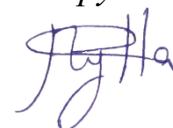


МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ BIOTEХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи



АКУЛИНА ЕЛИЗАВЕТА АЛЕКСАНДРОВНА

**ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ
БАКТЕРИАЛЬНОГО АЛЬГИНАТА
ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ**

1.5.6. Биотехнология

ДИССЕРТАЦИЯ

На соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:
к.б.н. Бонарцева Г.А.
к.б.н. Бонарцев А.П.

Москва – 2022

Оглавление

Список сокращений.....	4
Введение	5
Степень разработанности проблемы	6
Цель работы	6
Научная новизна	7
Теоретическая и практическая значимость работы.....	7
Положения, выносимые на защиту.....	8
Степень достоверности и апробация результатов.....	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 Полимеры, продуцируемые бактерией рода <i>Azotobacter</i>	11
1.1.1 Бактерии рода <i>Azotobacter</i> , способные к биосинтезу альгинатов и полиоксиалканоатов	11
1.1.2 Альгинаты	12
1.1.3 Полиоксиалканоаты.....	14
1.1.4 Биосинтез альгинатов и полиоксиалканоатов бактерией рода <i>Azotobacter</i>	16
1.2 Получение и исследование альгината	19
1.2.1 Влияние условий культивирования на биосинтез альгинатов	19
1.2.2 Получение и выделение альгинатов	21
1.2.3 Характеристики альгинатов.....	23
1.2.4 Использование альгинатов в медицине.....	24
1.3 Разработка конструкций из биополимеров для биоинженерии	26
1.3.1 Дегградация биополимеров.....	27
1.3.2 Гидрогели в медицине.....	30
1.3.3 Применение альгинатов	32
1.3.4 Применение полиоксиалканоатов.....	35
1.3.5 Применение биоинженерных конструкций на основе биополимеров в биотехнологии..	39
1.4 Исследования на биосовместимость.....	43
Глава 2. Материалы и методы.....	47
2.1 Получение полимеров	47
2.1.1 Культивирование бактерий.....	47
2.1.2 Биосинтез альгинатов.....	48
2.1.3 Метод выделения альгинатов	49
2.1.4 Метод очистки альгинатов	49
2.1.5 Метод выделения поли-3-оксибутирата.....	50

2.2 Изучение физико-химических свойств полимеров	50
2.2.1 Измерение молекулярной массы полимеров	50
2.2.2 Получение гелей альгината кальция	51
2.2.3 Водопоглощение	51
2.2.4 Инфракрасная спектроскопия	52
2.2.5 Реометрия	52
2.2.6 Термогравиметрический анализ	53
2.2.7 Дифференциальная сканирующая калориметрия	53
2.2.8 Конфокальная и флуоресцентная микроскопия	53
2.2.9 Сканирующая электронная микроскопия	54
2.2.10 Измерение кондуктивности	54
2.3 Получение матриц из поли-3-оксибутирата	54
2.4 Изучение биосовместимости полимеров	55
2.4.1 Выделение мезенхимальных стволовых клеток из клеток линии Wistar	55
2.4.2 Метод оценки жизнеспособности клеток	56
2.4.3 Определение цитотоксичности альгинатов	56
2.4.4 Изучение роста клеток в альгинатном геле	57
2.4.5 Изучение роста клеток <i>in vitro</i> на полимерных матрицах	57
2.4.6 Исследования конструкций из поли-3-оксибутирата и альгината <i>in vivo</i>	58
Глава 3. Результаты и их обсуждение	61
3.1 Влияние условий культивирования бактерий рода <i>Azotobacter</i> на синтез полимеров	61
3.2 Разработка методов выделения и очистки альгинатов	79
3.3 Изучение физико-химических свойств полученных альгинатов	80
3.4 Получение партий альгинатов с различными свойствами бактериальным синтезом	91
3.5 Изучение биосовместимости альгинатов	93
3.5.1 Определение цитотоксичности бактериальных альгинатов	93
3.5.2 Изучение роста клеток в альгинатном геле	95
3.6 Разработка изделий из поли-3-оксибутирата	97
3.6.1 Исследование физико-химических свойств матриц из поли-3-оксибутирата	99
3.6.2 Оценка биосовместимости матриц из поли-3-оксибутирата <i>in vitro</i>	100
3.7 Разработка биоинженерных конструкций на основе поли-3-оксибутирата и альгинатов	102
Заключение	106
Выводы	109
Благодарности	111
Список литературы	112

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АЛГ – альгинат натрия
- БФС – буфер фосфатно-солевой
- ВКМ – внеклеточный матрикс
- ГА – гидроксиапатит
- ГДФ – гуанозиндифосфат
- ГЭР – гастроэзофагеальный рефлюкс
- КМ – костный мозг
- МСК – мезенхимальные стволовые клетки
- ПОБ – поли-3-оксибутират
- ПОА – полиоксиалканоаты
- ПЭГ – полиэтиленгликоль
- ТГА – термогравиметрический анализ
- ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
- М – маннуронозная кислота
- G – гулунонозная кислота
- Ac – ацетилирование
- bFGF – фактор роста фибробластов
- VEGF – фактор роста эндотелия сосудов

ВВЕДЕНИЕ

Альгинаты являются перспективным материалом для применения в различных областях биологии и медицины. Полученные из биологических объектов, таких как водоросли или бактерии, они биосовместимы и биodeградируемы, что привлекает к ним всеобщий интерес. Биосинтез альгинатов с помощью бактерий рода *Azotobacter* позволяет получать полимер различной молекулярной массы, а также различного мономерного состава, что определяет его физико-химические свойства; такого эффекта не удастся достичь при экстракции альгината из водорослей. Разнообразие свойств позволяет исследовать возможное применение бактериальных альгинатов в различных областях биотехнологии, например, в качестве материала для использования в медицине и биоинженерии.

Разработка и исследование изделий из полимерных веществ - перспективное направление в современной биологии. Такие изделия позволяют восстанавливать и выращивать биоискусственные органы и ткани, механически поддерживать рост костей. «Матрицы для биоискусственных органов должны обладать многофункциональностью, достаточной механической прочностью и эластичностью, биосовместимостью на клеточном уровне, способностью стимулировать пролиферацию и дифференциацию клеток, способностью к неоваскуляризации и возможностью стерилизации без изменения медико-технических свойств» [Волова, Севастьянов, Шишацкая, 2003].

Возможность использования биополимеров в медицине и трансплантологии открывает новые горизонты, для пересадки или замены органов и уменьшает связанные с этим этические проблемы. Используя такие синтезированные трансплантаты на основе полимеров, а не на основе полученных после смерти у человека органов, возможно снизить риск отторжения этих трансплантатов, а также сделать этот процесс более доступным. Важным этапом является возможность культивирования стволовых клеток на таких имплантатах. Это позволяет брать стволовые клетки у пациента, заселять ими имплантат и подсаживать тому же

пациенту, то есть, не вносить никакой чужеродный материал кроме самого биополимера, на который, по многочисленным исследованиям, иммунная реакция слабая [Brigham, Sinskey, 2012]. Также, биополимеры позволяют отказаться от металлических скоб, которые используются, например, при сложных переломах костей. Металлические скобы заменяют на полимерные, которые со временем рассасываются и от них в организме не остается и следа [Delibegović и др., 2011].

Степень разработанности проблемы

На данный момент весь альгинат, использующийся в коммерческих целях – это водорослевый альгинат. Медицинские изделия, имеющие в составе бактериальный АЛГ, находятся на стадии разработок, изучение бактериальных альгинатов находится на стадии изучения их физико-химических свойств. На данный момент в реестр FDA (U.S. Food and Drug Administration) входит только водорослевый альгинат, который полностью одобрен для применения в медицине и пищевой индустрии. В России работ, посвященных использованию бактериальных альгинатов в медицине и биоинженерии нет. Данная работа является в нашей стране пионерской.

Целью работы было изучение биосинтеза альгинатов бактериями рода *Azotobacter* sp., изучение физико-химических свойств альгината, его биосовместимости, и получение и исследование конструкций для тканевой инженерии на основе биополимеров – полиоксиалканоатов и альгинатов. Были поставлены следующие **задачи**:

1. Провести оценку коллекции бактерий рода *Azotobacter* на способность к синтезу альгинатов. Исследовать влияние условий культивирования на синтез альгинатов и поли-3-оксибутирата бактериями рода *Azotobacter*.

2. Разработать методы выделения и очистки синтезированных альгинатов. Исследовать физико-химические свойства полученных альгинатов, их биосовместимость.

3. Получить и исследовать конструкции для тканевой инженерии на основе полиоксиалканоатов и альгинатов.

Научная новизна

В данной работе впервые получены бактериальные альгинаты с разными свойствами (разная молекулярная масса, разная степень гелируемости и ацетилирования). Впервые проведена сравнительная оценка их биосовместимости. Показано отсутствие цитотоксичности бактериального альгината и возможность их применения в составе биоинженерных конструкций для тканевой инженерии. Впервые разработана конструкция на основе альгинатов и поли-3-оксибутирата для регенерации костной ткани.

Теоретическая и практическая значимость работы

В настоящее время коммерческий альгинат – это альгинат, получаемый из бурых водорослей. Он обладает набором определенных физико-химических свойств, которые зависят от местообитания и климатических условий произрастания водорослей. Путем контролируемого бактериального синтеза возможно варьировать свойства полимера и получать альгинаты с заранее заданными свойствами, поэтому в последнее время наблюдается повышенный интерес к получению альгинатов из бактерий. Среди бактериального мира только бактерии рода *Azotobacter* и *Pseudomonas* обладают способностью к биосинтезу альгинатов. Бактерии рода *Pseudomonas* являются условно патогенными бактериями, поэтому почвенные бактерии рода *Azotobacter* - наилучшие кандидаты для биосинтеза альгинатов. Они безопасны в работе и их метаболизм быстро реагирует на изменение условий культивирования, что дает возможность контролировать состав и физико-химические свойства получаемых полимеров. Таким образом, используя бактерии, способные к синтезу альгинатов, можно

управлять процессом биосинтеза и получать полимер с заданными свойствами для применения в различных областях биомедицины, фармакологии и в биотехнологии.

Положения, выносимые на защиту

1. Бактериальный синтез альгината позволяет контролируемо варьировать молекулярную массу и мономерный состав синтезируемого полимера.

2. Характеристики бактериальных альгинатов, синтезируемых бактериями рода *Azotobacter*, зависят от состава сред и условий культивирования. Наиболее существенным фактором, влияющим на регуляцию синтеза альгината и поли-3-оксибутирата, является аэрация.

3. Бактериальный альгинат не обладает цитотоксичностью и способен к поддержанию роста и пролиферации мезенхимальных стволовых клеток крысы.

4. Разработанный гибридный трехмерный матрикс на основе поли-3-оксибутирата и альгината не препятствует течению нормального остеогенеза и обеспечивает благоприятные условия для регенерации кости.

Степень достоверности и апробация результатов

Все опыты выполнены серийно, не менее, чем в трех повторностях. Для представления результатов экспериментов была проведена статистическая обработка в программном пакете SPSS/PC+ Statistics™ 12.1 (SPSS). Использовали однофакторный дисперсионный анализ (One-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 была проведена на следующих конференциях: Международная конференция студентов и аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва 2013 и 2014), XII Молодежная школа-конференция «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 2017), конференция

4th International Society for Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials (ISBPPB) (Краков, 2018), виртуальная конференция International Conference on Engineering and Technology (ICET) (2018) – устный доклад, XXXI Зимняя молодёжная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2019), Международная научная конференция «Физико-химическая биология как основа современной медицины» (Минск, 2019), IV Национальный Конгресс по Регенеративной Медицине (2019), научная конференция «ЛОМОНОСОВСКИЕ ЧТЕНИЯ – 2022» подсекция №2 «Биоинженерия» (Москва, 2022) - устный доклад.

Публикации результатов исследований

По результатам работы были опубликованы 13 печатных работ: из них 10 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

Личный вклад автора состоит в разработке экспериментов на основе литературных данных, проведении большей части экспериментов, обработке результатов и подготовке публикаций. Вся экспериментальная часть работы выполнена лично автором или при его непосредственном участии. Методики культивирования и выделения альгината разработаны лично автором.

Методология и методы исследования

Бактериальный синтез полимеров – альгинатов и поли-3-оксибутирата проводился на штаммах бактерий рода *Azotobacter* sp. Было изучено влияние условий культивирования на биосинтез полимеров и на их характеристики, такие как мономерный состав, молекулярная масса и степень ацетилирования у альгинатов. Были изучены физико-химические свойства полученных биополимеров методами ИК спектроскопии, реометрии, проводили термогравиметрический анализ. Изучение биосовместимости полимеров

проводилось стандартными тестами *in vitro* на цитотоксичность и биосовместимость с определением количества клеток в поле зрения микроскопа или спектрофотометрическим тестом ХТТ на определение количества жизнеспособных клеток. Разработка гибридной конструкции из биополимеров – альгината и поли-3-оксибутирата проводилась на основе пористых матриц из поли-3-оксибутирата, полученных методом выщелачивания. Исследования *in vivo* гибридных конструкций проводили на самцах крыс линии *Wistar* на модели критического костного дефекта теменной кости черепа крыс. На 28 сутки эксперимента были проведены гистологические исследования (окраска срезов проводилась небесным трихромом), результаты которых были подтверждены методами компьютерной томографии и получением флуоресцентных гистопантомограмм.

Структура и объем работы

Диссертация изложена на 126 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 150 источников, из них 128 на иностранном языке. Работа иллюстрирована 26 рисунками, содержит 13 таблиц.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Полимеры, продуцируемые бактерией рода *Azotobacter*

1.1.1 Бактерии рода *Azotobacter*, способные к биосинтезу альгинатов и полиоксиалканоатов

Бактерии рода *Azotobacter* относятся к семейству *Pseudomonadaceae* и являются строгими аэробами и гетеротрофами, способными к фиксации свободного азота за счет галичия фермента – нитрогеназы [Jiménez, Montaña, Martínez, 2011]. Этот род относится к субклассу *Proteobacteria* и содержит семь видов: *A. chroococcum*, *A. vinelandii*, *A. beijerinckii*, *A. paspali*, *A. armeniacus*, *A. nigricans* и *A. salinestri*. Это грамм-отрицательные бактерии размером 2-4 мкм, в основном кокковидной формы, однако весьма плеоморфны и легко меняют форму под воздействием условий окружающей среды, склонны к образованию цист. Бактерии рода *Azotobacter* широко распространены в почве, воде и осадочных отложениях [Tejera и др., 2005]. Бактерии получают из почвы путем рассева на агаровой среде, причем для бактерий рода *Azotobacter* используют среду Эшби, которая не содержит источник азота и, в данном случае, является элективной, так как для этих бактерий необязателен источник азота в среде, они фиксируют его из воздуха [Jiménez, Montaña, Martínez, 2011]. Для биотехнологии эти бактерии важны, так как они способны к синтезу целого ряда веществ: антибиотиков, факторов роста растений [Salmeron, Martinez, Gonzalez, 1990], витаминов, пигментов [Sabra, Zeng, Deckwer, 2001], а также они обладают цитостатическим эффектом против патогенов растений [Pandey, Kumar, 1990]. Одной из особенностей бактерий этого рода является то, что они способны к синтезу полимеров, таких как полиоксиалканоаты (ПОА), которые являются запасным веществом энергии и углерода и, альгинаты (АЛГ), которые выполняют защитную функцию от кислорода и двувалентных катионов [Segura, Guzman, Espin, 2003]. Полиоксиалканоаты и альгинаты обладают уникальными свойствами, такими как биосовместимость и биоразлагаемость, что позволяет рассматривать их в качестве перспективных материалов для применения в медицине, и, в частности, в тканевой инженерии.

1.1.2 Альгинаты

Впервые альгинаты были выделены еще в 1881 году из бурых водорослей, у которых они входят в состав клеточной стенки и межклеточного вещества [Nussinovitch, 1997], выполняя структурную и защитную функции. Позже, в шестидесятых-семидесятых годах XX столетия альгинаты были найдены у бактерий, таких как *Pseudomonas* sp. и *Azotobacter* sp., у которых они выполняют защитную функцию [Мое и др., 1995].

АЛГ это полисахариды, полиуроновые кислоты — сополимеры β -D-маннуроновой кислоты и α -L-гулуруновой кислоты в пиранозной форме, связанные 1 \rightarrow 4 гликозидной связью (Рисунок 1). Эти полимеры линейны и в нативной форме длина полимеров может достигать 1000-10 000 моносахаридов на молекулу [Усов, 1999].

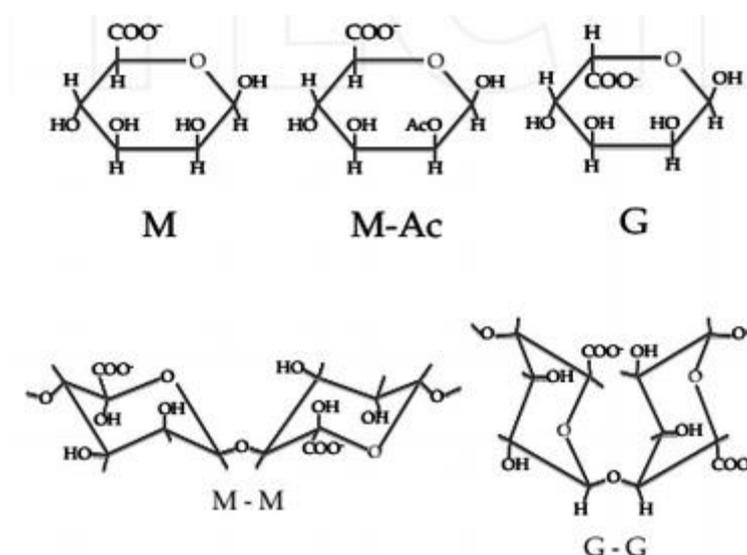


Рисунок 1. Строение мономеров альгината, маннуроновая кислота (M), гулуруновая кислота (G), ацетилирование (Ac), 1-4 гликозидная связь между мономерами.

Мономерный состав АЛГ влияет на его физико-химические свойства. Так же большое влияние оказывает распределение мономеров в цепи. Мономеры могут располагаться в виде гомоблоков из маннуроновых или гулуруновых остатков, или же в виде смешанных блоков. При добавлении к раствору АЛГ свободных ионов

кальция, например, в виде хлорида кальция, образуется гель за счет взаимодействия гулуриновых блоков с двухвалентным катионом. При таком взаимодействии образуется так называемая «egg-box» структура (Рисунок 2), за счет которой АЛГ при достаточной концентрации и достаточном количестве гулуриновых остатков, способен удерживать форму и из жидкости превращается в гель. Таким образом происходит процесс «гелирования» АЛГ [Peña и др., 2011].

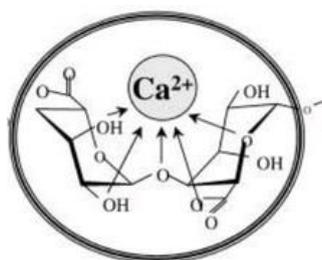


Рисунок 2. «Egg-box» модель взаимодействия альгината с ионами кальция.

Основным отличием бактериальных альгинатов является то, что в них некоторые остатки маннуриновой кислоты ацетилированы по положениям углеродной цепи 2 и/или 3 [Skjak-Bræk, Grasdalen, Larsen, 1986]. Бактериальные АЛГ, ацетилированные по ОН-группам, полиэлектролитически ведут себя не так, как неацетилированные водорослевые АЛГ. Это происходит потому, что ацетильные группы нарушают стереорегулярную последовательность и вносят конформационные изменения. К тому же наличие ацетильных групп снижает связывание и селективность, влияя таким образом на гелевые свойства АЛГ. Также, они увеличивают вязкость и набухание полимера [Clementi, 1997; Peña, Hernandez, Galindo, 2006].

Считается, что АЛГ нужен клетке для создания защитной оболочки в качестве барьера для кислорода [Sabra, Zeng, Deckwer, 2001], наличие которого ингибирует активность нитрогеназы, осуществляющей фиксацию молекулярного азота [Dobereiner, Day, Dart, 1972]. Так же показано, что этот барьер защищает клетку от токсичных тяжелых металлов, так как обладает высокой аффинностью к

двухвалентным катионам, а также снижает неблагоприятное влияние условий окружающей среды [Clementi, 1997].

1.1.3 Полиоксиалканоаты

Жироподобные запасные вещества в клетках бактерий рода *Azotobacter* были выявлены в начале XX века [Meyer, 1903]. Было показано, что эти вещества растворяются в хлороформе [Stapp, Ruschmann, 1924], а структура вещества была открыта в 1926 году [Lemoigne, 1926]. При разложении жироподобного вещества в анаэробных условиях образуется β -оксимасляная кислота, а само вещество было названо поли-3-оксибутират (ПОБ). ПОБ заинтересовались после того, как была проведена взаимосвязь соотношения концентрации углерода к концентрации азота в среде. Чем больше концентрация углерода и меньше концентрация азота, тем больше аккумулируется ПОБ в клетках бактерий, а при снижении концентрации углерода в питательной среде происходит деградация ПОБ внутри клеток [Macrae, Wilkinson, 1958]. Таким образом был сделан вывод, что ПОБ является запасным, резервным веществом бактерий, являясь источником энергии в случаях низкой концентрации источников углерода в среде. Была описана методика выделения ПОБ из бактериальных клеток с использованием щелочного гипохлорита, что обеспечило легкость дальнейшей работы с полимером.

Если полимер состоит только из мономеров масляной кислоты, то он называется поли-3-оксибутират. Так же возможны различные сополимеры ПОБ с другими мономерами, например мономерами валерьяновой кислоты или с полиэтиленгликолем. Все эти модификации влияют на физические и химические свойства полимера [Foster, 2007]. Такие полиэфиры бактериального происхождения относятся к полиоксиалканоатам (ПОА) [Волова, Севастьянов, Шишацкая, 2003].

Поли-3-оксибутират $\text{H}(\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_2)_n\text{OH}$ является гомополимером D-3- β -оксимасляной кислоты, это полиэфир состоящий из регулярных, повторяющихся

единиц ($C_4H_6O_2$). ПОБ в твердом состоянии частично находится в аморфном состоянии, а частично в кристаллическом. При чем при высыхании из раствора ПОБ укладывается в ламели и сферолиты. Так как ПОБ является запасным веществом бактериальной клетки, количество его в клетке и молекулярная масса зависят от условий окружающей среды. «Внутри клеток ПОБ, как и другие ПОА, аккумулируется в цитоплазме в виде сферических включений (гранул) и находится в гранулах в подвижном аморфном состоянии» [Волова, Севастьянов, Шишацкая, 2003]. Однако, после экстракции хлороформом он кристаллизуется и теряет способность к деградации внутриклеточными эстеразами [Barnard, Sanders, 1989].

Различные бактерии способны к синтезу разнообразных ПОА. Строение ПОА зависит от субстратной специфичности ферментов синтеза ПОА, что в свою очередь зависит от рода бактерий, а также от типа субстрата в культуральной среде. Лишь немногие бактерии в естественных условиях синтезируют не гомополимер [Steinbüchel и др., 1992]. В основном в лабораторных условиях сополимеры получают добавляя в ростовую среду бактерий определенные вещества, которые затем микроорганизм может включать в полимерную цепь ПОА.

ПОА обладают широким спектром переменных свойств, что позволяет применять их в самых разных областях. Наиболее перспективно их применение в областях медицины и фармакологии. ПОА выгодно отличаются от химически синтезируемых полимеров, неразрушаемых в природной среде. Основное их преимущество в том, что они обладают биосовместимостью, а также деградируют в организме, не оказывая побочных эффектов [Bonartsev и др., 2011]. Таким образом, ПОА подходят в качестве материала для получения биополимерных систем [Williams и др., 1999].

