IF WoS = 0.804, Q3; Scopus SJR = 0.288, Q3. DOI: 10.47056/1814-3490-2021-1-70-76]. (0,8/0,08)

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. WoS = 4.329, Q1; Scopus = 0.77, Q1. DOI: 10.3390/polym14010131. (2,4/1,2)

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. IF WoS = 3.25, Q1; Scopus SJR = 0.75, Q1. DOI: 10.1021/acsabm.2c00496.(2.3/0.23)

Публикации в прочих научных изданиях:

1. Воинова В.В., Акулина Е.А., **Дудун А.А.**, Меньших К.А., Бонарцев А.П., Чеснокова Д.В., Махина Т.К., Бонарцева Г.А., Чишанков И.Г., Жданко Т.М., Куликовская В.И., Шайтан К.В., Агабеков В.Е. Биомиметические структуры пленок биосинтетического поли-3-оксибутирата // Актуальная биотехнология. 2019. 3, 30, 585–586.

2. Бонарцев А.П., Воинова В.В., Акулина Е.А., **Дудун А.А.**, Жаркова И.И., Жуйков В.А., Меньших К.А., Чеснокова Д.В., Махина Т.К., Бонарцева Г.А., Парий И.О., Сурменев Р.А., Сурменева М.А. Пьезоэлектрические свойства поли-3-оксибутирата-со-3-оксивалерата-полиэтиленгликоля, полученного методом контролируемого биосинтеза // Биологический Журнал. 2019. 10, 10, 4-10.

3. Воинова В.В., Акулина Е.А., **Дудун А.А.**, Жаркова И.И., Меньших К.А., Бонарцев А.П., Чеснокова Д.А., Махина Т.К., Бонарцева Г.А., Чишанков И.Г., Жданко Т.М., Куликовская В.И., Агабеков В.Е. Рост мезенхимальных стволовых клеток на структурированных пленках биосинтетического поли-3-оксибутирата // Биологический Журнал. 2019. 8, 8, 4-9.

Учебные пособия:

Дудун А.А., Бонарцев А.П., Жаркова И.И., Воинова В.В. Роль кишечной микробиоты в лечении различных заболеваний и антибактериальные препараты нового поколения // Издательство Мир науки. 2020. Москва. ISBN 978-5-6044337-1-3, 130 с.

Тезисы конференций:

1. **Дудун А.А.** Биосинтез альгинатов и поли-3-гидроксибутирата бактериальным штаммом *Azotobacter agile* 12 // Сборник тезисов отчетной конференции аспирантов: 25-28 июня 2018 г.: направление 06.06.01 «Биологические науки» / под редакцией В.О. Попова, К.Г. Скрыбина; сост. Е.С. Титова. – Москва: МАКС Пресс, 2018. – С. 20-23.

2. **Dudun A.A.**, Akoulina E.A., Bonartseva G.A., Voinova V.V., Makhina T.K., Bonartsev A.P. Synthesis of Biopolymers by Bacterial Strain *Azotobacter Agile* 12 // ISBPPB 2018: 4th International Conference on Biomedical Polymers & Polymeric Biomaterials, Krakow, Poland, 15-18 July 2018, Book of abstracts, p. 175.

3. **Dudun A.A.**, Voinova V.V., Bonartseva G.A., Yakovlev S.G., Makhina T.K., Chesnokova D.V., Zhuikov V.A., Akoulina E.A., Zharkova I.I., Bonartsev A.P. Composite scaffolds from poly(3- hydroxybutyrate) and sodium alginate for tissue engineering // ISBPPB 2018: 4th International Conference on Biomedical Polymers & Polymeric Biomaterials, Krakow, Poland, 15-18 July 2018, Book of abstracts, p. 205.