Такая переменность свойств полимера, а также то, что он является биосовместимым и биodeградируемым, позволяет использовать его в тканевой инженерии и фармакологической промышленности.

1.1.4 Биосинтез альгинатов и полиоксиалканоатов бактериями рода *Azotobacter*

Бактерии рода *Azotobacter* – строгие аэробы [Jiménez, Montaña, Martínez, 2011]. Как было сказано ранее, эти бактерии способны к синтезу двух типов биополимеров – это полиоксиалканоаты (ПОА) и альгинаты (АЛГ). ПОА в клетке выполняют функцию запасного вещества, АЛГ необходим микроорганизмам для формирования цист в стрессовых условиях [Remminghorst, Rehm, 2006], а так же АЛГ у бактерий выполняет функцию защиты от тяжелых металлов, кислорода, пересыхания и низких и высоких температур [Sabra, Zeng, Deckwer, 2001].

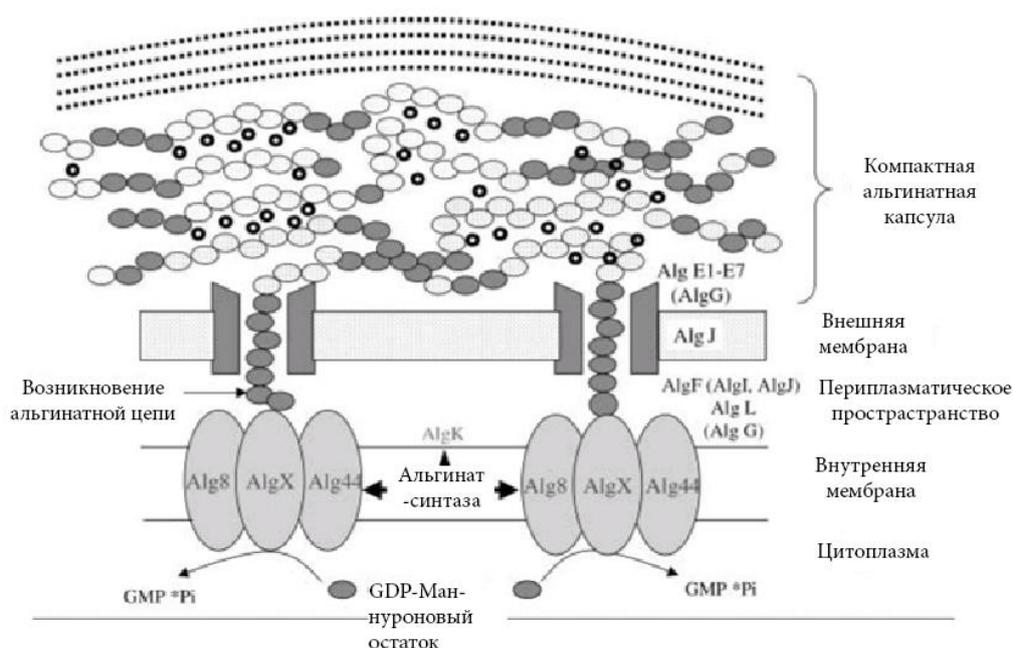


Рисунок 3. Модель биосинтеза, полимеризации и модификации альгината у бактерий. [Mærk, 2014]

Синтез АЛГ хорошо изучен и проходит по одному пути у бурых водорослей и бактерий родов *Pseudomonas* sp. и *Azotobacter* sp. [Pindar, Bucke, 1975]. Фруктоза-6-фосфат, предшественник этого метаболического пути, превращается за счет четырех фермент-зависимых реакций пути Энтнера-Дудурова [Beale, Foster, 1996]

в активированную GDP-маннуроновою кислоту (Рисунок 3) [Galindo и др., 2007; Remminghorst, Rehm, 2006]. Полимеризация маннуронозой кислоты происходит за счет внутримембранной полимеразы (Alg8), а ее активность регулируется другим мембранным белком (Alg44), необходимым для синтеза АЛГ [Galindo и др., 2007]. Полученная полиманнуронозая кислота затем модифицируется периплазматическим О-ацетилирующим комплексом (AlgI, AlgV, AlgF) и некоторые из неацетилированных остатков эимеризуются в гулуруновые периплазматической маннуронат-эимеразой (AlgG). Полученный полимер затем экспортируется сквозь порообразующий белок AlgJ, внутри которого присутствует активность некоторых С-5 эимераз (AlgE1-7), и образует структуры, содержащие G-блоки разной длины [Ertesvåg, Valla, 1999]. Молекулярные факторы, влияющие на молекулярную массу полимера пока не известны, однако предполагается, что это результат полимеразной и лиазной активности. У *A. vinelandii* известно наличие пяти различных альгинатлиаз с разной клеточной локализацией, активностью и специфичностью [Trujillo-goldan и др., 2003].

AlgL является периплазматическим белком и участвует в биосинтезе полисахарида. – внеклеточные белки – участвуют в высвобождении полимера от клеточной стенки. Разрыв оболочки цисты происходит с участием внеклеточных белков AlgE7 (бифункциональная альгинатлиаза и С-5 эимераза) и AlyA3 (альгинатлиаза). Функции лиаз AlyA1 и AlyA2 пока неизвестны [Gimmestad и др., 2009].

ПОБ в *A. vinelandii* синтезируется в три этапа из ацетил-КоА [Manchak, Page, 1994]. β -Кетотиолаза катализирует первую реакцию, то есть конденсацию двух молекул ацетил-КоА, которые образуют ацетоацетил-КоА, который, в свою очередь, восстанавливается НАДФ-зависимой ацетоацетил-КоА-редуктазой с образованием β -гидроксибутирил-КоА. ПОБ синтаза катализирует конечную реакцию: полимеризацию β -гидроксибутирил-КоА. Генный кластер *phbBAC*, кодирующий ферментативные активности β -кетотиолазы, ацетоацетил-КоА-

редуктазы и ПОб-синтазы соответственно, был описан в *A. vinelandii* [Peralta-Gil и др., 2002; Segura, Cruz, Espín, 2003; Segura, Vargas, Espín, 2000] и *Azotobacter* sp. штамм FA8 [Pettinari и др., 2001]. В той же области ДНК, где обнаружены гены *phbBAC*, были также обнаружены другие гены, связанные с синтезом ПОб: *phbR*, который кодирует член семейства транскрипционных активаторов AraC; *phbP*, кодирующий предполагаемый гранул-ассоциированный белок, и *phbF*, предполагаемый регулятор *phbP* [Peralta-Gil и др., 2002; Segura, Cruz, Espín, 2003].

Регуляция синтеза ПОб у *A. vinelandii* достаточно сложна. В дополнение к аллостерическому контролю первого биосинтетического фермента β -кетотиолазы с помощью соотношения КоА / ацетил-КоА, которое было описано много лет назад [Senior, Dawes, 1973], в регуляции активности β -кетотиолазы участвуют и другие регуляторные системы. Транскрипция биосинтетического оперона *phbBAC* инициируется двумя перекрывающимися промоторами, *pB1* и *pB2*. *PhbR*, кодируемый *phbR*, активирует транскрипцию оперона *PHB* с промотора *pB1*, тогда как транскрипция с *pB2* зависит от сигма-фактора *RpoS* и увеличивается во время стационарной фазы роста. Сама транскрипция *phbR* также начинается с двух промоторов, *pR1* и *pR2*. Транскрипция из *pR2* также индуцируется во время стационарной фазы и зависит от *RpoS*, хотя, вероятно, косвенным образом [Peralta-Gil и др., 2002].

Таким образом, исследователями была предложена следующая модель регуляции: в экспоненциально растущих клетках сбалансированные условия роста ингибируют присутствующую активность β -кетотиолазы, а также наблюдается низкая транскрипция *phbBAC*, вызванная как отсутствием *RpoS*, что влияет на транскрипцию от одного промотора биосинтетического оперона ПОб, так и низкой концентрацией *PhbR*, транскрипция которого также частично зависит от этого сигма-фактора [Peralta-Gil и др., 2002]. При входе в стационарную фазу увеличение транскрипции *rpoS* и, следовательно, *phbR* стимулирует транскрипцию оперона *phbBAC*. Кроме того, активность цикла трикарбоновых кислот может замедляться

во время стационарной фазы, что позволяет увеличить соотношение ацетил-КоА / КоА, что уменьшает ингибирующий эффект на β -кетотиолазу.

Двухкомпонентная глобальная регуляторная система, образованная сенсорной киназой GacS [Castaneda и др., 2000] и соответствующим регулятором ответа GacA, также участвует в контроле продукции ПОБ в *A. vinelandii*. Мутации либо gacS, либо gacA снижают продукцию ПОБ. Модель предполагает, что GacA играет роль позитивного регулятора синтеза ПОБ в его фосфорилированной форме. GacA необходим для транскрипции groS [Castañeda и др., 2001]. Следовательно, по крайней мере часть контроля, который эта система оказывает на синтез ПОБ, можно объяснить его влиянием на экспрессию сигма-фактора RpoS [Galindo и др., 2007].

1.2 Получение и исследование альгината

1.2.1 Влияние условий культивирования на биосинтез альгинатов

Использование АЛГ, синтезируемых бактериями рода *Azotobacter* является более предпочтительным, чем работа с бактериями рода *Pseudomonas*. Во-первых, бактерии рода *Pseudomonas* являются патогенными или условно патогенными, что затрудняет работу с ними. Во-вторых, их АЛГ обладают меньшей вязкостью, так как в их полимерной цепи реже встречаются остатки гулуруновой кислоты, которые и отвечают за образование сшивок [Clementi и др., 1995].

Основные параметры, влияющие на метаболизм бактерий, это состав среды и температура. Так же в зависимости от типа бактерий – аэробы они или анаэробы – влияет наличие кислорода и его концентрация.

Как было сказано, бактерии рода *Azotobacter* синтезируют два типа биополимеров, это альгинаты и полиоксиалканоаты. Синтез обоих типов полимеров начинается с расщепления глюкозы и именно условия культивирования влияют на дальнейшее направление метаболизма.

Основным параметром, влияющим на рост бактерии и синтез ими полимеров, является аэрация [Galindo и др., 2007]. ПОА синтезируются при низкой концентрации растворенного кислорода в среде. Синтез биомассы у *Azotobacter* всегда происходит при высокой концентрации кислорода. Эффективная конверсия сахара в АЛГ достигается только если аэрация находится между 1 и 10% [Parente и др., 2000; Peña, Trujillo-Roldán, Galindo, 2000; Sabra и др., 2000; Trujillo-roldan и др., 2003]. Степень аэрации также влияет на мономерный состав и молекулярную массу полимера [Peña, Trujillo-Roldán, Galindo, 2000; Sabra, Zeng, Deckwer, 2001; Trujillo-Roldan и др., 2004]. Также показано, что добавление фосфатов вызывает уменьшение количества АЛГ [Sabra и др., 1999]. А добавление источников азота увеличивает синтез АЛГ [Larsen, Haug, 1971].

Молекулярная масса полимера зависит от аэрации и скорости перемешивания при культивировании. Например, при культивирования при низкой скорости перемешивания (300 об/мин) и аэрации 5% максимальная молекулярная масса достигает 680 кДа, а при высокой скорости перемешивания (700 об/мин) молекулярная масса достигает плато при аэрации 1-3% и снижается при увеличении аэрации (5%) [Peña, Trujillo-Roldán, Galindo, 2000]. С другой стороны, было показано, что при увеличении аэрации и низких концентрациях фосфатов молекулярная масса и содержание гулурановой кислоты значительно повышается [Sabra и др., 2000]. Показано, что при культивировании в среде в присутствии дрожжевого экстракта (наличие азота снимает необходимость клетки защищать нитрогеназу от кислорода) регулирование аэрации также позволяет влиять на молекулярную массу АЛГ [García и др., 2020].

Известно, что на синтез полимера, кроме концентрации кислорода, влияет состав культуральной среды. Было исследовано влияние концентрации кальция, фосфатов и источника азота на синтез и молекулярную массу АЛГ [Parente и др., 2000; Sabra и др., 1999]. Показано, что увеличение концентрации фосфатов вызывает снижение синтеза АЛГ [Sabra и др., 1999], а добавление в культуральную

среду источника азота, такого как пептон, триптон и экстракт дрожжей, увеличивает количество синтезируемого АЛГ, а при использовании пептона получается АЛГ с самой высокой молекулярной массой [Zapata-Vélez, Trujillo-Roldán, 2010].

Уменьшение концентрации железа и молибдена приводит к увеличению концентрации АЛГ [Deavin и др., 1977; Ferrala и др., 1986], снижение же концентрации ионов кальция не приводит к увеличению биосинтеза АЛГ и биомассы [Obika, Sakakibara, Kobayashi, 1993]. При уменьшении концентрации сахарозы в среде можно было бы ожидать, что концентрация АЛГ уменьшится, однако количество АЛГ оставалось прежним, что указывает на его значение для жизнедеятельности клетки. При избытке же сахара количество АЛГ возрастало [Sabra, Zeng, Deckwer, 2001].

1.2.2 Получение и выделение альгинатов

В промышленном процессе, для получения АЛГ из водорослей, влажные или сухие водоросли сначала измельчают и промывают, затем обрабатывают карбонатом натрия, и таким образом получают неочищенный альгинат натрия. Затем добавляют раствор хлорида кальция, альгинат кальция выпадает в осадок, осажженный альгинат кальция обрабатывают кислотой, чтобы удалить ионы кальция. К смеси добавляют примерно то же количество твердого карбоната натрия и затем полутвердую смесь измельчают до получения пасты альгината натрия. Наконец, пасту сушат и измельчают, получая порошкообразный продукт. Этот процесс достаточно грубый и получается грязный продукт, хотя, путем осаждения спиртом можно получить более чистый продукт. Жесткие условия добычи и переработки, как правило, влияют на цвет и состав продукта. Твердые примеси, такие как остатки клеточной стенки и частиц песка, не полностью удаляются, а также часто присутствует определенный запах [Bixler, Porse, 2011; Gacesa, 1988].

Этот традиционный процесс зависит от поставок водорослей, содержащих АЛГ, что неудобно из-за неконтролируемой численности необходимых водорослей в природе. Также, при выделении АЛГ из водорослей может быть необходима дополнительная очистка, особенно если материал требуется для пищевой или фармацевтической промышленности [Imrie, 1973]. Эти трудности, как правило, ограничивают обширное использование АЛГ. Соответственно, существует потребность в новой, простой технике, которая позволит получать АЛГ в промышленном масштабе, на требуемом уровне чистоты из недорогих и легко доступных исходных веществ.

Поэтому сейчас активно развиваются способы получения АЛГ с использованием микроорганизмов, способных к его биосинтезу. Такой биосинтез позволяет регулировать молекулярную массу полимера, мономерный состав, длину блоков гомономеров, длину смешанных блоков, ацелирование (в отличие от АЛГ водорослей, бактериальный АЛГ ацелирован по положениям О-2 и/или О-3 мануринового остатка), что влияет на физико-химические свойства получаемого полимера [Clementi, 1997; Nivens и др., 2001], такие как растворимость, удержание влаги и эластичность [Zhang, Cheng, Ao, 2021].

Выделенный из бактерий АЛГ оказывается намного чище и обладает большей молекулярной массой, что выгодно отличает его от водорослевых АЛГ. В работе Логинова (2011), для получения АЛГ с помощью бактерий используют похожий способ выделения, но при этом не стоит задача избавления от крупных частиц, которые получаются при использовании водорослей в качестве субстрата. АЛГ интересен тем, что в кислой среде он выпадает в осадок в виде альгиновой кислоты, а в щелочной среде в присутствии натриевых солей он растворяется. Также, его можно осадить, добавив в раствор ионы кальция либо добавив спирт. Эти его свойства позволяют достаточно просто и быстро выделить и очистить АЛГ от бактериальной массы [Логинов, 2011].

Также для выделения и очищения АЛГ может использоваться ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота). Благодаря своему строению она проявляет свои хелатирующие свойства и конкурентно реагирует с ионами кальция, таким образом переводя нерастворимый альгинат кальция в растворимый альгинат натрия, что приводит к разрушению альгинатной оболочки бактерий и высвобождению альгината натрия в раствор. Если альгинат натрия нужно выделить из сухого альгината кальция, то добавляют также 1% растворы $\text{Na}(\text{CO}_3)_2$ и NaHCO_3 в соотношении 10:1, после чего, когда осадок альгината кальция растворится полностью, его переосаждают спиртом и высушивают.

Однако, самый простой способ, это переосаждение спиртами (этанолом или изопропиловым спиртом) с последующим высушиванием АЛГ до постоянной массы [Четвериков и др., 1994].

1.2.3 Характеристики альгинатов

Основными характеристиками, влияющими на свойства АЛГ, являются молекулярная масса полимера, мономерный состав цепи, а также процент ацетилирования маннуроновых остатков. От мономерного состава, а именно от процента гулуруновых мономеров в мономерной цепи и их блочности, как было сказано в разделе 1.1.2, зависит способность АЛГ к связыванию двухвалентных катионов, к примеру, ионов кальция [Franklin и др., 2011]. Также на степень гелирования АЛГ влияют условия среды, такие как, например, кислотность [Draget, Skjåk Bræk, Smidsrød, 1994].

Для определения мономерного состава АЛГ используют кислотный гидролиз с дальнейшими реакциями в присутствии карбазола, индола, 3-оксибифенила и образованием окрашенных осадков, однако здесь есть сложности, связанные с тем, что в кислой среде АЛГ выпадает в осадок, а также происходит деструкция некоторых мономерных остатков. Более эффективным методом является спектроскопия ЯМР (ядерно-магнитный резонанс) ^1H и ^{13}C , которая позволяет

определить не только мономерный состав, но и распределение мономеров в цепи. От процента ацетилирования манурановых остатков зависит конформация цепи, что также влияет на способность к гелеобразованию [Clementi и др., 1995]. Оба этих параметра можно исследовать с помощью инфракрасной спектроскопии и ядерно-магнитного резонанса.

Молекулярная масса же влияет на жесткость и прочность образовавшегося геля. Для определения молекулярной массы определяют удельную вязкость полимера методом вискозиметрии по формуле (1):

$$\eta_{уд} = (t - t_0) / t_0, \quad (1)$$

где: t_0 - время истечения растворителя, сек; t - время истечения раствора полимера, сек.

Молекулярную массу рассчитывают, используя уравнение (2) Марка-Хаувинка-Сакурада [Martinsen и др., 1991]

$$[\eta] = K * (M)^a, \quad (2)$$

используя следующие коэффициенты: для АЛГ $K = 7.3 * 10^{-5}$; $a = 0.92$ [Усов, 1999];

1.2.4 Использование альгинатов в медицине

АЛГ в чистом виде в медицине используются преимущественно при лечении заболеваний желудочно-кишечного тракта. Лечебные свойства АЛГ можно ярко продемонстрировать на следующем примере.

На базе ГБУЗ ЦНИИГ ДЗМ [Янова, Березина, Ким, 2013] было проведено исследование влияния АЛГ в качестве добавки к препаратам для облегчения гастроэзофагеального рефлюкса (ГЭР) на примере двух препаратов – Гевискон ДД, включающий в состав альгинат натрия карбонат кальция и гадрокарбонат натрия, и препарата антацид Ренни, не включающий в состав альгинат и состоящий из карбоната кальция и карбоната магния. В препарате Гевискон карбонат кальция обеспечивает гелирование альгината натрия, что приводит к образованию «плота»,

который всплывает за счет гидрокарбоната натрия, одним из продуктов распада которого в кислой среде желудка является CO_2 . [Hampson и др., 2005].

Влияние препаратов оценивалось по суточным измерениям pH до и после приема пищи. Было показано, что при приеме препаратов натошак за 3 часа до приема пищи оба препарата действовали одинаково, снижая кислотность желудка. Особенно важно то, что в обоих случаях после приема препаратов уже после окончания их действия в желудке не повышалась кислотность. Это свидетельствует о том, что в данном случае нет «синдрома отмены» и эффекта «кислотного рикошета», то есть не увеличивается секреция соляной кислоты, и данные препараты не вызывают повышения синтеза гастрин [Охлобыстин, 2002].

В случаях, когда оба препарата принимали после приема пищи было показано, что препарат без содержания АЛГ не препятствует возникновению ГЭР после еды, а препарат с содержанием АЛГ снижает кислотность желудка, что свидетельствует о высокой антирефлюксной эффективности препарата за счет содержания АЛГ [Янова, Березина, Ким, 2013].

Кроме того, было разработано применение АЛГ в качестве раневых и ожоговых покрытий, так как АЛГ предотвращает пересыхание поврежденных тканей, но при этом проявляет барьерные свойства, и может включать в себя антибактериальные лекарственные вещества.

Было проведено сравнение раневых повязок, полученных из тонких нитей АЛГ водорослевого и бактериального. Нити альгината кальция из бактериального альгината натрия формируются более тонкие, чем из водорослевого, однако прочность их достаточная для формирования тканевого полотна. Было показано, что раневые повязки из нитей бактериального АЛГ при водопоглощении лучше формируют гидрогель, он более однородный, аморфный, не видны нити, водопоглощение раневых повязок из бактериального АЛГ в два раза выше, чем у водорослевых АЛГ. Таким образом такие повязки лучше снимаются с раневых

поверхностей, снижая повреждение тканей за счет лучшего растворения при снятии с помощью хлористого натрия [Hoefler и др., 2015].

1.3 Разработка конструкций из биополимеров для биоинженерии

Существует множество полимеров, которые синтезируют живые организмы. Биополимеры являются важными и необходимыми компонентами живой природы. Это вещества, состоящие из мономеров, соединенных друг с другом ковалентными связями. В зависимости от состава биополимеры делят на гомополимеры и гетерополимеры. Гомополимеры состоят из одинаковых мономерных остатков, например крахмал, мономером которого является альфа-глюкоза. А гетерополимеры состоят из различных мономеров. Однако, гомополимеры могут обладать разными свойствами в зависимости от типов связи между мономерными остатками. Их цепи могут быть как разветвленными, так и не разветвленными - линейные полимеры. Это влияет на их химические и физические свойства [Yates, Barlow, 2013]. Большинство биополимеров являются запасными веществами, их функция – запасать энергию в виде химических связей. Кроме того, они могут выполнять, например, каркасную и защитную функции.

Разработка двумерных и трехмерных матриц необходима для создания каркасов с подходящими медико-биологическими и физико-химическими свойствами, которые могут служить основой для восстановления органов и тканей в хирургии.

«Исследования в области материалов медицинского назначения являются одним из актуальных направлений на стыке химии высокомолекулярных соединений, физической химии, молекулярной биологии, биофизики и медицины и включают в себя следующие взаимосвязанные задачи:

- разработку новых материалов или методов их модификации;
- изучение механизма взаимодействия биоматериалов с кровью и ее компонентами;

- разработку количественных методов оценки физико-химических и медико-технических свойств биоматериалов и изделий из них;
- экспериментально-клиническое применение материалов и изделий из них» [Егорова, 2005].

Создание биоискусственных систем позволяет разрабатывать изделия для временной или постоянной замены жизненно важных органов и тканей. Трехмерная структура благоприятствует частичному или полному восстановлению структуры тканей, добавление в конструкцию клеток, взятых у пациента или от доноров усиливают эффект восстановления. Пористые трехмерные структуры из биополимеров – матриксы, выполняют каркасную функцию, поддерживая рост клеток в объеме [Griffith, 2002; Sevastianov, 2014]. Такие матриксы, имитируя структуру внеклеточного матрикса (ВКМ), играют роль подложки, поддерживая рост и пролиферацию клеток. Структура матриксов может влиять на формирование тканей в организме, как из внесенных клеток, так и при прорастании клеток самого организма – ускоряя и облегчая таким образом регенерацию тканей [Maquet, Jerome, 1997].

1.3.1 Дегградация биополимеров

Важным свойством биополимеров является их способность к биодеградации. Биодеградация в организме — это способность полимера к разложению на нетоксичные вещества, легко выводимые из организма. В зависимости от функции имплантата подбираются материалы с определенной скоростью биодеградации или совершенно не деградирующие (например, для изделий, полностью заменяющих жизненно важные органы). Биодеградация материала в организме тесно связана с воспалительной тканевой реакцией. А именно, от скорости биодеградации и состава материала зависит степень иммунного ответа [Севастьянов, Кирпичников, 2011].

Получение матриц возможно как из синтетических материалов, так и из материалов природного происхождения, таких как, например, биополимеры, металлы, сплавы, композитные материалы и керамика. Также возможно получение матриц из тканей организмов путем отмывания ВКМ от клеточного материала, сохраняя структуру органа или ткани.

Биодеградируемые полимеры в данном случае дают возможность получения матриц, способных к поддержанию восстановления тканей, не препятствуя образованию собственного ВКМ с последующим замещением структуры матрикса. В данном случае важны такие свойства материала, как скорость биодеградации и отсутствие токсичности продуктов разложения, легкость их выведения или же усвоения. Таким образом снижается иммунный ответ и воспалительный процесс проходит после полного выведения материала из организма. [Griffith, Naughton, 2002]. Если же скорость деградации слишком низка или же материал не подвергается деградации, то это может привести к осложнениям, вызванным присутствием инородных материалов в теле реципиента. [Maquet, Jerome, 1997].

Деградация полимеров может быть обусловлена различными факторами, которые можно подразделить на физиологические факторы и факторы внешней среды. К физиологическим факторам относятся кислотная среда, ферментативная активность, окислительно-восстановительный потенциал, концентрация глюкозы. К факторам внешней среды относятся температура, свет, механическое воздействие, магнитное поле и т.д. [Guarino и др., 2015]

Известно, что ПОБ и его производные в организме разлагаются медленнее, чем многие активно используемые материалы для имплантатов. Это снижает иммунную реакцию в ответ на имплантацию. Основным фермент, разлагающий ПОБ, это бактериальный фермент ПОБ-деполимераза. Деградация происходит в две стадии – адсорбция фермента и, собственно, разрезание полимерной цепи. Однако, в организме ПОБ деградирует за счет неспецифических эстераз [Босхомджиёв и др., 2009]. Изначально полимер как бы разбухает под действием

межклеточной жидкости. Неспецифичные эстеразы проникают вовнутрь и разрезают цепочки, уменьшая таким образом молекулярную массу полимера, но не уменьшая его количество. Эта стадия позволяет увеличить скорость биodeградации путем открытия большего количества свободных концов полимера. Процесс ферментативной биodeградации происходит в две стадии: адсорбция фермента и гидролиз эфирных групп полимера [Löbner и др., 2002]. Продукты распада – вода, диоксид углерода и оксимасляная кислота. Биodeградация ПОб напрямую зависит от степени его кристалличности [Босхомджиев и др., 2009]. Таким образом, биodeградация изделий из ПОб относится к гидролитическому распаду цепи полимеров по классификации процессов деградации полимерных имплантатов, а также к разрушению полимер-полимерных комплексов в случае сополимеризации [Севастьянов, Кирпичников, 2011].

Деградация АЛГ зависит от кислотности среды, так как АЛГ растворим в водной среде и образует гидрогели. Показано, что АЛГ стабильны только при рН от 5 до 10. В зависимости от рН АЛГ деградирует по двум разным механизмам [Haug, Larsen, Smidsrød, 1963]. При рН меньше 5 доминирует кислотный гидролиз, который описан Тиммелом и его коллегами, который происходит в три стадии: протонирование гликозидного кислорода, что приводит к формированию альгиновой кислоты, сопряженной с основанием; гетеролиз сопряженной кислоты, в результате которого образуется нередуцированная концевая группа – ион оксония; реакция иона оксония с водой, в результате которой образуется редуцированная группа [Timell, 1964]. При рН больше 10 деградация происходит по типу щелочного разложения [Haug, Larsen, Smidsrød, 1963].

Ферментативное разложение АЛГ происходит в организмах за счет ферментов класса альгинат-лиаз. Однако в человеческом организме ферменты этого класса отсутствуют. Альгинатлиазы катализируют разложение АЛГ по механизму щелочного гидролиза и различаются по предпочтению 4-О гликозидной связи между мономерами М-М, М-Г или G-G [Haug, Larsen, Smidsrød, 1963].

Предположительный механизм ферментативного разложения АЛГ: снятие отрицательного заряда на карбоксильном анионе, отделение протона на С5 положении, перенос электрона с карбоксильной связи с дальнейшим образованием двойной связи между С4 и С5, что приводит к расщеплению 4-О гликозидной связи [Gacesa, 1988].

1.3.2 Гидрогели в биомедицине

Как уже обсуждалось в главе 1.1.2, важным свойством АЛГ является их способность к образованию гидрогелей.

Гидрогели — это полимерная сеть, в которой полимерные цепи связаны между собой, гидрогели обладают способностью удерживать в себе большое количество воды, при этом сохраняя свою молекулярную структуру и трехмерную форму. Такое их свойство позволяет использовать их в широком спектре применений [Ahmed, 2015; Warson, 2000]. Так же они обладают гибкостью, схожей с гибкостью тканей организмов. Высокое водопоглощение, удержание воды и гибкость позволяет использовать гидрогели в биомедицине [Feksa и др., 2018]. Гидрогели могут быть как натурального происхождения, так и синтетические.

Существует несколько типов классификации гидрогелей:

1. Классификация на основании происхождения материала – синтетические или натуральные полимеры.
2. Классификация на основании состава полимера.
 - Гомополимер
 - Сополимер (состоящий из смеси полимеров, двух или более)
 - Взаимопроникающий мультиполимерный гель (состоящий из двух независимых полимеров, образующих две полимерные сети в смеси. Также существует вариант, когда один полимер образует сеть, а второй - нет)
3. Классификация на основании структуры полимерной цепи.
 - Аморфная

- Полукристалличная (смесь кристаллической и аморфной структур)
 - Кристаллическая
4. Классификация на основании типа связи между полимерными нитями.
 - Химическая связь между полимерными цепями (постоянная)
 - Физическая связь (ионных взаимодействия, гидрофобные взаимодействия – менее устойчивые связи)
 5. Классификация на основании метода получения гидрогеля.
 6. Классификация на основании заряда полимера.
 - Нейтральные
 - Положительно или отрицательно заряженные
 - Обладающие амфотерным зарядом
 - Содержащие цвиттер-ионы

Основные биополимеры натурального происхождения, формирующие гидрогели, это белки, например коллаген и желатин, или же полисахариды, такие как крахмал, сахароза и альгинат. Под действием различных факторов окружающей среды они могут менять форму и содержание воды.

Гидрогели, благодаря их свойствам, можно применять в различных сферах, таких как гигиенические и косметические продукты [Singh и др., 2010], пищевые добавки [Chen и др., 1995], системы доставки лекарств [Hamidi, Azadi, Rafiei, 2008; Singh и др., 2010], фармацевтические препараты [Kashyap, Kumar, Kumar, 2005], тканевая инженерия и регенеративная медицина [Zhang и др., 2011], раневые покрытия [Sikareepaisan, Ruktanonchai, Supaphol, 2011], разделение биомолекул и/или клеток [Wang и др., 2010], барьерные материалы [Roy, Cambre, Sumerlin, 2010] и биосенсоры [Krsko и др., 2009]. Кроме того они могут быть использованы в сельском хозяйстве [Saxena, 2010], для герметизации [Singh и др., 2010], при осушении угля [Park, Kim, 2001], для получения искусственного снега [Singh и др., 2010], и так далее.

1.3.3 Применение альгинатов в качестве гидрогелей

Соли альгината натрия при взаимодействии с ионами кальция образует гидрогели. Они нетоксичны, биосовместимы, неиммуногенны, водорастворимы и биodeградируемы [Augst, Kong, Mooney, 2006; Hernández и др., 2010]. Эти свойства АЛГ позволяют использовать их в качестве биоматериала в разных биотехнологических и биомедицинских сферах, в том числе в тканевой инженерии. Не только соль альгината натрия, но и другие соли альгината, такие как соли кальция, калия и аммония, используются в коммерческих целях и были разрешены для использования в пищевой промышленности (Council Directive, 95/2/CE).

В зависимости от их мономерного состава и молекулярной массы, свойства АЛГ меняются, что дает возможность подбирать полимеры с нужными характеристиками для каждого конкретного использования [Hay, Rehman, Rehm, 2010]. Молекулярная масса АЛГ важна при формировании гидрогеля АЛГ для доставки лекарственных веществ, ферментов или белков [Lee, Mooney, 2012]. Для формирования матриц из АЛГ для тканевой инженерии рекомендуется использовать полимеры с высокой молекулярной массой, так как, возможно, полимер будет подвержен изменениям pH, что может повлиять на его характеристики [Sun, Tan, 2013]. Недавно было показано [Fischer и др., 2017; Hoefel и др., 2015], что высокоочищенный АЛГ, полученный с помощью *A. vinelandii*, из которого сделали волокна, обладает большей способностью к формированию гелей, чем АЛГ, полученный из водорослей. Наличие ацетилирования у бактериального АЛГ и его активная способность к гелеобразованию позволяет успешно использовать его в качестве раневых покрытий [Fischer и др., 2017]. Однако, биосовместимость бактериального АЛГ и влияние ацетилирования на рост культур тканей животных клеток не изучено.

Показано, что возможно успешное получение микрокапсул из АЛГ с включением фактором роста фибробластов (bFGF) и фактором роста эндотелия сосудов (VEGF). Выход факторов роста происходит за счет диффузии и зависит от

ионных связей между цепями альгината и молекулами включенных в микрокапсулы веществ. Выход фактора роста в данном случае был постоянный и равномерный в течение нескольких недель [Augst, Kong, Mooney, 2006].

Также было исследовано не только микрокапсулирование лекарственных веществ в водорослевый АЛГ, но и инкапсулирование эукариотических клеток. Такое инкапсулирование позволяет защитить трансплантированные клетки от иммунной системы [Hoesli и др., 2011]. Для такого инкапсулирования материал должен быть биосовместимым, инертным и сохранять форму и размеры. Альгинаты используют в качестве каркасов для тканевой инженерии в чистом виде, но возможность их химической модификации различными пептидами или протеинами усиливает адгезию клеток и способствует усилению регенерации тканей [Augst, Kong, Mooney, 2006; Hernández и др., 2010]. В данном случае, биомиметическая модификация полимера позволяет увеличить функциональность и механическую стабильность получаемого геля [Hernández и др., 2010].

Благодаря своей способности образовывать гель альгинат используется в качестве основы для биопринтирования [Distler и др., 2020]. Суспензируя в жидком виде в альгинате добавочные вещества, например гиалуроновую кислоту, и клетки возможно заливать такую суспензию в интересующую форму и затем гелировать, получая таким образом равномерную суспензию, превращенную в гель и поддерживающую свою форму [Antich и др., 2020]. Альгинат может как самостоятельно выступать в роли поддерживающего субстрата для роста клеток [Нео и др., 2020], так и являться дополнением к гидрофобным полимерным или керамическим основам, создавая гидрофильную благоприятную среду для клеток [Hernández-González, Téllez-Jurado, Rodríguez-Lorenzo, 2020; Rastogi, Kandasubramanian, 2019].

Добавление глюколактона с ионами кальция обеспечивает постепенное высвобождение ионов кальция при изменении рН среды, что приводит к постепенному и контролируемому гелированию альгината. Такой контроль

позволяет использовать гели альгината как инъекционные гели, в результате чего альгинат гелируется уже после инъекции [Hernández-González, Téllez-Jurado, Rodríguez-Lorenzo, 2020].

В пищевой индустрии АЛГ широко используются в качестве добавок для загущения продукта, его стабилизации, получения эмульсий и гелирования водных растворов. [Мое и др., 1995]. Наиболее важным применением, вероятно, является использование в производстве мороженого, где эти полимеры используются для предотвращения кристаллизации и усадки и позволяют получать однородный продукт. Другие области применения - горчица, горчичные соусы и заправки для салатов, где альгинат натрия используется для стабилизации продукта, чтобы он не расслаивался. АЛГ так же используется для стабилизации и загущения водной фазы в масляных эмульсиях, таких как майонез. Из-за их низкой калорийности эти полимеры могут использоваться в качестве наполнителей в рецептурах гипокалорийных продуктов, таких как обезжиренный майонез и спреды с низким содержанием жира. Сгущающие, стабилизирующие и эмульгирующие свойства АЛГ можно использовать для улучшения разнообразных напитков, таких как сухие фруктовые напитки. При производстве пива добавление солей альгината служит для повышения уровня пены. Помимо большой совместимости с липидами, сложноэфирные производные альгината растворимы при низких значениях pH и являются основным гидроколлоидом, используемым в пищевых продуктах, которые требуют растворимости и стабильности кислоты [Yilmazer, Carrillo, Kokini, 1991]. Благодаря своей способности образовывать термообратимые термостойкие гели, АЛГ используются в различных продуктах питания, таких как реструктурированные продукты, хлебобулочные изделия, джемы, десерты, молочные продукты, а также в консервированных кормах для домашних животных.

Свежее мясо, морепродукты и птицу можно обработать путем опрыскивания или погружения в раствор альгината натрия и последующего гелеобразования с хлоридом кальция, таким образом продукты будут покрыты защитной пленкой,

которую в последствии можно удалить обработкой растворами полифосфата [Earle, 1970].

1.3.4 Применение полиоксиалканоатов

Как уже говорилось выше, бактерии рода *Azotobacter* кроме альгинатов синтезируют полиоксиалканоаты. Их физико-химические свойства резко отличаются от свойств вышеописанных АЛГ. ПОА, в отличие от альгинатов, нерастворимы в воде, но также, как АЛГ, они биосовместимы и биоразлагаемы. Эти свойства позволяют использовать ПОА в качестве материала для изготовления различных хирургических изделий, таких как материалы для сердечно-сосудистой хирургии, сосудистые протезы, стоматологические и ортопедические хирургические временные крепежные элементы [Волова, Севастьянов, Шишацкая, 2003]. Пористые матриксы из ПОА и их производных по своим физическим характеристикам сходны с костью, что делает их пригодными для имплантации для регенерации различных костных дефектов.

Остеопластические материалы бывают разных видов по происхождению. Они делятся на материалы, полученные из организмов (аутогенные – донор пациент, аллогенные – донор другой человек, ксеногенные – донором является животное), а также материалы, полученные синтетическим путем. Аутогенные и аллогенные материалы наиболее схожи с органами реципиента, однако несут большой риск в связи с иммунным ответом, приводящим к отторжению или в результате заноса инфекции. А также забор аутогенных материалов может привести к осложнениям у пациента [Иванов и др., 2013].

Недостатками материалов синтетического происхождения является отсутствие у них свойств стимуляции костной регенерации. Однако, включение в состав имплантатов костных морфогенетических белков (от англ. bone morfogenic protein – BMP) приводит к усилению остеогенеза [Weiner, Wagner, 1998]. Таким образом, можно создавать объемные матриксы, приближая их строение к костной

структуре и наделяя их способностью индуцировать и контролировать остеогенез. При правильно подобранном количестве морфогенов и факторов роста можно контролировать скорость биодegradации полимера, приближая её к кинетике остеогенеза [Иванов и др., 2013].

На свойства матриксов влияет способ их изготовления из биодegradируемого материала. А именно от этого зависит кристалличность материала, размер пор, пористость, механические свойства, такие как упругость, деформация. Существует множество методов изготовления матриксов, рассмотрим основные из них.

Нетканное связывание полимерных нитей. Существует два способа изготовления таких матриксов. Первый это погружение нитей одного полимера в раствор другого, причем эти полимеры имеют разную температуру плавления. После испарения растворителя смесь нагревают и полимер с меньшей температурой плавления заполняет пустоты, образовавшиеся после испарения растворителя. Затем этот полимер удаляют другим растворителем. Таким образом нити первого растворителя сплавляются, не нарушая структуры, образуя нетканый пористый матрикс. Второй способ — это напыление одного полимера на нити второго. Первый полимер как бы склеивает нити между собой. Однако эти способы непригодны для внедрения вспомогательных веществ, таких как факторы роста [Олтаржевская, Коровина, Савилова, 2002].

Метод выщелачивания. Данный метод использует дополнительные вещества в качестве порообразователей, например поваренную соль NaCl. Раствором полимера заливается соль и после испарения растворителя соль вымывается водой. Пористость и размер пор таких матриксов можно контролировать — размер пор напрямую зависит от размера кристаллов соли, а пористость зависит от количества кристаллов. Такой метод позволяет вносить в полимер различные вещества, а также варьировать состав полимера [Агарова и др., 2015].

Порообразование с использованием газов. В данном методе диски из полимеров помещают в камеру, в которую под высоким давлением подают

углекислый газ. В этой камере полимер выдерживается в течение нескольких суток, давление постепенно снижают до атмосферного. В итоге полученные матриксы имеют пористость до 93%, а размер пор до 100 мкм. Но, к сожалению, полученная структура оказывается неодносвязной – поры в основном не связаны между собой, что не увеличивает биосовместимость [Марковцева, Немец, Севастьянов, 2006].

Методы с фазовым разделением. Существует две технологии, использующие разделение фаз для получения матриксов. Это лиофильная сушка и метод разделения жидких фаз. В основе метода лиофильной сушки лежит тот факт, что при низких температурах растворитель испаряется, а полимер нет. Таким образом получают матриксы с пустотами там, где были молекулы растворителя. В методе разделения жидких фаз создается две фазы – насыщенная полимером и ненасыщенная. После удаления ненасыщенной остается пористый полимерный матрикс. Но этот метод требует использования токсичных растворителей, что является недостатком при работе с клетками [Петрова и др., 2013].

Электроспиннинг. Для данного метода требуется определенный прибор. В процессе электроспиннинга полимер выдавливается через иглу с постоянной скоростью на металлическую подложку-коллектор. За счет того, что вокруг него прибор создает электростатическое поле высокой напряженности, наслаиваются нити на металлическую подложку. Механизм этого действия неясен. Но в результате получается матрикс, у которого можно регулировать не только пористость, но и направление нитей. Этот способ, пожалуй, самый легкий и перспективный в исполнении [Leong и др., 2009; Севастьянов, Кирпичников, 2011].

Полимеризация. Так же пористые матриксы можно получать методом полимеризации. При сополимеризации двух гомополимеров в вакууме образуется пористая структура. Однако этот метод позволяет получать матриксы исключительно небольших размеров. Этот метод непригоден для внедрения белков в полимер, так как для получения матрикса необходим вакуум, который разрушит белки.

Метод спекания. Измельченные полимеры при нагревании «спекают», и после остывания образуются пористые структуры. Так же этот метод используется при получении матриксов из керамики. Однако он так же непригоден для внедрения белковых молекул в матрикс, так как требует высоких температур [Ge, Fan, Yang, 2008].

Метод биопринтирования. Это наиболее современный метод получения матриксов. В данном методе используется технология печати, которая позволяет заранее моделировать строение и свойства матриксов. Существует несколько методов, таких как, например, струйная печать и фотопечать. Метод печати подбирается в зависимости от материала [Василец и др., 2014].

Полиэферы органических кислот, такие как полилактиды и полигликолиды, начали широко использоваться в медицине еще в 1970-х годах. Первый биоразлагаемый хирургический шовный материал Vicryl, изготовленный из химически синтезированных полимеров, появился на рынке лекарственных средств еще в 1974 году. Различные медицинские изделия, изготовленные из синтетических полилактидов и полигликолидов, активно используются в настоящее время (биоразлагаемые хирургические скобки, шурупы, пластины, булавки и шнуры), биоразрушаемый шовный материал и скобы для кожи, раневые и ожоговые повязки, мембраны для периодонтальной направленной регенерации, хирургические сетчатые эндопротезы, пластыри для хирургического восстановления дефектов кишечника и перикарда, сетчатые пробки для колопроктологических аппликаций и герниопластики, сосудистые протезы, коронарные стенты, сетчатые трубки для регенерации нервов, искусственных клапанов сердца и других медицинских устройств). Полиоксиалканоаты бактериального происхождения могут полностью заменить синтетические полимеры в вышеуказанном списке медицинских изделий и разработки в этом направлении показывают их большие преимущества за счет снижения токсичности и увеличения стабильности изделия. Кроме того, бактериальные

полиоксиалканоаты могут быть использованы в фармацевтике в качестве компонентов новых лекарственных форм для придания им таких свойств, как адресная доставка, пролонгированная активность, пониженная токсичность и повышенная стабильность [Bonartsev и др., 2019].

1.3.5 Применение биоинженерных конструкций на основе биополимеров в биотехнологии

Изделия из таких полимеров, как полиоксиалканоаты находят широкое применение в тканевой инженерии. Это нерастворимый полимер, изделия из которого способны поддерживать свою форму.

Кроме того, такие полимеры удобны для создания систем пролонгированной доставки лекарств. Уникальность таких систем состоит в том, что полимерные устройства позволяют доставлять лекарства в течение длительного времени непосредственно к заданному месту. Их разработка позволяет повысить безопасность и эффективность приема лекарств, улучшить восприимчивость пациента к ним, ослабить побочные эффекты. Основные методы инкапсулирования лекарственных или биологически активных веществ в полимерную основу это методы эмульгирования.

На данный момент активно исследуется применение ПОБ в тканевой инженерии в качестве носителя для роста клеток. Однако, для роста клеток в таких системах не всегда создаются необходимые условия. Одним из перспективных методов улучшить микроокружение для клеток — это использование композитных материалов ПОА, например, с АЛГ.

АЛГ, как уже было сказано, представляют собой полиуроновые кислоты - отрицательно заряженные сополимеры β -D-манурановой кислоты и α -L-гулурановой кислоты, связанных 1-4 гликозидной связью. Они продуцируются некоторыми видами бурых водорослей (Phaeophyceae), а также синтезируются в

качестве экзополимера у бактерий рода *Pseudomonas* sp. и *Azotobacter* sp. [Четвериков и др., 1994].

АЛГ, полученные из водорослей, много лет используются в качестве материалов для различных целей в медицинских исследованиях и при лечении человека, например, в качестве материала для доставки лекарств, раневых покрытий, материалов для стоматологии и в некоторых случаях при болезнях ЖКТ [Chatfield, 1999]. АЛГ обладают многими свойствами, позволяющими использовать их в медицине, такими как биodeградация, иммуногенность. Одно из свойств АЛГ, особенно важное для тканевой инженерии, это его способность образовывать нерастворимые гели при обработке двухвалентными ионами металлов, такими как кальций, магний и др. Таким образом это широко применяемый материал, используемый в качестве гидрогелей в качестве основы для роста клеток [Ashton и др., 2007].

Перспективным направлением сейчас является использование композитных материалов для различных медицинских целей. Использование материалов с различными свойствами в одном изделии позволяет расширить спектр применения и позволяет применять изделие в различных условиях. Например, изделие, сочетающее в себе АЛГ и водонерастворимые полимеры, таким образом сочетает в себе гидрофильную и гидрофобную фазу, что позволяет работать как с гидрофильными, так и с гидрофобными веществами одновременно, что часто бывает необходимо для медицинских целей.

Использование АЛГ в качестве материала для раневых покрытий сейчас активно исследуется. Кожа сама по себе постоянно регенерирует, однако при воздействии кислот или при сильных ожогах её восстановление может быть не таким успешным, как хотелось бы. Для того, чтобы уменьшить время восстановления и облегчить заживление поверхности раны возможно использование покрытий из различных материалов [Юданова, Решетов, 2006]. АЛГ выгодно отличается тем, что, во-первых, может функционировать как защита

поверхности раны от микробных воздействий. Во-вторых, служить подложкой под клетки, давая им возможность закрепиться и уменьшить таким образом неровность заживления.