4. Akoulina E.A., **Dudun A.A.**, Bonartsev A.P., Voinova V.V., Bonartseva G.A. Alginate of Azotobacter Origin // ISBPPB 2018: 4th International Conference on Biomedical Polymers & Polymeric Biomaterials, Krakow, Poland, 15-18 July 2018, Book of abstracts, p. 177.
5. **Дудун А.А.**, Акулина Л.А., Бонарцев А.П., Бонарцева Г.А. Высокомолекулярный бактериальный альгинат: биосинтез и физико-химические свойства // XXXI Зимняя молодёжная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», г. Москва, Россия, 11-14 февраля 2019, Сборник тезисов, С. 113.
6. **Дудун А.А.**, Акулина Е.А., Бонарцев А.П., Бонарцева Г.А., Воинова В.В. Исследование биосинтеза и физико-химических свойств бактериального альгината, как полимера для биомедицинского применения // Международная научная конференция «Физико-химическая биология как основа современной медицины», Минск, Беларусь, 24 мая 2019 г. Сборник тезисов докладов, 2019, С. 99-100.
7. **Дудун А.А.** Влияние имплантированной конструкции на основе бактериальных поли-3-оксибутирата и альгината на кишечную микрофлору крыс линии Вистар // Сборник тезисов отчётной конференции аспирантов: 24-28 июня 2019 г.: направление 06.06.01 «Биологические науки» / под редакцией В.О. Попова, К.Г. Скрыбина; сост. Е.С. Титова. – Москва: МАКС Пресс, 2019. – С. 46-50.
8. **Дудун А.А.**, Акулина Е.А., Махина Т.К., Бонарцев А.П., Воинова В.В., Бонарцева Г.А. Изменение бактериального сообщества в кишечной микробиоте с имплантируемой биополимерной конструкцией на основе поли-3-оксибутирата и альгината // IV Национальный Конгресс по Регенеративной Медицине. 2019. Материалы конгресса, С. 82-83.
9. **Dudun A.A.**, Akoulina E.A., Bonartsev A.P., Makhina T.K., Voinova V.V., Bonartseva G.A. Study of changes in the intestinal microbiota of rats caused by implantation of a biopolymer construct based on poly-3-hydroxybutyrate and alginate // MicrobiotaMi Humanitas Congress Center, February 5-7, 2020, Italy, Milan, Book of abstracts, p. 08.
10. Voinova V.V., **Dudun A.A.**, Akoulina E.A., Zharkova I.I., Chesnokova D.A., Makhina T.K., Bonartseva G.A., Shaitan K.V., Bonartsev A.P. The artificial biofilm based on composite construction from bacterial poly(3-hydroxybutyrate) and alginate seeded with probiotic bacteria // ESAO Winter School 2020, Wittenberg, Germany, February 26-29, 2020, P19, Book of abstracts, p. 33.
11. **Дудун А.А.** 16S метагеномное профилирование кишечной микробиоты крыс при имплантировании в толстый кишечник 3D-конструкции из поли-3-оксибутирата и альгината // Сборник тезисов отчетной конференции аспирантов: направление подготовки 06.06.01 "Биологические науки". Тезисы конференции. Под редакцией В.О. Попова, А.Н. Фёдорова. 2020. С. 77-82.
12. **Дудун А.А.** Биосинтез бактериального альгината и влияние конструкций на его основе на состав кишечной микробиоты *in vivo* // Сборник тезисов отчетной конференции аспирантов: направление подготовки 06.06.01 "Биологические науки". Тезисы конференции. Под редакцией В.О. Попова, А.Н. Фёдорова. 2021. С. 98-107.
13. Kulikouskaya V., Bonartsev A.P., Akoulina E.A., Hileuskaya K., Chyshankou I., Zharkova I.I., Demyanova I.V., **Dudun A.A.**, Makhina T.K., Bonartseva G.A., Shaitan K.V.,

Voinova V.V. Formation of biomimetic structures of poly(3-hydroxybutyrate) films // 47th ESAO Congress 2021, 7-11 September, London, UK (on-line). Abstract book, p. 79.

14. Дудун А.А., Акулина Е.А., Жуйков В.А., Махина Т.К., Воинова В.В., Бонарцев А.П., Бонарцева Г.А. Конкурентный биосинтез альгината и поли-3-оксибутирата бактериальным штаммом *Azotobacter vinelandii* 12 для применения в тканевой инженерии // 3-й Российский Микробиологический Конгресс. г. Псков, 26 сентября – 1 октября 2021 г. Материалы конгресса, С. 172-174.