Исследования показывают, что на подложке из чистого АЛГ клетки сохраняют свою численность, но их количество не увеличивается, то есть АЛГ не является достаточной средой для роста и пролиферации клеток. Но если культивировать клетки на композитном материале из альгината и микрочастиц из поли-3-оксибутирата с гидроксиапатитом (ГА), пролиферация клеток заметно увеличивается. Таким образом достигается сочетание твердой подложки, более выгодной для адгезии и пролиферации клеток, а также поддержание оптимального микроокружения для роста культуры [Волков, 2005].

Работ, описывающих композитные материалы с применением альгината и полиоксиалканоатов не много, поэтому рассмотрим композитные материалы на примере полилактидов. Эти полимеры так же обладают свойствами биосовместимости и биodeградации, однако являются полимерами синтетического происхождения.

С помощью таких композитных материалов так же возможна доставка различных веществ и факторов роста, влияющих на восстановление кожи, например, инсулина [Martins и др., 2007]. Если инсулин вводить просто в АЛГ, то его высвобождение будет резким и непродолжительным. Для увеличения срока действия инсулина можно использовать методы пролонгированной доставки лекарств, а именно воспользоваться микрочастицами из биodeградируемого полимера с инкапсулированным инсулином. Такие частицы затем замешиваются в раствор АЛГ, а затем смесь гелируется раствором ионов кальция. АЛГ за счет своих гидрофильных свойств не препятствует диффузии инсулина из гидрогеля в ткани [Нгунук и др., 2012].

Однако, при использовании АЛГ в регенеративной медицине возникает такая проблема, как очень медленное разложение АЛГ *in vivo*, так как человеческий

организм не вырабатывает достаточное количество альгинатлиазы. Решение этой проблемы было найдено в работе английских исследователей [Ashton и др., 2007]. Используя АЛГ в качестве подложки для роста нейронных стволовых клеток, они столкнулись с тем, что АЛГ недостаточно быстро разлагается, что мешает росту и пролиферации клеток. Для уменьшения времени деградации они использовали композитное изделие, взяв альгинат как основу гидрогеля и полилактидные частицы, в которые была инкапсулирована альгинатлиаза. В однопроцентный раствор альгината замешивались частицы с альгинатлиазой в различном соотношении. После чего полученная паста выдавливалась шприцем в раствор CaCl_2 для гелирования АЛГ. В результате этих действий получались сферические матриксы из АЛГ с частицами внутри. Таким образом, варьируя концентрацию частиц в гидрогеле и вхождение фермента в частицы можно регулировать скорость биodeградации АЛГ в организме [Ashton и др., 2007].

Необходимо отметить, что из-за того, что АЛГ сам по себе отрицательно заряжен, этот эффект может влиять на адгезию клеток и высвобождение положительно заряженных белков. Для того, чтобы этого избежать, отрицательный заряд альгината можно экранировать добавлением полиэтиленгликоля (ПЭГ). Добавление ПЭГа сохраняет биологическую активность белков и поддерживает постоянную кинетику высвобождения [Hrynyk и др., 2012].

Матриксы из АЛГ и полилактидов исследованы *in vitro* [Cateron и др., 2001] и *in vivo* [Wayne и др., 2005] в хрящевой тканевой инженерии. Применение матриксов в хрящевой инженерии необходимо, так как эта ткань обладает низкими свойствами регенерации. Было проведено сравнение культивации стволовых клеток на матриксах из чистого полилактида и на матриксах из композитного материала - полилактида с альгинатом. Клетки костного мозга культивировались на плашке, затем неприкрепившиеся клетки отмывали, а прикрепившиеся в суспензировали в 1,2% альгината, или без альгината, заливали в полилактидные кубы $2 \times 2 \times 2 \text{ см}^3$ с пористостью 90%. Матриксы промывались раствором CaCl_2 для

гелирования альгината. Затем культивировались 3 недели с добавлением фактора роста TGF- β для индукции хондрогенеза. Результаты показали, что внесение клеток в суспензии альгината позволяет удерживать клетки внутри матрикса и, возможно, удерживает большее количество фактора роста в среде [Caterson и др., 2001]. Таким образом создается структура, совмещающая в себе, во-первых, свойства альгината, выгодные для роста клеток и для добавления веществ, таких как факторы роста, а во-вторых, свойства матрикса из полилактида, больше отвечающего физическим качествам хряща и поддерживающего общую структуру биоинженерной конструкции. Кроме того, альгинат препятствует образованию фиброзной капсулы вокруг матрикса при его вживлении в организм [Ponticciello и др., 2000].

В эксперименте *in vivo*, проведенном Вейном и сотрудниками, полученные засеянные клетками конструкции (и без клеток в качестве контроля) вставляли в предварительно сделанные дефекты в коленных чашечках собак. Через 6 недель матриксы извлекали и исследовали различными методами. Результаты гистологии не показали существенной разницы между имплантированными матриксами с клетками и без клеток. Клетки были найдены внутри обоих вариантах матриксов. Однако, 6 недель еще не большой срок для развития хрящевой ткани [Wayne и др., 2005], поэтому требуется более длительное исследование таких биоинженерных конструкций.

1.4 Исследование на биосовместимость

Исследование материалов для имплантации на биосовместимость необходимо, так как все имплантационные материалы так или иначе вызывают иммунную реакцию. Полностью интактных материалов не бывает [Севастьянов, Кирпичников, 2011]. В зависимости от силы иммунной реакции определяется возможность использования вещества в качестве материала для имплантата.

При изучении материалов на биосовместимость одним из первых этапов является изучение адсорбции белка, так как это первая стадия взаимодействия

крови с чужеродной поверхностью. Процесс адсорбции в основном определяется ионными, ванн-дер-ваальсовыми, водородными и гидрофобными взаимодействиями, а также зависит от свойств самого материала – гидрофобности и электрохимических свойств. Исследование адсорбции в основном проводится на глобулярных белках, так как основные белки, выполняющие транспортную, ферментативную или иммунологическую функцию обладают именно таким строением. Такие белки сферичны, гидрофобные группы находятся в центре глобулы, заряженные группы находятся снаружи, атомы молекулы плотно упакованы. При контакте таких белков с гидрофобной поверхностью их строение меняется, может нарушаться структура. От этих нарушений зависит наличие и сила иммунной реакции [Севастьянов, Кирпичников, 2011]. В организме в крови доминируют белки плазмы – альбумин, γ -глобулин, фибриноген. Именно они вносят основной вклад в адсорбцию белков на чужеродную поверхность, и, соответственно, изменение ее свойств. В экспериментах показано, что адсорбция этих белков, например альбумина, на поверхности полимера снижает количество адгезированных тромбоцитов, что, соответственно, понижает иммунную реакцию. Это можно объяснить тем, что у альбумина отсутствуют полисахаридные остатки, требующиеся для адгезии тромбоцитов [Севастьянов, Васин, Перова, 1999]. Адсорбция фибриногена и γ -глобулина наоборот увеличивает количество тромбоцитов, что ухудшает гемосовместимые свойства материала. Однако, такие положительные свойства альбумин оказывает только при обратимой адсорбции. Если же адсорбция его необратима, белок деформируется, что инициирует каскадный механизм реакции комплемента и вызывает иммунную реакцию [Севастьянов, Кирпичников, 2011].

Необходимыми этапами для изучения биосовместимости материалов так же являются исследования *in vitro* и *in vivo*. Проведение экспериментов *in vivo* позволяет исследовать воспалительные процессы, вызванные имплантацией материала [Севастьянов, Васин, Перова, 1999]. Один из методов исследования клеток *in vitro* это получение изображений с помощью конфокальной микроскопии.

Для этого используются красители, позволяющие визуализировать живые клетки, например Calcein-AM. Calcein-AM (ацетооксиметилловый эфир кальцеина) – флуоресцентный краситель, окрашивающий исключительно живые клетки. Данный краситель подвергается гидролизу клеточными эстеразами и приобретает способность к флуоресценции в зеленой области спектра.

Так же *in vitro* определяют выживаемость клеток, например, методом ХТТ (cell proliferation kit), который прост в применении и не связан с радиоактивностью. ХТТ – это желтая тетразолиевая соль, которая под действием митохондриальных ферментов превращается в оранжевый формазан, который, в свою очередь, детектируется при длине волны 490 нм и интенсивность его цвета прямо пропорционально зависит от количества живых клеток [Scudiero и др., 1988].

In vivo материалы исследуют на различных животных сначала просто на воспалительную реакцию, а затем моделируют различные дефекты, близкие к реальному дальнейшему использованию импланта.

Воспаление является защитной функцией организма на любое чужеродное вмешательство и является неизбежной составляющей тканевой реакции на имплантацию. При наличии чужеродного материала изменяется состав клеточного окружения, а также появляются фибробласты, которые выделяют вокруг инородного тела коллаген и образуют соединительнотканную капсулу. Так же в реакции на инородное тело участвуют гигантские многоядерные клетки инородных тел (ГМКИТ) и компоненты грануляционной ткани. И в имплантат прорастают капилляры различной толщины и структуры. Все это зависит от биосовместимости имплантата, а также от скорости его биodeградации [Шехтер, Серов, 1995].

ПОБ и его сополимеры являются биосовместимыми полимерами, способными к поддержанию роста и пролиферации клеток. Эти полимеры биodeградируемы и способны к биodeградации без образования токсичных продуктов разложения. [Bonartsev и др., 2013]. Он может играть роль субстрата, поддерживающего клетки и позволяющего клеткам прикрепляться, мигрировать,

пролиферировать и дифференцироваться. Было показано, что клетки при росте на пленках из ПОБ меняли свою морфологию, становились менее распластанными и не образовывали «островков» роста, а оставались обособленными, по сравнению с ростом на стекле. Однако, на пролиферацию клеток это не влияло и процент клеток оставался таким же [Nebe и др., 2001].

Биосовместимость АЛГ показана в многих исследованиях различными методами. Например, мезенхимальные стволовые клетки (МСК) инкапсулировали в микросферы и криогенно замораживали, и было показано, что клетки сохраняли метаболическую активность после разморозки [Pravdyuk и др., 2013]. Так же МСК способны к дифференцировке при инкубации в АЛГ в остеогенной среде [Hwang и др., 2009].

Исследован рост клеток в композитных материалах с использованием альгината как гелирующего агента и других, более твердых полимеров, таких как хитозан, коллаген, желатин и другие синтетические полимеры [Venkatesan и др., 2015]. Использование композитных материалов позволяет получать изделия с необходимыми физическими свойствами для различных целей.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Получение полимеров

2.1.1 Культивирование бактерий

Для поддержания культуры бактерий использовали твердую питательную среду Эшби, следующего состава (г/л): K_2HPO_4 - 0.2, $MgSO_4$ - 0.2, $NaCl$ - 0.2, Na_2MoO_4 - 0.006, $CaCO_3$ - 5.0, сахароза - 20, агар - 20.

Для приготовления посевного материала бактерии выращивали на жидкой среде Берка в качалочных колбах объемом 750 мл (200 мл среды) при 250 об./мин (исходный pH среды - 7.2; температура культивирования - 28°C; возраст посевного материала - 1 сут; объем вносимого посевного материала - 4%).

Культивирование бактерий в жидкой среде проводили в качалочных колбах объемом 750 мл на жидкой среде Берка с повышенным содержанием сахарозы следующего состава (г/л): KH_2PO_4 - 0.2, K_2HPO_4 - 1.05, $MgSO_4$ - 0.4, $NaCl$ - 0.1, $FeSO_4$ - 0.01, Na_2MoO_4 - 0.06, $CaCl_2$ - 0.1, цитрат Na - 0.5, сахароза - 30.

Культивирование бактерий для изучения выхода АЛГ проводили в тех же условиях, что и приготовление посевного материала, но с изменением состава среды. Длительность проведения ферментации - 24-72 ч. Ферментации проводили в качалочных колбах на 750 мл (объем культуральной среды - 100 или 200 мл) на микробиологической качалке Innova 43 («New Brunswick Scientific», США) при различных скоростях перемешивания: 200, 280, 340 об./мин. Оптическую плотность культуральной среды контролировали нефелометрически при 520 нм. Морфологию бактерий рода *Azotobacter* контролировали при помощи световой микроскопии с использованием микроскопа Биомед-1 («Биомед», Россия) с цифровой камерой. Для визуализации клеток и альгината использовали окраску 0,1% фуксином.

2.1.2 Биосинтез альгинатов

Для изучения влияния условий культивирования на синтез АЛГ были использованы варианты среды Берка, а именно: в качестве источника углерода использовали разные концентрации сахарозы; сахарозу заменяли маннитом; изменяли концентрацию фосфатов в среде; вносили разные концентрации дрожжевого экстракта в качестве источника азота.

Состав сред, модификация среды Берка:

1. KH_2PO_4 - 0,008 г/л, K_2HPO_4 - 0,032 г/л, сахароза - 40 г/л;
- 2.1 KH_2PO_4 - 0,2 г/л, K_2HPO_4 - 1,05 г/л, маннит - 40 г/л;
- 2.2 KH_2PO_4 - 0,008 г/л, K_2HPO_4 - 0,032 г/л, маннит - 40 г/л;
- 3.1 KH_2PO_4 - 0,008 г/л, K_2HPO_4 - 0,032 г/л, сахароза - 40 г/л, дрожжевой экстракт 1 г/л;
- 3.2 KH_2PO_4 - 0,008 г/л, K_2HPO_4 - 0,032 г/л, сахароза - 40 г/л, дрожжевой экстракт 3 г/л;
- 4.1 KH_2PO_4 - 0,008 г/л, K_2HPO_4 - 0,032 г/л, маннит - 40 г/л, дрожжевой экстракт 1 г/л;
- 4.2 KH_2PO_4 - 0,008 г/л, K_2HPO_4 - 0,032 г/л, маннит - 40 г/л, дрожжевой экстракт 3 г/л;

Для изучения влияния условий аэрации на синтез АЛГ бактериями рода *Azotobacter* использовали разную скорость перемешивания на качалках Innova 43. Было использовано 3 различных условия выращивания бактерий:

1. Качалка – 250 об/мин (большая амплитуда), $t = 28\text{ }^\circ\text{C}$, в течение 48 часов;
2. Качалка – 280 об/мин (большая амплитуда), $t = 28\text{ }^\circ\text{C}$, в течение 48 часов;
3. Качалка – 330 об/мин (маленькая амплитуда), $t = 28\text{ }^\circ\text{C}$, в течение 48 часов.

2.1.3 Метод выделения альгинатов

После культивирования бактерий, полученную культуральную жидкость с биомассой центрифугировали при 15 000 g в течение 30 минут, осажденную биомассу, отделяли, а к супернатанту для выделения АЛГ добавляли тройной объем этилового спирта 96%. В результате получали осадок, который отделяли центрифугированием при 4 500 g и лиофилизировали (лиофилизатор для лабораторий alpha 1-2 / ld plus, Christ).

Для разрушения капсул в биомассе и для уменьшения вязкости к 30 граммам сырой биомассы, суспендированной в 100 мл дистиллированной воды добавляли 10 мл 0.1 М раствора ЭДТА и 10 мл 1.0 М NaCl. Затем образцы центрифугировали при 15 000 g в течение 30 мин. Осадок отделяли, промывали водой и высушивали при 60°C до постоянного веса. Для выделения АЛГ к супернатанту добавляли трехкратный объем этилового спирта 96%. Осадок собирали центрифугированием (20 мин при 4 500 g) с последующим высушиванием. Эту процедуру повторяли трижды, после чего осадок промывали дистиллированной водой и лиофилизировали, получая растворимый в воде сухой АЛГ натрия. Все опыты и измерения проводили в трехкратной повторности.

Качественную реакцию на АЛГ проводили с CaCl₂ [Peña C., Galindo E., Büchs J., 2011]. Для этого к 1 мл культуральной жидкости приливали 10 мл 10%-ного раствора CaCl₂. Наблюдали образование АЛГ кальция, сформированного в виде нерастворимого в воде хлопьевидного осадка.

2.1.4 Метод очистки альгинатов

Для очистки АЛГ последние стадии выделения – переосаждение этиловым спиртом – выполняли три раза.

Для дополнительной очистки полученного АЛГ сухой порошок альгината натрия растворяли в 0,9% NaCl до концентрации 0,4% альгината натрия и диализировали в 20мл диализных мешках с размером пор 12-14 кДа против 1 литра

0,5% раствора NaCl в течение 24 часов с заменой буфера после 5 часов диализа. Далее раствор АЛГ высаживали трехкратным объемом спирта и отделяли центрифугированием при 4 500 g в течение 15 минут. Полученный осадок лиофилизировали.

2.1.5 Метод выделения поли-3-оксибутирата

ПОБ выделяли из биомассы бактерий стандартным методом экстракции. Первичная экстракция полимера из биомассы проводится хлороформом в течение 12 часов при 37°C. Затем фильтрацией очищали раствор и осаждали полимер изопропиловым спиртом. Очистка полимера достигалась трехкратным повторением растворения и осаждения, после чего полимер высушивали при 60°C [Myshkina и др., 2008].

2.2 Изучение физико-химических свойств полимеров

2.2.1 Измерение молекулярной массы полимеров

Молекулярную массу полимеров определяли методом вискозиметрии с помощью RT RheoTec (RheoTec, Германия). Измерения вязкости раствора АЛГ в 0,9% растворе NaCl проводили при температуре 25°C. Измерение вязкости поли-3оксибутирата в хлороформе проводили при температуре 30°C.

Удельную вязкость рассчитывали по формуле (1):

$$\eta_{уд} = (t - t_0) / t_0, \quad (1)$$

где: t_0 - время истечения растворителя, сек; t - время истечения раствора полимера, сек.

Молекулярную массу вычисляли по уравнению (2) Марка-Хаувинка-Сакурада:

$$[\eta] = K * (M)^a, \quad (2)$$

используя следующие коэффициенты:

для АЛГ $K = 7.3 \cdot 10^{-5}$; $a = 0.92$ [Усов, 1999];

для ПОБ $K = 7.7 \cdot 10^{-5}$; $a = 0.82$ [Akita и др., 1976];

M - молекулярная масса, $[\eta]$ – вязкость [Martinsen и др., 1991].

2.2.2 Получение гелей альгината кальция

Для получения раствора альгината натрия (возможные концентрации 0,5%-3%), сухой порошок альгината натрия растворяли в физиологическом растворе 0,9% NaCl в нужной концентрации при температуре 37°C и при перемешивании до достижения состояния полного растворения и гомогенного раствора. Скорость растворения образца зависела от концентрации АЛГ и его молекулярной массы.

Гелирование АЛГ происходит мгновенно, спонтанно, в момент реакции АЛГ с ионами кальция. Для получения гелей альгината кальция, растворенный гомогенный АЛГ натрия капельным методом пипеткой или шприцем помещался в 5% раствор хлорида кальция при перемешивании. Полученный альгинат кальция в течение минуты инкубировали в растворе хлорида кальция, затем промывали в растворе хлорида кальция. Для достижения стерильности, АЛГ стерильно лиофилизировали, все дальнейшие манипуляции производили в стерильных условиях.

2.2.3 Водопоглощение

Водопоглощение АЛГ измеряли в соответствии со стандартом [ISO U. 62: 2008]. Водопоглощение полимерных пленок рассчитывали по формуле (3):

$$\text{Водопоглощение (\%)} = (m_2 - m_0)/m_0 \times 100\%, \quad (3)$$

где m_0 и m_2 - массы обезвоженного и насыщенного водой образцов соответственно.

Образцы выдерживали при $t=50^\circ\text{C}$ до постоянного значения массы (m_1). Это составляло 2-3 сут. После этого их погружали в деионизированную воду ($t=25^\circ\text{C}$) на определенное время. После удаления капель воды образцы взвешивали снова. Опыт проводили до того момента как увеличение массы не будет превышать 0,1 мг

(m_2). После этого образцы снова высушивали при $t=50^\circ\text{C}$ в течение суток и взвешивали (m_3).

При расчете использовали $m_1 = m_0$ при $m_1 < m_3$ и $m_3 = m_0$ при $m_3 < m_1$.

2.2.4 Инфракрасная спектроскопия

ИК спектры АЛГ регистрировались в режиме отражения на ИК микроскопе Hyperion-2000, сопряженном с ИК-Фурье спектрометром IFS-66 v/s (кристалл Ge, разрешение 2 см^{-1} , диапазон $4000\text{-}600\text{ см}^{-1}$, скан.-50) («Bruker», США). Для сравнения этим методом был также исследован АЛГ, выделенный из водорослей – коммерческий образец («Sigma-Aldrich», Германия) [Ефимова и др., 2008].

2.2.5 Реометрия

Эксперименты по изучению механических свойств АЛГ проводились на реометре Anton Paar MCR 302 (Австрия). Реометр был оборудован измерительной системой плита-плита. Сначала проводили амплитудный тест, чтобы определить диапазон линейной вязкоупругости при угловой частоте 10 рад/с . После измерения характерного диапазона линейной вязкоупругости ($0,15\%$) и оптимального зазора (относительная деформация $0,1\text{-}0,3$) на другом образце проводили частотный тест при угловой частоте от $0,1$ до 100 рад/с . Во всех тестах измеряли модули сохранения G' и потерь G'' и вычисляли комплексный модуль сдвига (4):

$$G^* = \sqrt{(G')^2 + (G'')^2}. \quad (4)$$

Модуль Юнга измеряли с помощью сжатия образцов. Строили зависимость нормального давления от относительной деформации. Затем, модуль Юнга вычисляли по наклону линейной части графика [LeRoux, Guilak, Setton, 1999].

2.2.6 Термогравиметрический анализ

Термогравиметрические измерения АЛГ проводили на термовесах *NETZSCH TG 209 F1*, оснащенных аллундовым держателем с защитным экраном и температурным сенсором типа *P*. Прибор калибровали по точкам плавления стандартных веществ (Ag, Al, Bi, In, Sn, чистота 99.99%). Погрешность определения массы не превышает 0.1% (определено по стандарту $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) [Горюнов, Черников, Чуйков, 2012].

Эксперимент проводили в стандартном открытом аллундовом контейнере ($V = 85 \text{ мм}^3$, $d = 6.7 \text{ мм}$) в потоке (20 мл/мин) синтетического воздуха в интервале температур 30 – 600°C при скорости нагревания 10°/мин.

Экспериментальные данные обрабатывали с помощью пакета анализа *NETZSCH Proteus Analysis* согласно стандарту *ISO/CD 11358*.

Взвешивание образца проводили на аналитических весах *AND GH 202* с точностью $\pm 1 \cdot 10^{-2}$ мг. Материал не подвергали механической обработке перед измерениями во избежание дегидратации.

2.2.7 Дифференциальная сканирующая калориметрия

Исследование теплофизических характеристик матриц (измерение температур плавления и кристаллизации, теплоты плавления и кристаллизации, вычисление степени кристалличности) проводилось с помощью дифференциального сканирующего калориметра DSC 204 F1 Phoenix (Netzsch, Germany).

2.2.8 Конфокальная и флуоресцентная микроскопии.

Для определения прикрепления, роста и жизнеспособности клеток в объеме матрикса использовался метод получения изображений с помощью конфокальной микроскопии. Перед исследованием образцы матриц с клетками окрашивались

красителем. Нами был выбран CalceinAM, так как он окрашивает исключительно живые клетки. Исследование проводилось на приборе Axiovert 200M при длине волны 517 нм (конфокальная микроскопия) и микроскоп AxioLab A1, Carl Zeiss Microscopy GmbH (флуоресцентная микроскопия).

2.2.9 Сканирующая электронная микроскопия

Для исследования матриц из ПОБ были получены изображения с помощью сканирующего электронного микроскопа CAMSCAN – S4. Перед измерениями образцы высушивались и производилось напыление золотом.

2.2.10 Измерение проводимости

Для измерения проводимости раствора альгината натрия была измерена ионная сила с помощью кондуктометра (S30 SevenEasy™ conductivity, Mettler Toledo).

2.3 Получение матриц из поли-3-оксибутирата

Использовали модифицированный метод, предложенный корейскими учеными [Nam, Yoon, Park, 2000]. Нашей задачей было выбрать вещество, которое бы не растворялось в хлороформе (растворителе полимера), но при этом растворялось в воде. Карбонат аммония в воде полностью растворяется с образованием газообразных веществ – аммиака и диоксида углерода. Газообразование приводит к разрыванию полимера, что приводит к хаотичности в трехмерную структуру матрикса. Вторым веществом была выбрана сахароза в виде измельченных кристаллов.

Измельченный карбонат аммония и сахарозу заливали раствором ПОБ в хлороформе. Для получения матриц с включением гидроксиапатита (ГА), его порошок добавляли в раствор ПОБ в количестве 10% от массы полимера. Для

вымывания порообразователей матрикс помещали в стакан с водой, нагревали и дожидались полного прекращения газообразования. Затем заменяли воду в стакане до полного вымывания сахарозы. В результате чего получалась трехмерная структура полимера, повторяющая внутреннюю структуру полостей формы, заполненной сахарозой, при этом разорванную за счет карбоната аммония.

2.4 Изучение биосовместимости полимеров

2.4.1 Выделение мезенхимальных стволовых клеток из крыс линии Wistar

Культуру мезенхимальных стволовых клеток (МСК) выделяли из крыс породы *Wistar*. Эту культуру использовали для изучения биосовместимости полученных материалов.

Все работы с животными были проведены в соответствии с этическими нормами и рекомендациями по гуманизации работы с лабораторными животными, отраженными в “Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей” (Страсбург, 1985).

Забой крыс осуществлялся декапитацией после эфирного наркоза. Для получения МСК, у бедренной кости трехдневной крысы удаляли эпифизы и получали костный мозг (КМ) промывая кость. Затем КМ инкубировали в среде с коллагеназой I типа (1075 ед/мл) (ПанЭко, Россия) 1 час при 37°C. После чего полученную суспензию центрифугировали два раза по 10 минут при 1000 об/мин. Между центрифугированиями осадок ресуспензировали в среде для роста клеток DMEM (Invitrogen, США), чтобы избавиться от остатков фермента. К полученному итоговому осадку добавляли ростовую среду (DMEM + эмбриональная телячья сыворотка 10% и инкубировали в течение суток на культуральном пластике. Затем культивировали клетки до достижения монослоя [Maniopoulos и др., 1988].

2.4.2 Метод оценки жизнеспособности клеток

Метод ХТТ-proliferation kit (Biological Industries, Израиль) основан на способности активных митохондрий живых клеток превращать соли тетразолия в соли формазана. Для этого в конце времени культивации к образцу с клетками или к прикрепленным клеткам на пластике в каждую лунку добавляли 50 μ л раствора ХТТ-реагента и 100 μ л бессывороточной среды DMEM. Планшеты инкубировали при 37°C еще в течение 2 часов. После этого поглощение жидкости измеряли спектрофотометрически при 450 нм, вычитая фоновое поглощение при 620 нм на планшетном спектрофотометре Zenyth 3100 Microplate Multimode Detector (Anthos Labtec Instruments GmbH, Австрия). Количество жизнеспособных клеток определяли по калибровочной кривой на основе их ХТТ-реакционной способности.

2.4.3 Определение цитотоксичности альгинатов

Для получения геля альгината кальция, стерильный сухой альгинат натрия (коммерческий водорослевый или бактериальный капсулярный, диализированный) растворяли в 0,9% растворе хлорида натрия в течение часа при 38°C в 1% концентрации. Затем, после доведения раствора до однородности, альгинат натрия капали при перемешивании в раствор хлорида кальция. Образовавшиеся сферы альгината кальция отмывали в хлориде натрия.

Для подготовки к эксперименту, мезенхимальные стволовые клетки инкубировали в термостате при 37°C в увлажненной атмосфере 5% CO₂ в ростовой среде, содержащей модифицированную среду DMEM (DMEM, Invitrogen, США) с высоким содержанием глюкозы (4,5 г/л), 10% эмбриональной телячьей сывороткой и антибиотиком (100 МЕ/мл пенициллина и 100 мкг/мл раствора стрептомицина). После трех пассажей клетки были сняты однократным раствором трипсина (ПанЭко, Россия), отцентрифугированы, отмыты фосфатно-солевым буфером (БФС).

Цитотоксичность АЛГ определяли двумя методами. В первом случае клетки рассаживали в 48-ми луночный планшет в количестве 4 000 клеток на лунку в 250 мкл ростовой среды. После чего в лунки были добавлены либо сферы альгината кальция, либо альгинат натрия в чистом виде. Через сутки количество клеток было оценено методом ХТТ. Результаты были представлены в виде количества жизнеспособных клеток по отношению к положительному контролю, взятому за 100%, в который АЛГ не добавлялись.

Во втором случае для оценки цитотоксичности полученного бактериального АЛГ, альгинат кальция в виде сфер объемом 25 мкл инкубировали с МСК крысы [Santos, 2010]. Клетки рассаживали в 96-ти луночный планшет в количестве 4 000 клеток на лунку. Объем ростовой среды на лунку равнялся 200 мкл. К клеткам были добавлены стерильные сферы бактериального альгината кальция, а также коммерческий АЛГ в виде сфер альгината кальция в качестве контроля. Рост клеток в течение недели в присутствии АЛГ был оценен методом ХТТ. Результаты были представлены в виде роста жизнеспособных клеток по отношению к положительному контролю, в который АЛГ не добавлялись.

2.4.4 Изучение роста клеток в альгинатном геле

Для изучения роста клеток в геле из полученных АЛГ использовали метод культивирования клеток внутри альгинатного геля. Для получения альгинатного геля стерильный порошок АЛГ растворяли в физиологическом растворе (0,9% NaCl) до получения гомогенного раствора, затем в него добавляли суспензию МСК. Для этого МСК снимали трипсином с культурального пластика, центрифугировали в течение 7 минут при 900 об/мин. Полученный осадок ресуспензировали в 1 мл культуральной среды. Клетки добавляли в раствор альгината натрия до достижения концентрации 40 тысяч клеток в 1 мл альгината натрия. Полученную суспензию при перемешивании капали в стерильный раствор 5% хлорида кальция. После инкубации в течение минуты полученные альгинатные сферы с МСК промывали

дважды раствором хлорида натрия, после чего инкубировали в культуральной среде в течение двух недель. Определение количества клеток в сферах проводилось на флуоресцентном микроскопе, а также методом ХТТ, описанном ранее. Для этого сферы альгината натрия с клетками растворяли в 50 мМ растворе цитрата натрия в течение 10 минут при 37°C. Затем добавляли двойной объем культуральной среды, ждали прикрепления клеток (около 30 минут), затем проводили измерение количества клеток методом ХТТ.

2.4.5 Изучение роста клеток *in vitro* на полимерных матриксах.

Для оценки биосовместимости матриксов из ПОБ, МСК культивировали на образцах в течение недели. Образцы стерилизовали спиртом в течение часа, затем помещали в 96-ти луночную плашку. Клетки помещали на образцы в количестве 5000 клеток на лунку. Количество клеток на образцах определяли методом ХТТ на 1-е, 3-е и 5-е сутки.

2.4.6 Исследования конструкций из ПОБ и АЛГ *in vivo*

На основе двух исследуемых полимеров была разработана конструкция в качестве каркаса для поддержания регенерации костной ткани. Имплантат был изготовлен на основе пористого матрикса из ПОБ или ПОБ-ГА, матрикс был получен по методике выщелачивания с использованием сахара и карбоната аммония в качестве водорастворимых агентов в специальной пластиковой форме, полученной с помощью 3D-принтера. Полученный матрикс покрывали 1% АЛГ, который затем гелировали 5% раствором хлорида кальция с последующим отмыванием в 9% физрастворе. Также был изготовлен вариант матрикса ПОБ-ГА-АЛГ, наполненный МСК. Клетки суспензировали в АЛГ в концентрации 200 000 кл/мл и полученной суспензией пропитывали матрикс, затем пропитанный матрикс помещали в 5% раствор хлорида кальция и через три минуты промывали в 9%

физрастворе. Для исследования полученных конструкций был смоделирован критический дефект костной ткани в теменной части черепа крыс диаметром 8 мм. Модель имплантата была выполнена таким образом, что она заполняла костный дефект, а также перекрывала его снаружи.

Исследование проводили на 24 самцах крыс линии Wistar с массой тела 400 г. в течение месяца. Все работы с животными были проведены в соответствии с этическими нормами и рекомендациями по гуманизации работы с лабораторными животными, отраженными в "Правилах проведения работ с использованием экспериментальных животных" в соответствии с приказами МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г. и № 701 от 24.07.1978 г., а также в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» 2003 г. Крыс анестезировали с использованием препарата Золетил 100 в расчете 125 мкг/кг веса. На черепе крысы делались продольные и поперечные разрезы, формирующие треугольник, после чего в результате рассечения были обнажены теменные кости. Округлое дефект-отверстие было высверлено в середине сагиттального шва теменных костей с использованием оборудования (Набор для трепанации для формирования отверстия диаметром 8 мм высотой 1,5 мм Neobiotech SLA kit, Korea), избегая повреждения сагиттального синуса.

Разработанная конструкция на основе ПОБ и АЛГ полностью заполняла костный дефект (Рисунок 4). Рану ушивали послойно.

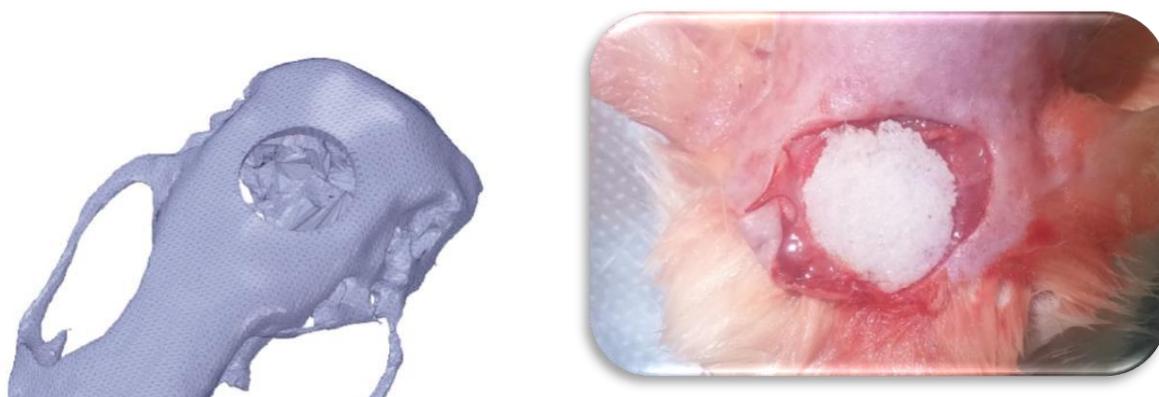


Рисунок 4. Модель костного дефекта (слева). Матрикс в черепе крысы (справа).

Для визуализации процесса регенерации кости крысам последовательно вводили доксициклин (8, 9 и 10 дни после операции – время активной минерализации), тетрациклин (15, 16 и 17 дни после операции), и ализариновый красный С (22, 23 и 24 дни после операции). Все флуорофоры вводили в концентрации 25 мг/кг веса крысы. На 28-ой день после операции крысы умерщвлялись передозировкой Золетил/Рометар. Поверхность черепа очищали от мышц, область дефекта извлекали с помощью цилиндрической дрели. Время окончания эксперимента было выбрано в соответствии с окончанием периода первичного процесса образования кости [Burr, Allen, 2013]. Вырезанное место дефекта фиксировали в 40% этаноле в течение 24 часов. Такой способ позволяет сохранить флуоресцентные маркеры и ткани.

Образцы фиксировали в течение 1-3х суток в 70% этаноле. После чего их промывали, дегидратировали и фиксировали в метилметакрилате (Osteo-Bead; Sigma-Aldrich, USA) с последующей полимеризацией в соответствии со стандартной процедурой, рекомендуемой производителем. Полученные блоки нарезали микротомом (Low Speed Saw, Switzerland) на срезы толщиной 200 мкм, из которых затем получили срезы толщиной 40-50 мкм.

Полученные срезы исследовали на флуоресцентном микроскопе Leica DM 4000B (Leica Microsystems, Germany). Микрофотографии получали, используя стандартный набор RGB-каналов Leica ПО для флуоресцентной микроскопии (многоканальная гистопантограмма).

Для гистологических исследований образцы фиксировали 24 часа в 70% этаноле. После обезвоживания образцы пропитывали метилметакрилатом (OsteoBed, Sigma) и полимеризовали. Образцы заливали в блоки и изготавливали срезы толщиной 25-35 мкм. Окраска срезов проводилась небесным трихромом (BioLine, Италия), после чего срезы заключались в бальзам и высушивались. Фотографии срезов получали на микроскопе Leica DM1500 цифровой камерой EC3.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Влияние условий культивирования бактерий рода *Azotobacter* на синтез полимеров

В работе были исследованы штаммы из коллекции разных видов бактерий рода *Azotobacter*: *A. chroococcum* 12Б, *A. chroococcum* 7Б, *A. agile* 12, *A. indicum* 8, *A. vinelandii* 17, *A. vinelandii* 5Б, выделенные из дерново-подзолистых почв Подмоскovie. Коллекция поддерживается в лаборатории биохимии азотфиксации и метаболизма азота Института Биохимии им. А. Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН. Культурально-морфологические признаки штаммов: граммотрицательные клетки, колонии крупные, слизистые; клетки продолговатой формы, подвижные (со жгутиками), расположены одиночно, парами и в цепочках. Строгие аэробы.

Кроме того, в лаборатории был получен штамм *A. chroococcum* 12БС (обладающий повышенной способностью к слизиобразованию) путем отбора слизевых колоний на чашках Петри при расसेве штамма *A. chroococcum* 12Б.

Все штаммы были проверены на способность к биосинтезу АЛГ и к биосинтезу поли-3-оксибутирата при выращивании на твердой среде Эшби (Урожай бактерий на 1 чашке Петри соответствует урожаю бактерий с 15 мл жидкой среды Берка) (Таблица 1).

¹ В главе изложено описание результатов, опубликованные в следующих научных статьях автора:

1. Бонарцева Г. А., **Акулина Е.А.**, Мышкина В.Л., Воинова В.В., Махина Т.К., Бонарцев А.П. Биосинтез альгинатов бактериями рода *Azotobacter* // Прикладная биохимия и микробиология. 2017. Т. 53. №1. С. 61–68.
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. Т. 55. №6. С. 559-565.
3. **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.
4. 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, Materials for biological application. 2020. 114. P. 110991.
5. **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 мезенхимных стволовых клеток на матриксах на основе поли-3-оксибутирата, загруженных симвастатином // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2021. Т. 171. №1. С. 70-76.

Таблица 1. Сравнение интенсивности роста и биосинтеза полимеров штаммами коллекции рода *Azotobacter* при росте на твердой среде Эшби в течение 72 часов.

культура	сух биом без АЛГ, г/л	АЛГ, г/л	АЛГ г/г биомассы	% капс. АЛГ от общего	ПОБ, г/л	ПОБ г/г биомассы	ПОБ %
<i>A. chroococcum</i> 12Б	1,040 ± 0,002	1,912 ± 0,017	1,8 ± 0,05	16,2 ± 0,3	0,006 ± 0,002	0,0055 ± 0,003	0,55 ± 0,07
<i>A. chroococcum</i> 12БС	0,580 ± 0,011	1,411 ± 0,022	2,4 ± 0,1	13,4 ± 0,3	0,019 ± 0,002	0,032 ± 0,003	3,2 ± 0,12
<i>A. agile</i> 12	0,506 ± 0,006	3,609 ± 0,021	7,0 ± 0,1	3,0 ± 0,6	0,004 ± 0,001	0,007 ± 0,001	0,73 ± 0,007
<i>A. indicum</i> 8	0,601 ± 0,003	2,193 ± 0,026	3,6 ± 0,05	27,2 ± 0,2	0,02 ± 0,002	0,034 ± 0,003	3,4 ± 0,08
<i>A. chroococcum</i> 7Б	0,704 ± 0,012	2,788 ± 0,042	4,0 ± 0,1	32,0 ± 0,2	0,158 ± 0,001	0,225 ± 0,004	22,52 ± 0,05
<i>A. vinelandii</i> 5Б	0,080 ± 0,001	0,322 ± 0,012	3,6 ± 0,5	17,0 ± 0,2	0,002 ± 0,001	0,0164 ± 0,001	1,64 ± 0,11
<i>A. vinelandii</i> 17	0,050 ± 0,001	0,173 ± 0,011	3,4 ± 0,5	2,6 ± 0,1	0,003 ± 0,001	0,0645 ± 0,002	6,45 ± 0,22

Все штаммы разных видов *Azotobacter* были способны к синтезу АЛГ (Таблица 1). Количество синтезированного полимера различалось у разных видов. Штаммы *A. vinelandii* 17 и *A. vinelandii* 5Б дали низкий урожай биомассы. Капсулярный АЛГ составлял у разных видов от 2.6% до 32% от общего АЛГ. Капсулярный АЛГ, как правило, содержит большее количество гулурановых звеньев в цепи полимера, обладая большей способностью к гелеобразованию, что функционально важно для клетки при образовании защитной капсулы. Были отобраны потенциальные продуценты АЛГ – штаммы, способные к активному синтезу полимера. Максимальный синтез АЛГ среди исследуемых штаммов был отмечен у нескольких штаммов, *A. agile* 12 – 3,6 г/л, *A. chroococcum* 7Б – 2,8 г/л, *A. chroococcum* 12Б -1,9 г/л и *A. chroococcum* 12БС – 1,4 г/л.

Из всех проверенных штаммов максимальное содержание ПОБ (22,52% от сухой биомассы) было отмечено у продуцента ПОБ *A. chroococcum* 7Б. Содержание ПОБ у остальных штаммов было на порядок ниже.

Для всех образцов АЛГ были получены ИК спектры. Спектры АЛГ пяти штаммов практически идентичны (Рисунок 5). Спектры двух других штаммов, *A. vinelandii* 17 и *A. vinelandii* 5Б, показывают, что полимер, синтезирующийся в их случае, имеет полиморфную структуру, не характерную для АЛГ. Важно отметить, что эти же штаммы дали минимальный урожай биомассы.

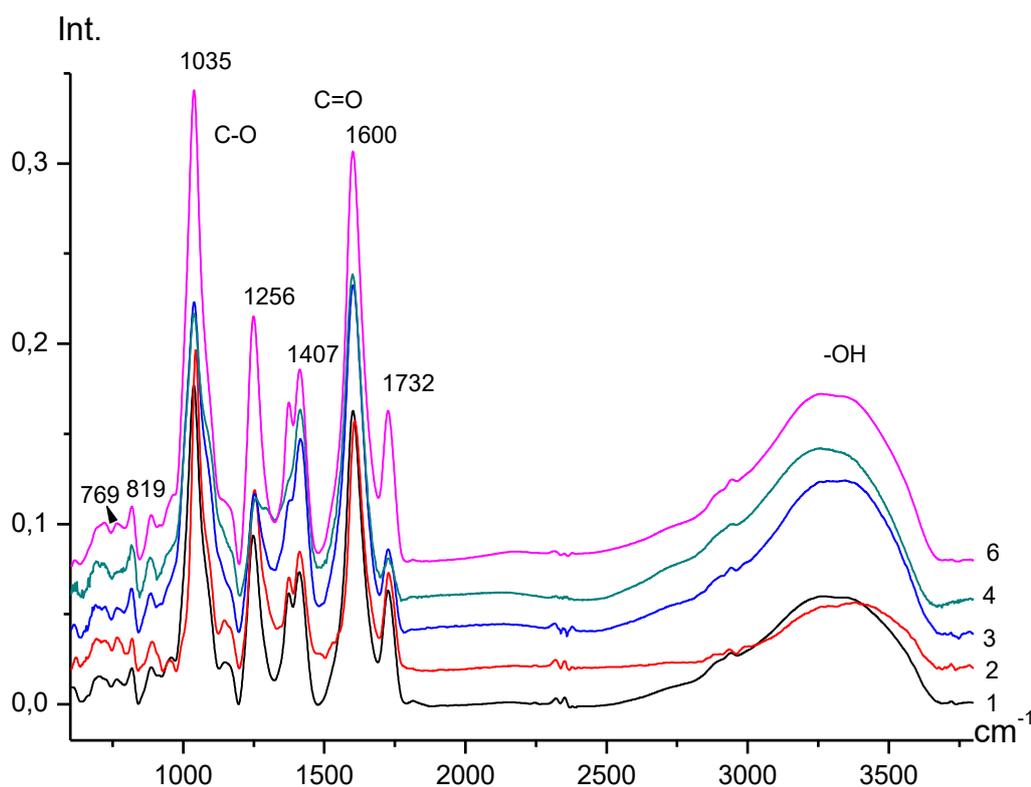


Рисунок 5. ИК спектры альгинатов, синтезированных пятью разными штаммами рода *Azotobacter*. 1 – *Azotobacter indicum* 8, 2 – *Azotobacter chroococcum* 7Б, 3 – *Azotobacter chroococcum* 12Б, 4 – *Azotobacter chroococcum* 12 БС, 5 – *Azotobacter agile* 12.

В качестве контроля был получен спектр коммерческого АЛГ (Sigma Aldrich). Анализ полученных спектров показал, что спектр бактериального АЛГ (так как спектры бактериальных АЛГ различных штаммов практически идентичны, для примера взят спектр АЛГ штамма *A. agile* 12) практически совпадает со спектром водорослевого альгината, взятого в качестве контроля. Единственное отличие бактериального АЛГ – это присутствие полос в спектре в районе 1730 см^{-1} и 1260 см^{-1} , которые показывают наличие ацетилирования у бактериального АЛГ

[Усов, 1999], так как эти полосы поглощения отвечают за сложные эфирные связи (Рисунок 6).

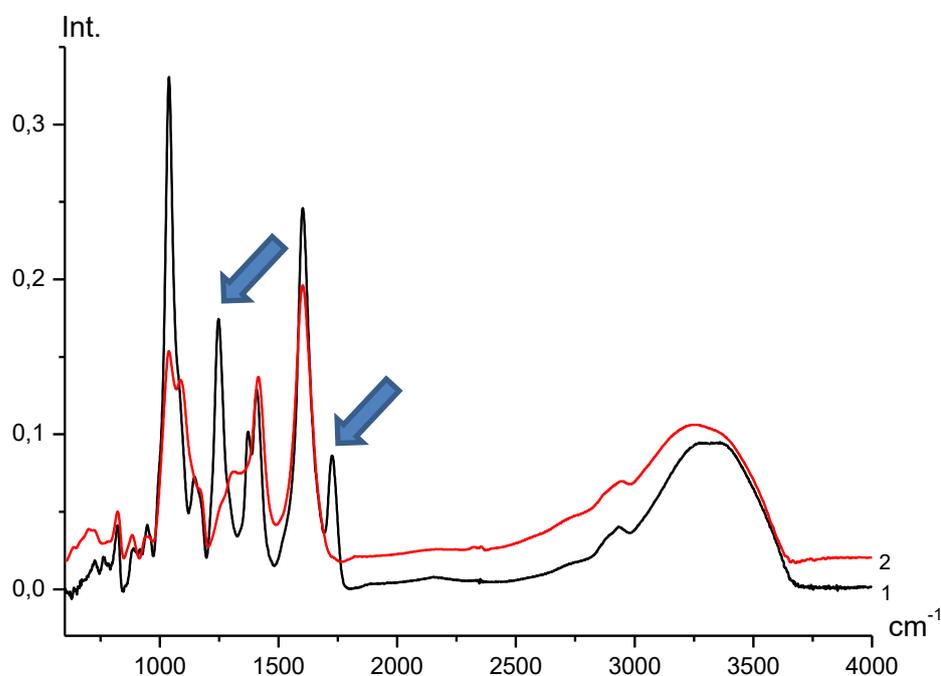


Рисунок 6. Сравнение ИК спектра образца 1 – бактериальный АЛГ, полученный из культуры *Azotobacter agile* 12, выращенной на твердой среде Эшби со спектром 2 - водорослевый АЛГ (Sigma). Стрелками отмечены полосы, указывающие на наличие ацетилирования.

По соотношению интенсивностей полос 1590 см^{-1} и 1730 см^{-1} , где интенсивность полосы 1590 см^{-1} зависит от количества кислотных групп в полимере, а 1730 см^{-1} – от количества эфирных связей, был рассчитан процент ацетилирования полученных АЛГ. Так же по соотношению интенсивностей полос 795 см^{-1} (маннурановая кислота) и 815 см^{-1} (гулурановая кислота) был рассчитан мономерный состав полимеров (Таблица 2).

Таблица 2. Мономерный состав и процент ацетилирования полученных АЛГ у разных штаммов бактерий рода *Azotobacter* по данным ИК спектроскопии.

образец	D ₁₂₅₄ /D ₁₀₃₀	% ацетилирования	D ₈₁₉ /D ₇₆₉	M/G
<i>A.indicum</i> 8	0,521	38	1,42	60/40
<i>A. chroococcum</i> 7Б	0,494	39	0,99	50/50
<i>A. chroococcum</i> 12Б	0,348	23,5	1,72	63/37
<i>A. chroococcum</i> 12БС	0,233	12,5	2,10	68/32
<i>A. agile</i> 12	0,490	36,6	1,43	59/41
водорослевый	-	-	4,4	80/20

Из таблицы видно, что АЛГ, полученные с помощью различных штаммов, обладают различным содержанием маннуриновых и гулуриновых мономеров (от 70/30 у *Azotobacter chroococcum* 12БС до 50/50 у *Azotobacter chroococcum* 7Б, то есть содержание гулуриновых остатков варьируется от 30% до 50%) и различным процентом их ацетилирования (от 10% до 40%). АЛГ всех пяти штаммов содержат достаточно высокий процент гулуриновых остатков (от 30 до 50%), по сравнению с водорослевым АЛГ, у которого процент содержания гулуриновых мономеров в полимерной цепи не превышает 20%, а ацетилирование отсутствует.

Из семи исследуемых штаммов на основании активности роста бактерий, синтеза ими АЛГ и процента его ацетилирования для дальнейшей работы были отобраны три штамма: *Azotobacter chroococcum* 12Б, *Azotobacter chroococcum* 12БС и *Azotobacter agile* 12.

В результате обобщения литературных данных по синтезу бактериальных АЛГ были выбраны три параметра варьирования состава среды. На интенсивность синтеза АЛГ влияет источник углерода, внесение источника азота, а также показано, что при снижении концентрации фосфатов синтез АЛГ увеличивается [Sabra и др., 1999].

Для изучения влияния состава среды на синтез АЛГ штамм *A. chroococcum* 12БС культивировали на твердой среде Эшби с различными изменениями состава

среды в течение 3 суток (Таблица 3). У полученных АЛГ определяли молекулярную массу методом расчета характеристической вязкости, методом ИК спектроскопии определяли соотношение маннуриновых и гулуриновых остатков в цепи (M/G) и степень ацетилирования маннуриновых остатков (в процентах).

Таблица 3. Влияние состава среды на молекулярную массу, мономерный состав и процент ацетилирования синтезированного АЛГ *A. chroococcum* 12БС.

Среда Эшби	АЛГ г/л	Характер. вязкость см ³ /г	ММ, кДа	D1600/D1726	Степень ацет., %	D819/D765	M/G
Водорослевый				—	—	4.4	80/20
Эшби 1*	1,33 ± 0,02	2,2 ± 0,1	75 ± 8	3,00	25	2,60	72/28
Эшби 2*	1,73 ± 0,10	2,3 ± 0,2	98 ± 14	9,30	10	4,30	81/19
Эшби 3*	1,57 ± 0,03	2,25 ± 0,07	94 ± 12	2,90	26	3,10	75/25
Эшби 4*	2,71 ± 0,01	2,4 ± 0,1	88 ± 9	3,60	22	2,40	70/30

*Модификации среды Эшби. Эшби 1: Классическая среда Эшби. Эшби 2: Сахароза 40 г/л, фосфаты 0,05 г/л. Эшби 3: Сахароза 40 г/л, дрожжевой экстракт 1 г/л, фосфаты 0,05 г/л. Эшби 4: Маннит 40 г/л, фосфаты 0,05 г/л.

При культивировании *A. chroococcum* 12БС на твердой среде при всех изменениях состава среды значительных изменений молекулярной массы не отмечали. Значение молекулярной массы варьировало от 75 до 98 кДа. Однако, состав среды значительно влияет на мономерный состав цепи и степень ацетилирования полимера. Снижение фосфатов в среде (вариант 2) дает нам минимальное содержание гулуриновых кислот, практически идентичное соотношению M/G к M/G водорослевого АЛГ. (81/19 и 80/20 соответственно). В этом же варианте мы наблюдали минимальное ацетилирование маннуриновых остатков (10%). В остальных вариантах соотношению M/G было значительно выше, колеблясь от 75/25 до 70/30. Максимальное содержание гулуриновых кислот в цепи полимера отмечено в варианте 4 с маннитом в качестве источника углерода и соответствовало 30%. В отличие от отмеченного выше варианта 2, где

ацетилирование было минимальным (10%), в остальных вариантах процент ацетилирования был значительно выше. Максимальный процент ацетилирования наблюдали при добавлении дрожжевого экстракта при низких фосфатах (26%).

При оценке влияния состава среды на свойства синтезируемого АЛГ было показано, что несмотря на то, что снижение фосфатов в среде увеличивает синтез АЛГ, что хорошо согласуется с литературными данными [Рейн и др., 2011], процент гулурановых остатков в цепи полимера значительно падает, а также снижается процент ацетилирования маннурановых остатков. Таким образом, изменяя состав среды, мы можем получать АЛГ с разным составом полимерной цепи, что определяет их физико-химические свойства.

Однако, как видно из результатов, представленных в Таблице 3, вариабельность состава цепи (M/G от 70/30 до 80/20 и % ацетилирования от 10% до 26%) при изменении условий культивирования отдельного штамма варьирует в меньшем диапазоне, чем состав цепи у испытанных штаммов разных видов рода *Azotobacter* (M/G от 50/50 до 70/30 и ацетилирование от 10% до 40%) (Таблица 2). Важно отметить, что в работе Логинова Я.О. на среде Федорова, близкой по составу к используемой нами среде Берка, при ферментации *A. vinelandii* ИБ1 получен АЛГ с преобладанием в цепи полимера гулурановой кислоты над маннурановой (M/G = 30/70) [Логинов и др., 2011], что позволяет также сделать вывод о большом значении вида и штамма используемого продуцента АЛГ.

Известно, что при выращивании бактерий рода *Azotobacter* на жидких средах выход биомассы значительно выше. Дальнейшую работу мы проводили на жидкой среде Берка состава (г/л): KH_2PO_4 – 0.2, K_2HPO_4 – 1.05, MgSO_4 – 0.4, NaCl – 0.1, FeSO_4 – 0.01, Na_2MoO_4 – 0.06, CaCl_2 – 0.1, цитрат Na – 0.5, сахароза - 30).

Для изучения влияния состава жидкой среды на синтез и свойства АЛГ были отобраны два штамма, *A. chroococcum* 12Б и его разновидность – *A. chroococcum* 12БС (слизистый). Их культивировали на различных модифицированных средах

Берка (Таблица 4). В наших исследованиях в качестве модификаций в среду Берка вносили маннит вместо сахарозы как источник углерода, добавляли дрожжевой экстракт в качестве источника азота, а также варьировали концентрацию фосфатов.

Таблица 4. Модификации среды Берка.

	KH_2PO_4	K_2HPO_4	Источник углерода	Дрожжевой экстракт
Среда Берка	0,2 г/л	1,05 г/л	Сахароза – 20 г/л	-
1.	0,008 г/л	0,032 г/л	Сахароза 40 г/л	-
2.1	0,2 г/л	1,05 г/л	Маннит – 40 г/л	-
2.2	0,008 г/л	0,032 г/л	Маннит – 40 г/л	-
3.1	0,008 г/л	0,032 г/л	Сахароза 40 г/л	1 г/л
3.2	0,008 г/л	0,032 г/л	Сахароза 40 г/л	3 г/л
4.1	0,008 г/л	0,032 г/л	Маннит – 40 г/л	1 г/л
4.2	0,008 г/л	0,032 г/л	Маннит – 40 г/л	3 г/л

На рисунках 7 и 8 представлены кривые роста культур *Azotobacter chroococcum* 12Б и 12БС на средах различного состава. Из представленных данных видно, что на всех испытанных средах рост культур различается незначительно. Наилучший рост культур 12Б и 12БС наблюдался при добавлении дрожжевого экстракта, что объясняется добавлением в среду источника азота, что значительно экономит расход энергии бактериальной клетки, обычно используемой на фиксацию молекулярного азота на безазотной среде.

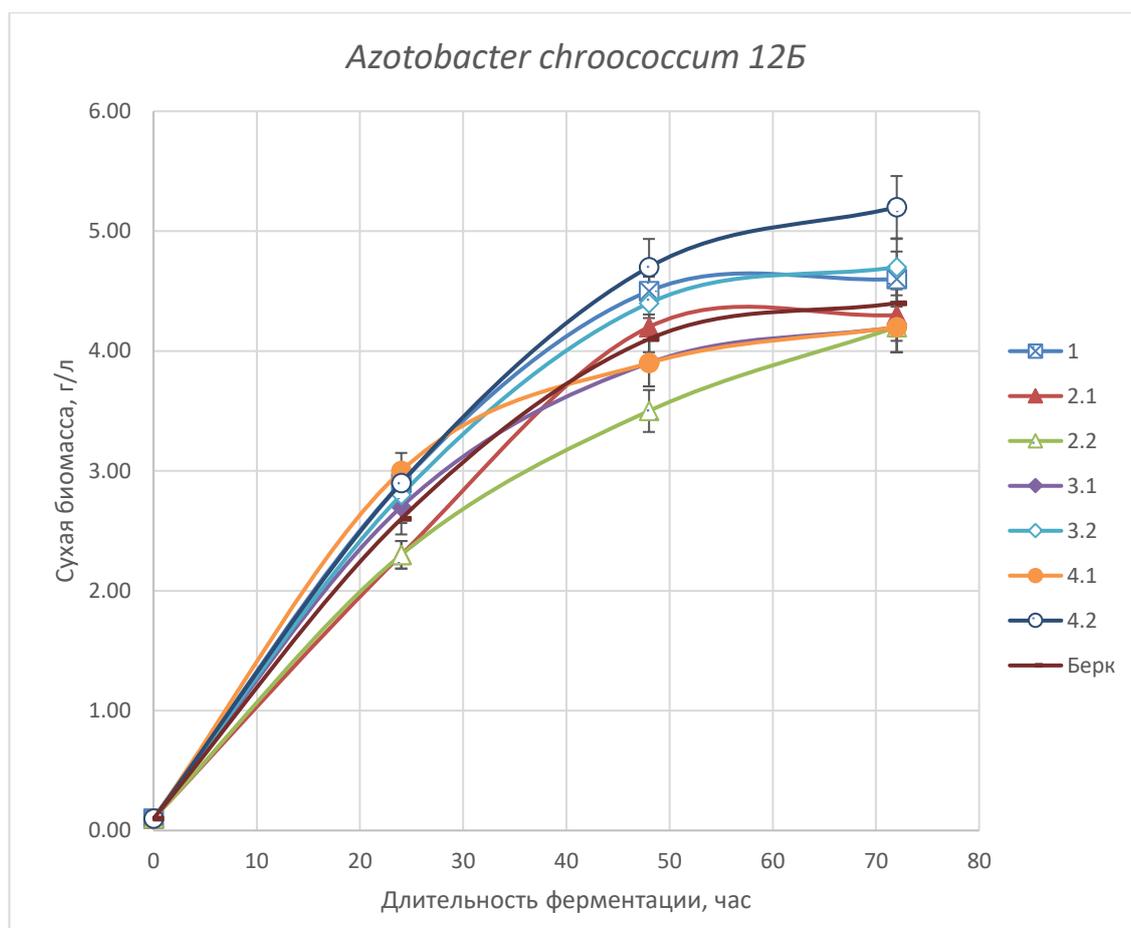


Рисунок 7. Влияние различного состава среды на урожай биомассы *Azotobacter chroococcum* 12Б.

Состав сред: модификация среды Берка:

1. KH_2PO_4 - 0,008 г/л, K_2HPO_4 - 0,032 г/л, сахароза - 40 г/л;

2.1 KH_2PO_4 - 0,2 г/л, K_2HPO_4 - 1,05 г/л, маннит - 40 г/л;

2.2 KH_2PO_4 - 0,008 г/л, K_2HPO_4 - 0,032 г/л, маннит - 40 г/л;

3.1 KH_2PO_4 - 0,008 г/л, K_2HPO_4 - 0,032 г/л, сахароза - 40 г/л, др. экст. 1 г/л;

3.2 KH_2PO_4 - 0,008 г/л, K_2HPO_4 - 0,032 г/л, сахароза - 40 г/л, др. экст. 3 г/л;

4.1 KH_2PO_4 - 0,008 г/л, K_2HPO_4 - 0,032 г/л, маннит - 40 г/л, др. экст. 1 г/л;

4.2 KH_2PO_4 - 0,008 г/л, K_2HPO_4 - 0,032 г/л, маннит - 40 г/л, др. экст. 3 г/л;

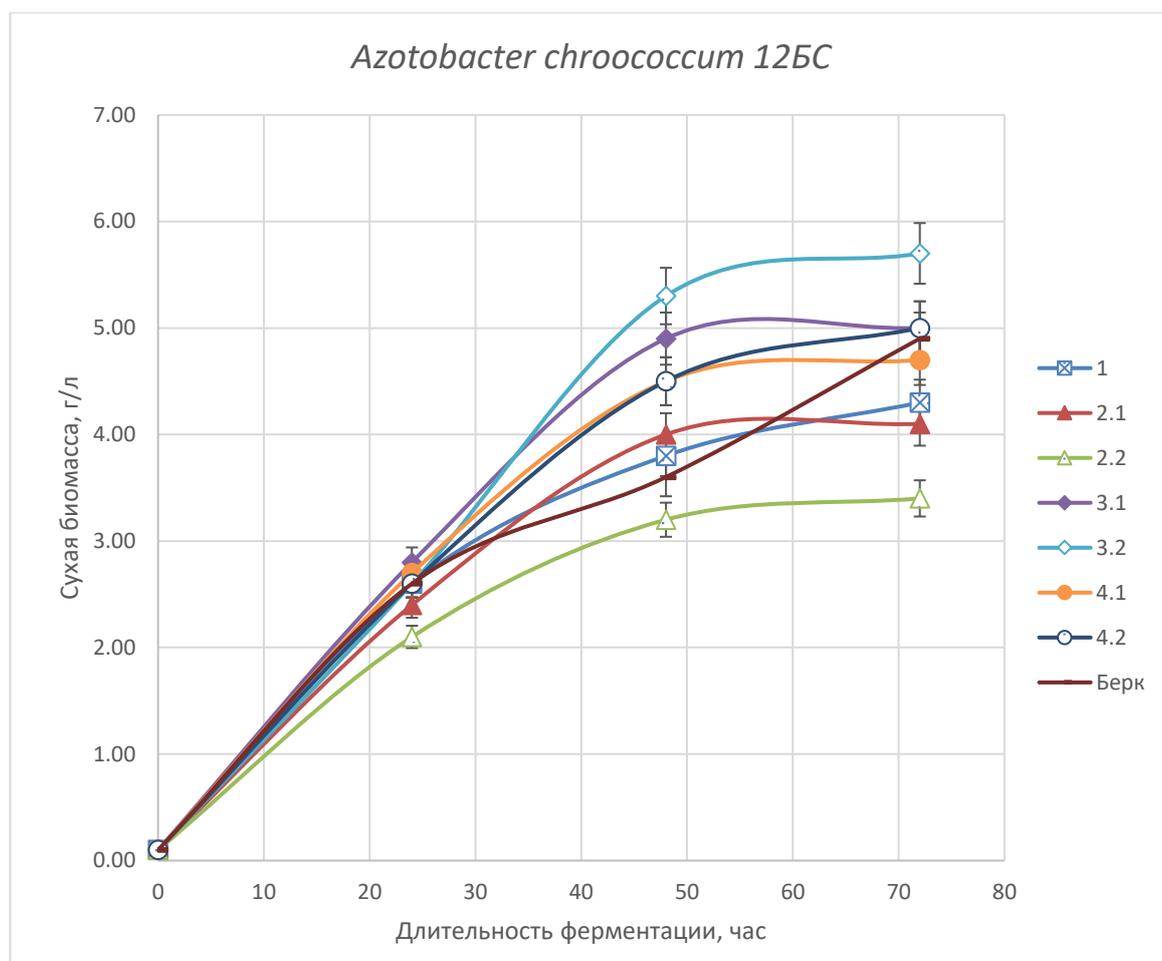


Рисунок 8. Влияние различного состава среды на урожай биомассы *Azotobacter chroococcum* 12БС.

Состав сред: модификация среды Берка:

1. KH_2PO_4 - 0,008 г/л, K_2HPO_4 - 0,032 г/л, сахароза - 40 г/л;

2.1 KH_2PO_4 - 0,2 г/л, K_2HPO_4 - 1,05 г/л, маннит - 40 г/л;

2.2 KH_2PO_4 - 0,008 г/л, K_2HPO_4 - 0,032 г/л, маннит - 40 г/л;

3.1 KH_2PO_4 - 0,008 г/л, K_2HPO_4 - 0,032 г/л, сахароза - 40 г/л, др. экст. 1 г/л;

3.2 KH_2PO_4 - 0,008 г/л, K_2HPO_4 - 0,032 г/л, сахароза - 40 г/л, др. экст. 3 г/л;

4.1 KH_2PO_4 - 0,008 г/л, K_2HPO_4 - 0,032 г/л, маннит - 40 г/л, др. экст. 1 г/л;

4.2 KH_2PO_4 - 0,008 г/л, K_2HPO_4 - 0,032 г/л, маннит - 40 г/л, др. экст. 3 г/л;

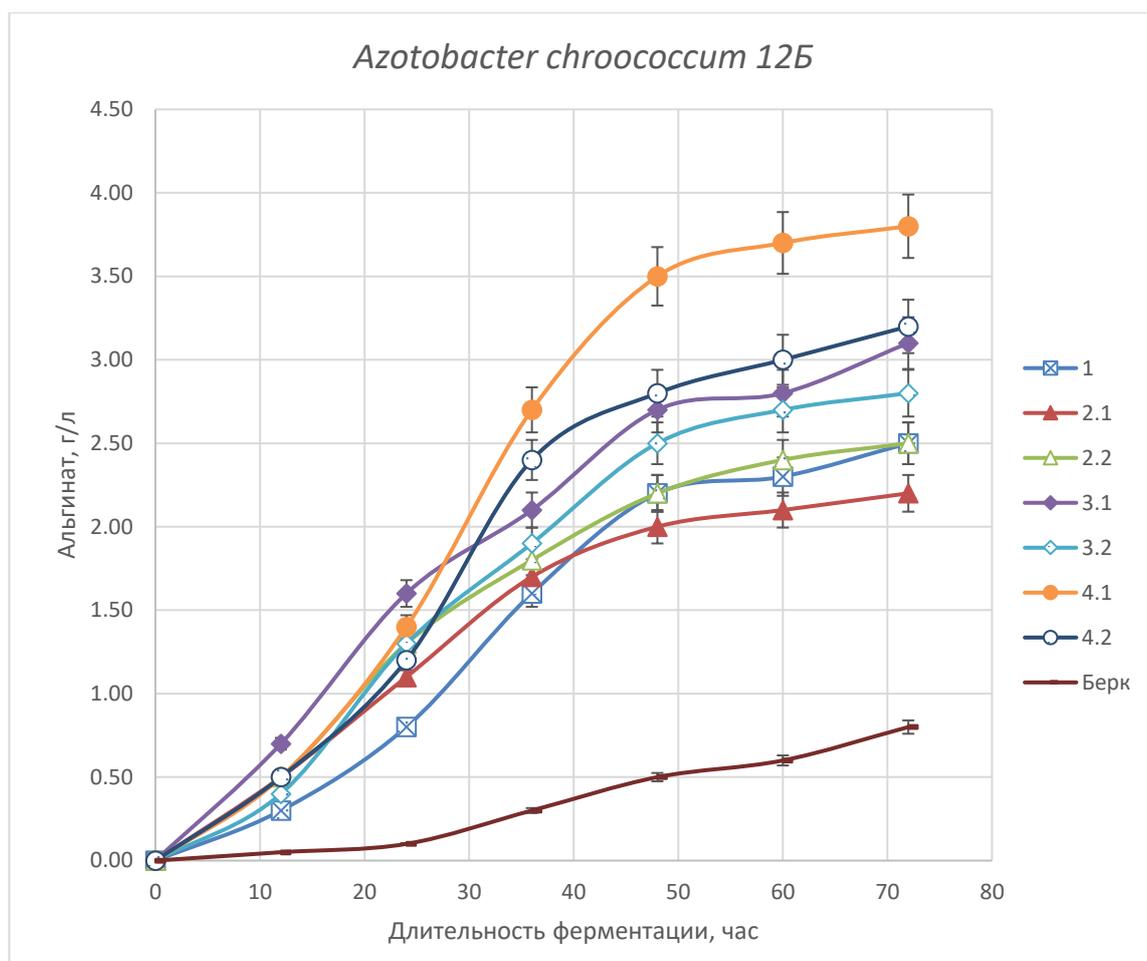


Рисунок 9. Влияние различного состава среды на биосинтез альгината штаммом *Azotobacter chroococcum* 12Б.

Состав сред: модификация среды Берка:

1. KH_2PO_4 - 0,008 г/л, K_2HPO_4 - 0,032 г/л, сахароза - 40 г/л;

2.1 KH_2PO_4 - 0,2 г/л, K_2HPO_4 - 1,05 г/л, маннит - 40 г/л;

2.2 KH_2PO_4 - 0,008 г/л, K_2HPO_4 - 0,032 г/л, маннит - 40 г/л;

3.1 KH_2PO_4 - 0,008 г/л, K_2HPO_4 - 0,032 г/л, сахароза - 40 г/л, др. экст. 1 г/л;

3.2 KH_2PO_4 - 0,008 г/л, K_2HPO_4 - 0,032 г/л, сахароза - 40 г/л, др. экст. 3 г/л;

4.1 KH_2PO_4 - 0,008 г/л, K_2HPO_4 - 0,032 г/л, маннит - 40 г/л, др. экст. 1 г/л;

4.2 KH_2PO_4 - 0,008 г/л, K_2HPO_4 - 0,032 г/л, маннит - 40 г/л, др. экст. 3 г/л;

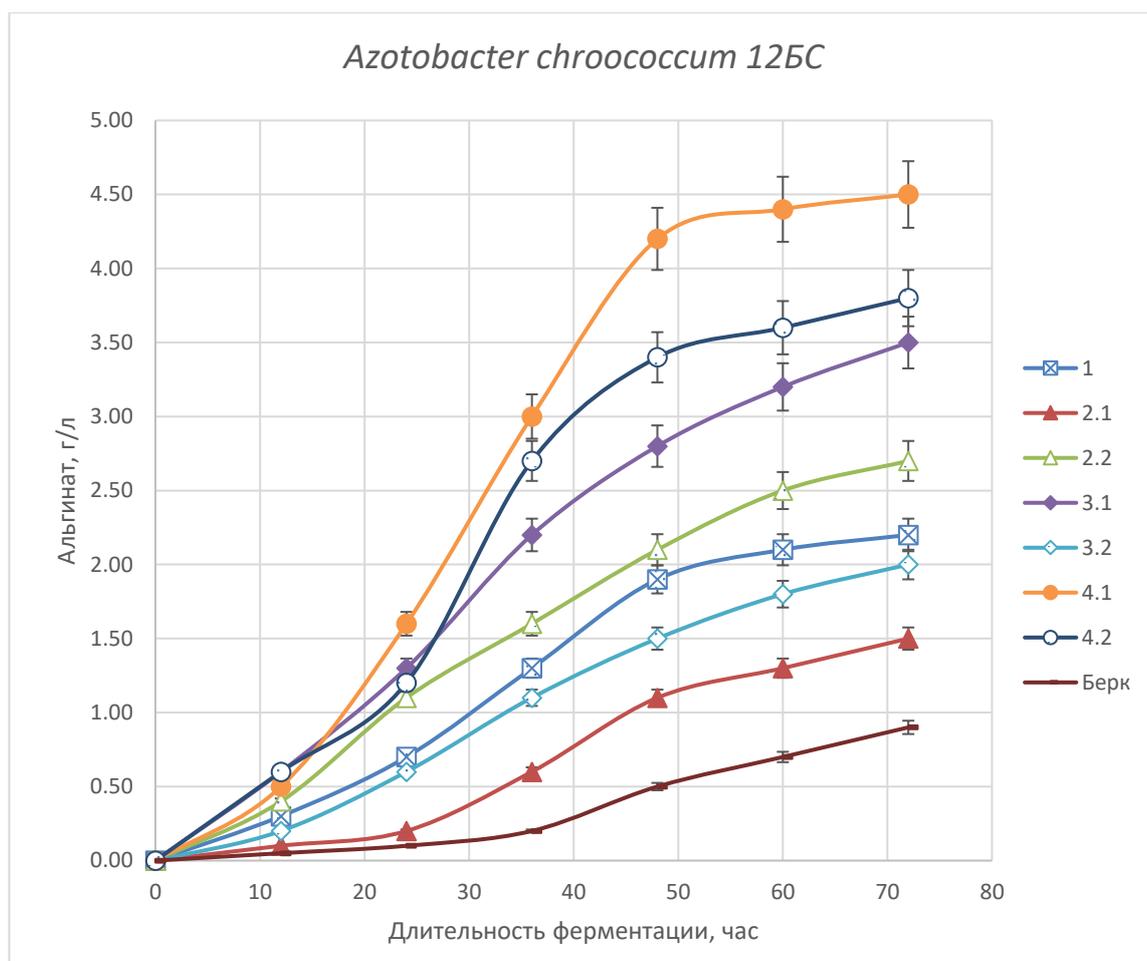


Рисунок 10. Влияние различного состава среды на биосинтез альгината штаммом *Azotobacter chroococcum* 12БС.

Состав сред: модификация среды Берка:

1. KH_2PO_4 - 0,008 г/л, K_2HPO_4 - 0,032 г/л, сахароза - 40 г/л;

2.1 KH_2PO_4 - 0,2 г/л, K_2HPO_4 - 1,05 г/л, маннит - 40 г/л;

2.2 KH_2PO_4 - 0,008 г/л, K_2HPO_4 - 0,032 г/л, маннит - 40 г/л;

3.1 KH_2PO_4 - 0,008 г/л, K_2HPO_4 - 0,032 г/л, сахароза - 40 г/л, др. экст. 1 г/л;

3.2 KH_2PO_4 - 0,008 г/л, K_2HPO_4 - 0,032 г/л, сахароза - 40 г/л, др. экст. 3 г/л;

4.1 KH_2PO_4 - 0,008 г/л, K_2HPO_4 - 0,032 г/л, маннит - 40 г/л, др. экст. 1 г/л;

4.2 KH_2PO_4 - 0,008 г/л, K_2HPO_4 - 0,032 г/л, маннит - 40 г/л, др. экст. 3 г/л;

На рисунках 9 и 10 представлены данные по биосинтезу АЛГ штаммами *Azotobacter chroococcum* 12Б и 12БС на средах различного состава. Из представленных данных видно, что обе культуры синтезируют максимальное количества АЛГ на среде с маннитом в качестве источника углерода и с добавлением дрожжевого экстракта в количестве 1 г/л при низком содержании в среде фосфатов - KH_2PO_4 - 0,008 г/л, K_2HPO_4 - 0,032 г/л.

На рисунках 11 и 12 отдельно представлены данные роста и биосинтеза АЛГ на среде с оптимальным для синтеза АЛГ составом.

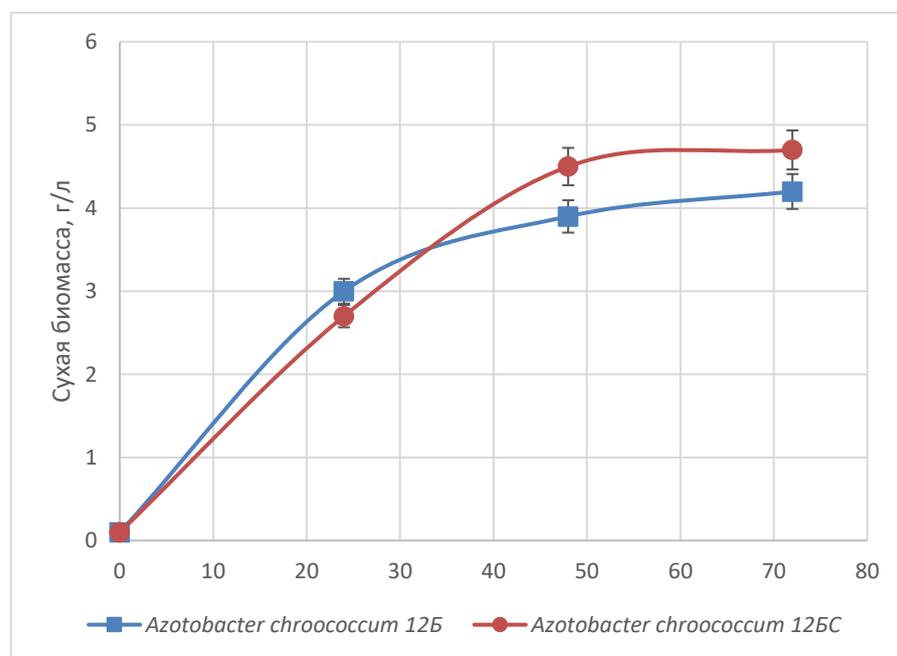


Рисунок 11. Рост штаммов *A. chroococcum* 12Б и 12БС на оптимальном варианте среды.

Состав среды: модификация среды Берка **4.1** KH_2PO_4 - 0,008 г/л, K_2HPO_4 - 0,032 г/л, маннит - 40 г/л, дрожжевой экстракт 1 г/л;

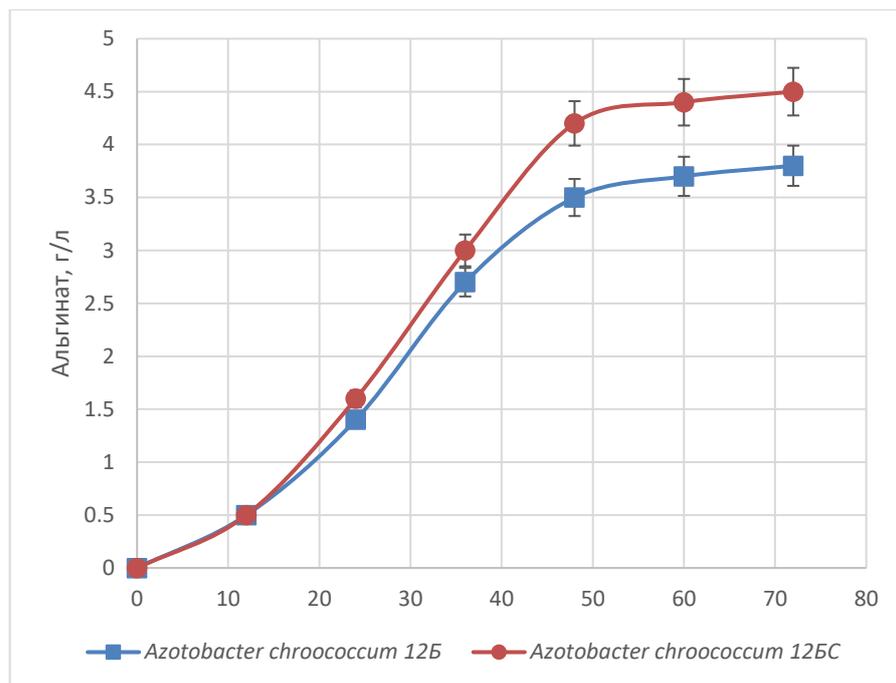


Рисунок 12. Выход альгинатов при росте двух штаммов на оптимальном варианте среды. Состав среды: модификация среды Берка $4.1 \text{ K}_2\text{HPO}_4 - 0,008 \text{ г/л}$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 0,032 \text{ г/л}$, маннит - 40 г/л , дрожжевой экстракт 1 г/л ;

Во всех вариантах в течение роста культур проводили качественную реакцию на наличие АЛГ с CaCl_2 . Для этого к 1 мл культуральной жидкости приливали 10 мл 10% раствора CaCl_2 . При наличии АЛГ в культуральной жидкости наблюдали образование альгината кальция, сформированного в виде нерастворимого в воде хлопьевидного осадка.

Полученные нами данные по динамике синтеза АЛГ у штаммов *A. chroococcum* 12Б и 12БС согласуются с данными, полученными Реѝа с сотр. [Reѝa, С; Galindo, E; Buchs, 2011] в экспериментах с *Azotobacter vinelandii* штамм ATCC-9046 и Clementi с сотр. [Clementi и др., 1995], работавшими с *Azotobacter vinelandii* штамм DSM 576. Они показали, что наиболее активный синтез АЛГ происходит в течение первых двух суток и затем количество альгината в среде выходит на плато. Также эти штаммы показывают схожие результаты по синтезу АЛГ на немодифицированной среде Берка, а именно – синтез АЛГ до 2 г/л .

При переходе на жидкую среду наилучшие результаты показал штамм *A. agile 12*, для которого в дальнейшем, для увеличения выхода АЛГ и изменения его состава, использовали различные уровни кислорода, варьируя интенсивность аэрации путем увеличения скорости перемешивания и изменяя объем среды культивирования. Для изучения влияния условий аэрации на биосинтез АЛГ, в качестве культуральной среды использовалась стандартная среда Берка.

Были выбраны оптимальные параметры наиболее эффективного синтеза АЛГ. Наибольший выход АЛГ достигался при общем объеме культуральной среды в колбе 100 мл за счет более высокого уровня аэрации, что коррелирует с литературными данными Галиндо с сотрудниками [Galindo и др., 2007], наблюдавшими максимальный выход АЛГ в качалочных колбах с небольшим количеством среды (100 мл).

В результате культивирования *A. agile 12* на жидкой среде Берка на качалках при разном уровне аэрации мы получили два типа АЛГ – первый тип это капсулярный АЛГ, обладающий более высокой молекулярной массой и образующий защитную капсулу вокруг бактериальных клеток. А также «свободный» АЛГ из культуральной среды, который, по-видимому, используется клетками для увеличения вязкости среды. Свободный альгинат обладает более низкой молекулярной массой, а так же отличается по составу и ацетилированию от капсулярного АЛГ [Clementi, 1997)].

Для разделения этих АЛГ, полученную культуральную жидкость центрифугировали при 15 000 g и получали две фракции – биомассу и супернатант. Из супернатанта путем осаждения трехкратным объемом спирта выделяли свободный АЛГ, а для разрушения капсул АЛГ биомассу обрабатывали ЭДТА как описано в разделе 2.1.3.

В нашей работе было использовано 3 условия перемешивания для выращивания *A. agile 12*:

1) Качалка – 250 об/мин (большая амплитуда) (низкий уровень аэрации),
t = 28 °С, в течение 48 часов.

2) Качалка – 280 об/мин (большая амплитуда) (средний уровень аэрации),
t = 28 °С, в течение 48 часов;

3) Качалка – 330 об/мин (маленькая амплитуда) (высокий уровень аэрации),
t = 28 °С, в течение 48 часов;

Обобщенные данные по биосинтезу АЛГ и ПОБ штаммом *A. agile* 12 при разных уровнях аэрации сведены в таблицу 5.

Из таблицы видно, что средний вариант (280 rpm) культивирования показал лучшие результаты по продукции АЛГ и худшие по синтезу ПОБ среди испытанных трех вариантов, а именно: капсулярного – 1,18 г на грамм сухой биомассы, общего - 1,86 г на грамм сухой биомассы; капсулярный АЛГ составил 63% от общего АЛГ. При этом отмечается подавление синтеза ПОБ, который составляет всего лишь 6% от веса сухой биомассы. В других вариантах синтез ПОБ составляет 20%, а синтез АЛГ значительно ниже, чем в среднем по аэрации варианте – 280 об/мин.

Обобщая полученные результаты по влиянию аэрации на синтез АЛГ и ПОБ культурой *A. agile* 12 можно сделать вывод о возможности регуляции и направленного синтеза этих полимеров исследованной культурой.

Таким образом, среди испытанных пяти разных штаммов рода *Azotobacter* sp. отобран штамм *Azotobacter agile* 12, который может быть потенциальным продуцентом АЛГ. Культивирование данного штамма производилось в жидкой среде Берка в качалочных колбах объемом 100 мл культуральной среды, время ферментации 48 часов при оборотах 280 об/мин и температуре t = 28 °С. Итог ферментации способствовал максимальному выходу АЛГ – 3.41 г/л (культуральной среды) или 1.86 г/г (сухой биомассы).

Таблица 5. Влияние аэрации на биосинтез полимеров бактериальным штаммом *Azotobacter agile* 12.

Об/мин	свободный АЛГ г/г сух биом	капс. АЛГ г/г сухой биомассы	общий АЛГ г/г сухой биомассы	общий АЛГ г/л	ПОБ г/г сухой биомассы	ММ свободн. АЛГ, kDa	ММ капс. АЛГ, kDa	ММ ПОБ, kDa
250	0,37 ± 0,02	1,0 ± 0,3	1,37 ± 0,13	2,62 ± 0,2	0,2 ± 0,05	95 ± 12	430 ± 15	1472 ± 25
280	0,68 ± 0,04	1,18 ± 0,12	1,86 ± 0,11	3,417 ± 0,3	0,06 ± 0,02	117 ± 9	272 ± 20	615,6 ± 20
330	0,29 ± 0,11	0,63 ± 0,17	0,92 ± 0,13	1,85 ± 0,2	0,21 ± 0,06	110 ± 10	208 ± 20	1350 ± 20

3.2 Разработка методов выделения и очистки альгинатов

Далее нами был разработан метод эффективного выделения АЛГ из культуральной среды. Как уже было отмечено, бактерии рода *Azotobacter* синтезируют бактериальные АЛГ двух типов: в первом случае они используют АЛГ в качестве биоматериала для изготовления плотной капсулы, окружающей бактериальные клетки и служащей для защиты бактерий от стрессовых условий, например, от ионов металлов, а во втором случае – экскретируют АЛГ в ростовую среду для увеличения вязкости среды и защиты от кислорода [Усов, А.И., 1999]. Как мы видим, штамм-продуцент *Azotobacter agile* 12 синтезирует 2 типа АЛГ – «капсулярный» и «свободный».

Первый этап состоял в отделении культуральной жидкости (супернатанта) от клеточной биомассы при помощи центрифугирования при 15000 g в течение 30 мин. Вторым этапом было осаждение АЛГ в супернатанте 96% этиловым спиртом в соотношении 1:3 и центрифугирование при 4400 g в течение 15 минут. Полученный осадок свободного АЛГ лиофилизировали в течение 24 часов. Таким образом был получен «свободный» АЛГ.

Изначально для выделения АЛГ использовался 10% NaOH, что позволяло эффективно выделять бактериальные АЛГ как из капсул, так и надосадочной жидкости; однако впоследствии выяснилось, что данный метод имеет ряд недостатков, ключевым из которых является снижение ацетилирования маннуроновых остатков, входящих в состав АЛГ. В связи с этим, в дальнейшем вместо щелочи использовалась ЭДТА, что позволило устранить вышеописанный эффект нейтрализации ацетилированных групп. Снижение концентрации катионов металлов в растворе, вызванное их хелатированием молекулами ЭДТА, приводит к переходу АЛГ из гелированного состояния в жидкость. Капсулярный АЛГ выделяли непосредственно из клеточной биомассы. К биомассе (15 г сырой биомассы) добавляли раствор 30 мл 1 М NaCl и 5мл 100 мМ ЭДТА, затем образцы инкубировали в 50 мл флаконах при 37 °С в течение часа с целью полной

гомогенизации биомассы в солевом растворе. После окончания инкубации образцы активно перемешивали на вортексе и центрифугировали при 15 000 g в течение 30 минут. Супернатант осаждали этиловым спиртом в объемном соотношении 1:3, осадок собирали центрифугированием (15 минут при 4400 g), операция осаждения была повторена. Полученный АЛГ лиофилизировали.

Очистка АЛГ производилась аналогично выделению капсулярного АЛГ. Первый этап включал растворение полученных лиофилизированных осадков в 1М NaCl и добавление ЭДТА (концентрация 10 мМ в растворе), затем образцы инкубировали при 37 °С в течение часа. Следующим этапом было центрифугирование образцов при 15 000 g в течение часа, далее осаждение супернатантов спиртом в соотношении 1:3 и центрифугирование при 4400 g 15 минут. Осадок лиофилизировали в течение 24 часов.

Полученные результаты показали, что при выделении и очистки АЛГ, синтезированных штаммом *A. agile 12*, количество капсулярного АЛГ было больше по сравнению со свободным АЛГ, а его процентное отношение от общего количества синтезированного АЛГ составило 63%. Потери при очистке свободного и капсулярного АЛГ составили 25% и 40% соответственно.

Таким образом, путем биосинтеза АЛГ штаммом *A. agile 12*, нами нами были получены партии высокоочищенного свободного и капсулярного АЛГ, которые далее были исследованы физико-химическими методами.

3.3 Изучение физико-химических свойств полученных альгинатов

Полученные капсулярные и свободные АЛГ были исследованы методом ИК-спектроскопии (рисунок 13). Чистота полученных АЛГ подтверждается данными спектров, на которых кроме пиков, характерных для пиков альгината, нет пиков, характерных для других компонентов бактериальной клетки. Спектры капсулярного и свободного АЛГ схожи со спектром водорослевого АЛГ и имеют все пики, которые характерны для водорослевого АЛГ. Также ИК-спектры

показывают, что в данном случае только свободный АЛГ ацетилирован, так как в отличие от водорослевого АЛГ у бактериальных АЛГ есть два дополнительных пика – 1730 и 1250, которые указывают на наличие ацетилирования [Усов, 1999]. Отсутствие дополнительных пиков у бактериального капсулярного альгината здесь объясняется тем, что эти образцы были выделены с использованием щелочи, что повлияло на ацетилирование.

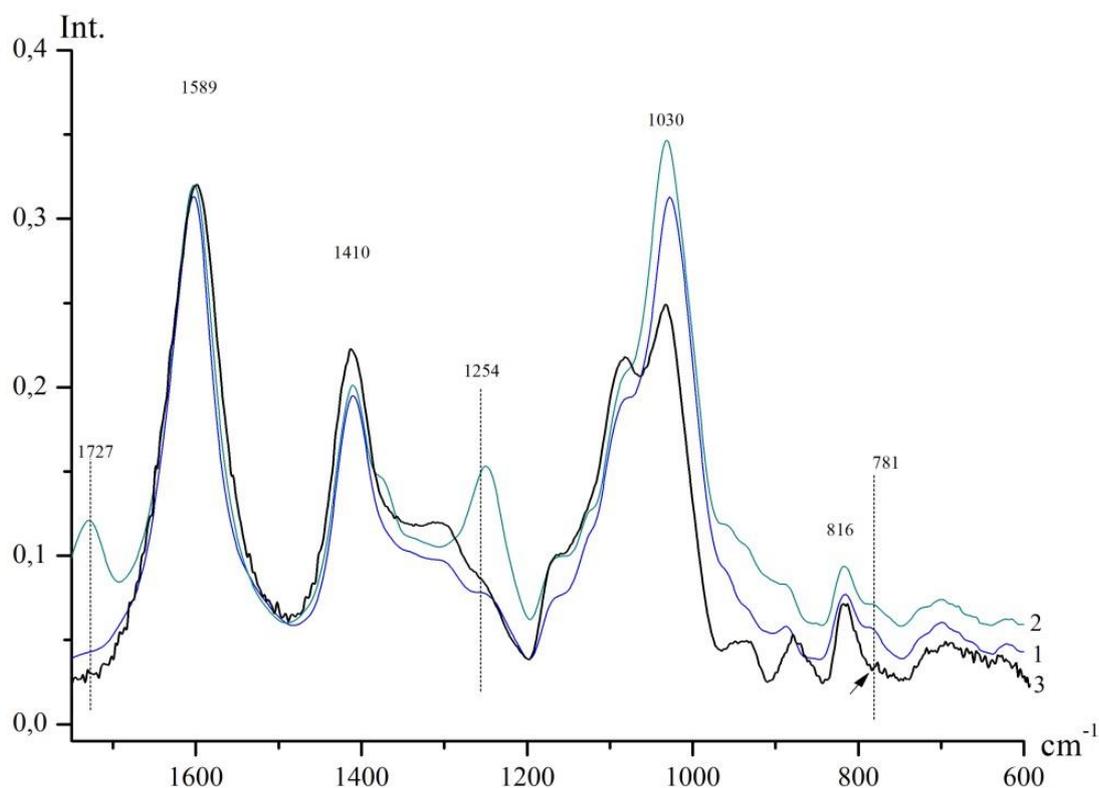


Рисунок 13. Сравнение ИК спектра образца 1 – бактериальный капсулярный альгинат, полученный из культуры *Azotobacter agile* 12 со спектром 2 – бактериальный свободный альгинат *Azotobacter agile* 12 и 3 – водорослевый альгинат (Sigma).

По ИК-спектрам рассчитано соотношение маннуроновых и гулууроновых остатков в полученных АЛГ.

Был определен мономерный состав полученных АЛГ по соотношению полос 818 (маннуроновые остатки) и 765 (гулууроновые остатки) [Усов, 1999]. Для сравнения были взяты АЛГ, полученные при 250 об/мин и 280 об/мин (таблица 6).

Таблица 6. Мономерный состав и ацетилирование капсулярного и свободного АЛГ, полученного синтезом при помощи *A. agile* 12 при различных условиях аэрации.

образец	Соотношение мономеров М/Г	% ацетилирования
Водорослевый, коммерческий	80/20	-
250 об/мин капсулярный	72/28	5,5
250 об/мин свободный	70/30	11,5
280 об/мин капсулярный	68/32	5,2
280 об/мин свободный	75/25	23,6

Как видно из таблицы, все полученные АЛГ обладали приблизительно одинаковым соотношением маннуроновых/гулууроновых остатков. Свободный АЛГ более ацетилирован, чем капсулярный.

Также полученные образцы (образец 1 – капсулярный, 250 об/мин; 2 образец – свободный, 280 об/мин; 3 образец – коммерческий, водорослевый) были исследованы методом термогравиметрического анализа (ТГА). Из представленных на рисунках 14-16 данных видно, что при нагревании образцов до 180 градусов они теряют до 8% массы, что может быть связано с потерей воды, накопленной в образце. А после 180 градусов происходит первая стадия разложения. При нагреве свыше 300 градусов происходит вторая стадия разложения.

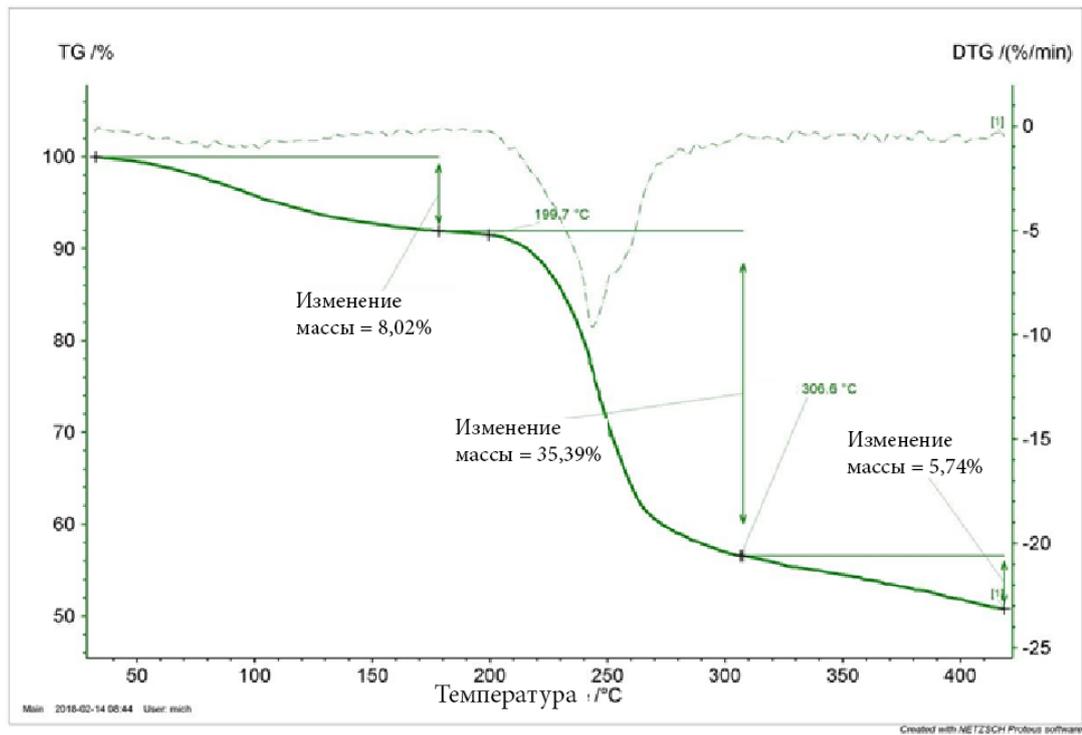


Рисунок 14. ТГА – бактериальный АЛГ, капсулярный

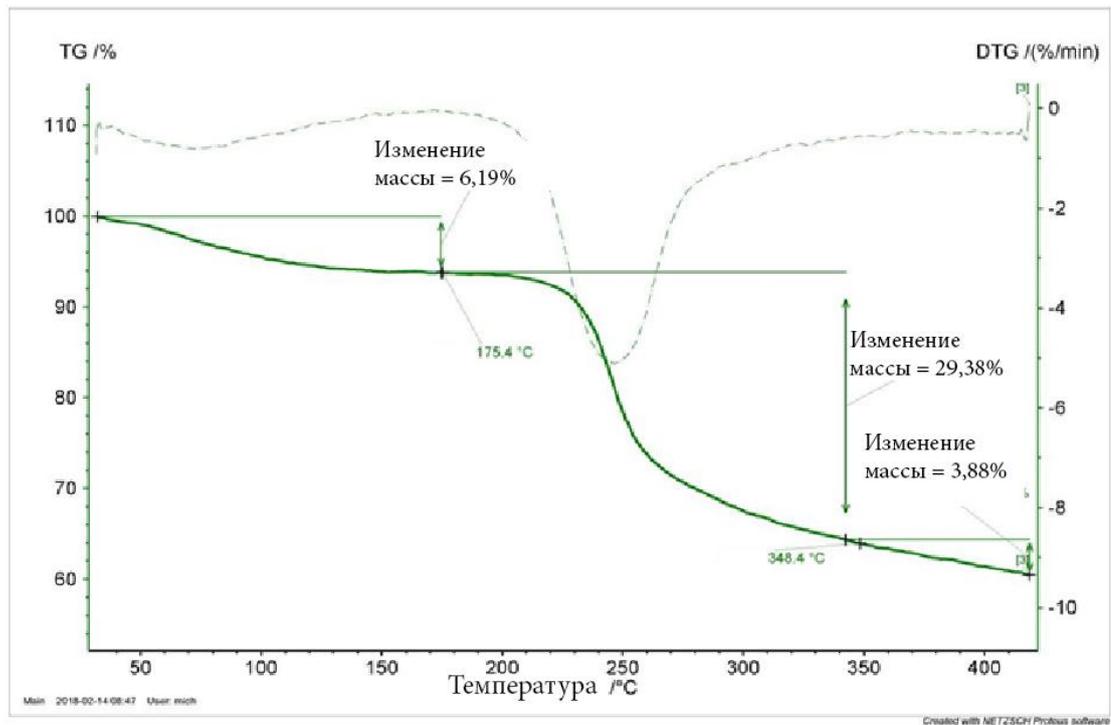


Рисунок 15. ТГА – бактериальный АЛГ, «свободный»

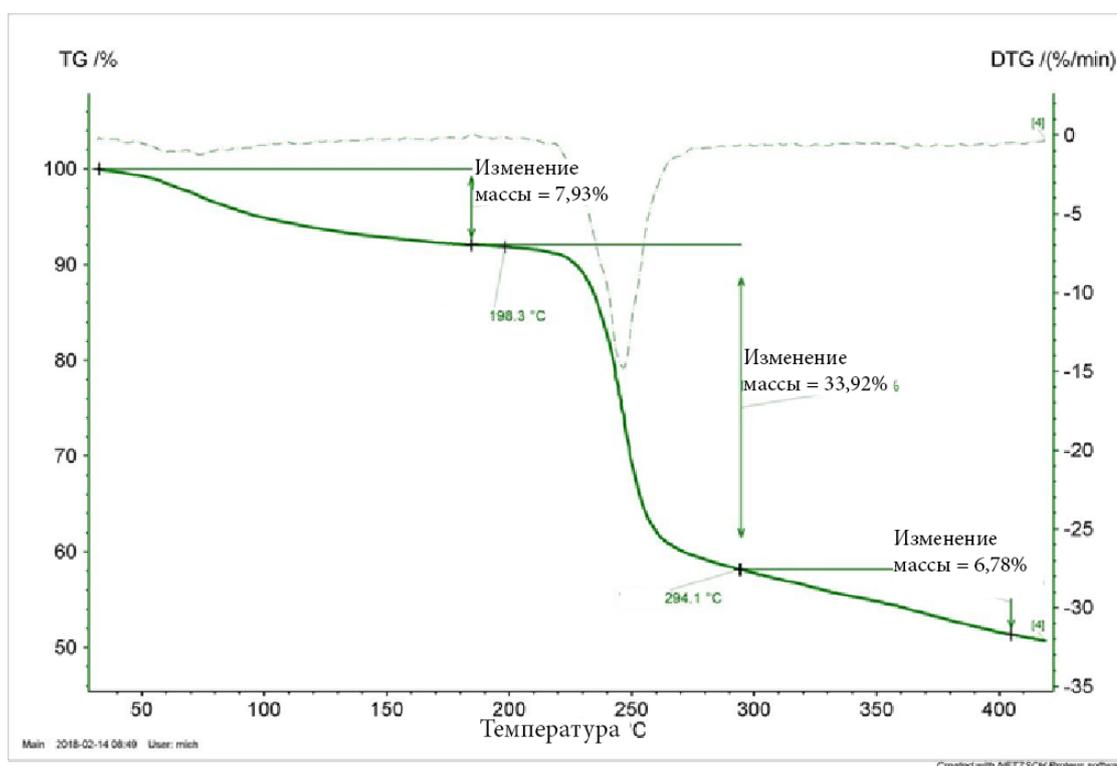


Рисунок 16. ТГА – водорослевый АЛГ (Sigma)

Термальное поведение каждого из образцов было схожим и его можно разделить на три этапа:

- Дегидратация (потеря массы в районе 6-8%) при температурах нагрева в диапазоне от 20°C до 200°C.
- Первое разложение, которое характеризуется большими значениями отклонения кривой, а значит и большими потерями массы (от 30 до 35%) при температурах от 200°C до 300°C.
- Второе разложение сопровождается небольшими потерями массы (от 4 до 7%) в диапазонах температур от 325°C до 450°C.

Среди трех образцов наиболее резким первым разложением характеризуются капсулярный и водорослевый АЛГ (Таблица 7). Самая большая потеря массы при дегидратации у капсулярного образца, а при самых низких температурах у

свободного. Меньшая общая потеря массы наблюдалась у свободного образца, а большая у капсулярного, что вероятно связано с низкой молекулярной массой первого и высокой молекулярной массой второго.

Таблица 7. Разложение АЛГ термогравиметрическим анализом.

Альгинат, №	Стадия	температура	Потеря массы
1 образец (капсулярный, 250 об/мин)	Дегидратация	25°C – 195.6°C	7.35%
	Первое разложение	195.6°C - 330°C	36.56%
	Второе разложение	330°C – 490°C	6.33%
2 образец (свободный, 280 об/мин)	Дегидратация	10°C – 175.4°C	6.19%
	Первое разложение	175.4°C - 348.4°C	29.38%
	Второе разложение	348°C - 490°C	3.88%
3 образец (коммерческий, водорослевый)	Дегидратация	25°C – 198.3°C	7.93%
	Первое разложение	198.3°C – 294.1°C	33.92%
	Второе разложение	294.1°C - 415°C	6.78%

Общая потеря массы:

1 образец — 50.24%

2 образец — 39.45%

3 образец — 48.63%

Полученный бактериальный АЛГ растворим в воде, однако склонен при растворении к образованию конгломератов, как и водорослевый АЛГ. Для получения 10 мл 1% полностью гомогенного раствора при перемешивании и температуре 38°C требуется 1 час (таблица 8).

Для получения растворов АЛГ натрия сухие АЛГ растворяли в 0,9% NaCl.

Таблица 8. Время полного растворения 1% альгината натрия.

альгинат	Примерное время растворения 1% альгината натрия
Водорослевый	1 ч 30 мин ± 15 мин
Капсулярный	1 ч ± 15 мин
Свободный	40 мин ± 10 мин

Гелируемость АЛГ в присутствии ионов кальция зависит от концентрации АЛГ и его молекулярной массы. Чем ниже молекулярная масса и концентрация, тем менее устойчивый, но более жесткий гель получается при добавлении кальция, что видно при проведении исследования реометрии альгинатов кальция.

Гелирование альгината натрия в присутствии ионов кальция происходило мгновенно. Гели водорослевого и капсулярного АЛГ были схожи, они упруги, держат форму, при небольшом деформировании не ломались, возвращались в исходное состояние. Гель свободного АЛГ был более жестким, однако при незначительной деформации разрушался.

Результаты исследования образцов АЛГ (1%-х АЛГ водорослевого, капсулярного, свободного с добавлением 5% хлорида кальция) методом реометрии приведены в таблице 9.

Таблица 9. Механические свойства АЛГ.

Образец	Модуль накопления и модуль потерь (G' и G'') при $\omega = 10$ рад/с, кПа	Комплексный модуль (G^*) при $\omega = 10$ рад/с, кПа	Комплексная вязкость, при $\omega = 10$ рад/с, Па*с
Водорослевый	$G' = 0,88 \pm 0,1$ $G'' = 0,25 \pm 0,05$	$0,92 \pm 0,1$	$91,7 \pm 9$
Капсулярный 250 об/мин	$G' = 0,89 \pm 0,2$ $G'' = 0,19 \pm 0,03$	$0,9 \pm 0,2$	$90,8 \pm 23$
Свободный 250 об/мин	$G' = 0,7 \pm 0,2$ $G'' = 0,08 \pm 0,03$	$0,7 \pm 0,2$	71 ± 21
Капсулярный 280 об/мин	$G' = 1,1 \pm 0,3$ $G'' = 0,3 \pm 0,1$	$1,12 \pm 0,3$	112 ± 30
Свободный 280 об/мин	$G' = 1,2 \pm 0,06$ $G'' = 0,2 \pm 0,02$	$1,2 \pm 0,06$	124 ± 6

Примечание: модуль накопления и модуль потерь часто используют в литературе вместе, как показатель свойства материала. Модуль накопления (G') – или модуль упругости – указывает на то, что энергия напряжения была временно запасена в процессе испытания.

Модуль потерь (G'') – модуль вязкости – говорит о том, что энергия, использованная для инициирования течения, необратимо перешла в теплоту.

Комплексный модуль ($G^* = (G') + i(G'')$) – общее сопротивление образца приложенной деформации.

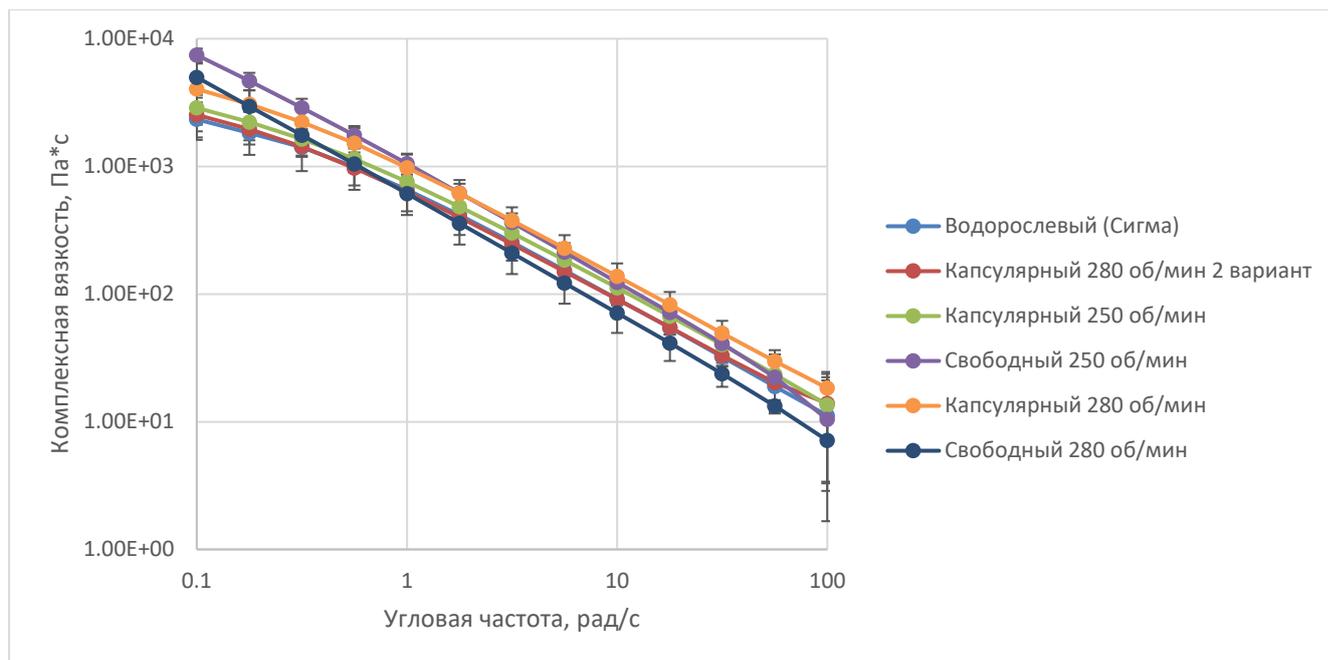


Рисунок 17. Зависимость комплексной вязкости исследуемых образцов от угла деформации

Представленные кривые вязкости говорят о том, что изучаемые образцы представляют собой твердое тело, то есть под действием напряжения элементы их объема больше не могут необратимо изменять свое положение до тех пор, пока вся масса не перемелется в порошок, и таким образом, разрушится. Иными словами, такой полимер является сшитым.

Также из рисунка 17 видим, что наименьшая угловая вязкость характерна для свободного АЛГ, а наибольшая – для капсулярного [Шрамм, 2003].

Кроме того, было определено водопоглощение изучаемых образцов АЛГ. Водопоглощение гелей альгината кальция было рассчитано по формуле (5):

$$\text{Водопоглощение (\%)} = (m_2 - m_0)/m_0 \times 100\%, \quad (5)$$

где m_0 и m_2 - массы обезвоженного и насыщенного водой образцов соответственно (таблица 10).

Таблица 10. Водопоглощение бактериальных и водорослевого АЛГ.

Вид альгината	Водопоглощение, %
Водорослевый Sigma	230 ± 15
Бактериальный капсулярный 250 об/мин	322 ± 10
Бактериальный «свободный» 250 об/мин	341 ± 22
Бактериальный капсулярный 280 об/мин	393 ± 12
Бактериальный «свободный» 280 об/мин	268 ± 20

При помещении высушенных пленок альгинатов кальция (1%-х АЛГ водорослевого, капсулярного, свободного с добавлением 5% хлорида кальция) в деионизированную воду они хорошо набирают воду практически при этом не теряя целостность, кроме «свободного» АЛГ, что вероятно объясняется его низкой молекулярной массы, что делает его хрупким и при набухании теряющим свою форму.

В итоговой таблице 11. представлены физико-химические свойства полученных бактериальных АЛГ.

Таблица 11. Физико-химические свойства бактериальных АЛГ.

АЛГ	ММ, кДа	Потеря массы при нагреве, %	Водопоглощение, %	Комплексный модуль (G*) при $\omega = 10$ рад/с, кПа
водорослевый	2 000	7.93%	230 ± 15	5 ± 1
Капсулярный бактериальный 250 об/мин	430	8.02%	322 ± 10	$1,4 \pm 0,4$
Свободный бактериальный 250 об/мин	95	6,33%	341 ± 22	$0,7 \pm 0,2$
Капсулярный бактериальный 280 об/мин	272		393 ± 12	$1,12 \pm 0,3$
Свободный бактериальный 280 об/мин	117		268 ± 20	$1,2 \pm 0,06$

Из полученных результатов видно, что оптимальным условием для синтеза максимального количества АЛГ был средний вариант, то есть высокие обороты при большой амплитуде (280 грм). Высокие же обороты (330 грм) с маленькой амплитудой таких результатов не дают.

Таким образом показано, что, изменяя условия культивирования и состав среды, можно получать АЛГ с различными физико-химическими свойствами.

3.4 Получение партий альгинатов с различными свойствами бактериальным синтезом

Резюмируя вышеприведенные данные, можно сказать, что были получены партии АЛГ, синтезированные при разных условиях культивирования, обладающих разными физико-химическими характеристиками, и, соответственно, свойствами полимеров. Эти партии были охарактеризованы в работе. Первая партия, это АЛГ, полученные при культивировании различных штаммов на твердой среде. Были выявлены пять штаммов, способных к синтезу АЛГ.

Вторая партия это АЛГ, полученные культурой *Azotobacter agile* 12 при культивировании на жидкой среде в различных условиях аэрации. В этой партии были получены два типа АЛГ – свободный и капсулярный, разительно отличающихся по физико-химическим свойствам за счет большой разницы в молекулярной массе.

Для всех АЛГ были получены данные по их молекулярной массе, мономерному составу и проценту ацетилирования. Партии АЛГ были исследованы на водопоглощение, методами реометрии, ТГА.

Оценку и отбор среди полученных образцов очищенных АЛГ для инкапсулирования эукариотических клеток проводили по молекулярной массе полимера и по способности их к гелеобразованию. От молекулярной массы зависят свойства гелируемости АЛГ. При низкой молекулярной массе альгинаты кальция получают более жесткие и хрупкие, или даже вовсе не гелируются [Peña S., Galindo E., Büchs J., 2011]. При более высокой молекулярной массе АЛГ хорошо гелируются, альгинат кальция получается более прочный и пластичный. Похожим образом влияет и концентрация альгината. От соотношения M/G так же зависит гелируемость АЛГ, так как именно от наличия гулурановых остатков (G) в цепи зависит связываемость кальция АЛГ [Urtuvia и др., 2017]. Соответствующие характеристики полученных АЛГ приведены в таблице 3.10. В результате, для

дальнейшей работы был отобран образец капсулярного АЛГ, полученного при 250 об/мин.

После отбора образцов АЛГ с наиболее подходящими свойствами для дальнейшего их использования при инкапсулировании бактериальных клеток, был проведен дополнительный этап очистки методом диализа для достижения лучшей биосовместимости. Первый этап включал приготовление 0.4% АЛГ в 0.9% растворе NaCl. Вторым этапом было помещение 0.4% раствора АЛГ в диализные мешки с размером пор 12-14 кДа. Диализ проводили в 0,5% NaCl для избавления от избытков соли и ЭДТА в образце. Диализные мешки с АЛГ помещали в стакан для осуществления диффузии примесей по градиенту концентрации. 0.5% раствор NaCl перемешивался на магнитной мешалке при 4°C. Замена 0.5% раствора NaCl на новый производился через 5 часов. Время проведения диализа – 30 часов. АЛГ после диализа центрифугировали 30 минут при 4400 g. Далее супернатант высаживали 3-кратным объемом спирта, осадок собирали центрифугированием (4400 g 15 минут). Полученный осадок сушили методом лиофилизации в лиофильной сушке в течение 24 часов.

Для измерения эффективности диализа у полученных растворов бактериальных АЛГ была измерена кондуктивность (проводимость раствора) кондуктометром (S30 SevenEasy™ conductivity, Mettler Toledo). Для измерения были выбраны образцы капсулярного АЛГ после диализа в течение 24 часов и 30 часов концентрацией 0,4%, полученного при 250 об/мин. В качестве контролей были взяты растворитель, а именно 0,9% раствор NaCl, и водорослевый АЛГ концентрации 0,4% (Таблица 12).

Таблица 12. Кондуктивность растворов альгинатов.

образец	Проводимость раствора, кондуктивность, миллисименс/см
0,9% NaCl	17,48 ± 0,13
Бакт капс АЛГ 0,4% до диализа	19,15 ± 0,21
Бакт капс АЛГ 0,4% диализ 24ч	18,11 ± 0,16
Бакт капс АЛГ 0,4% диализ 30ч	18,07 ± 0,17
Водорослевый АЛГ 0,4%	18,10 ± 0,16

Полученные данные (Таблица 12) измерения кондуктивности бактериальных АЛГ после диализа показали, что проводимость раствора после диализа снижается и становится равной проводимости контроля (коммерческого АЛГ) что дает основание полагать что диализ эффективен и позволяет избавиться от излишков солей, полученных во время процесса очистки.

3.5 Изучение биосовместимости альгинатов

3.5.1 Определение цитотоксичности бактериальных альгинатов

Была проведена оценка цитотоксичности полученных бактериальных АЛГ. В качестве контроля был взят коммерческий образец водорослевого АЛГ («Sigma-Aldrich», Германия)

Мезенхимальные стволовые клетки, полученные из крыс линии Wistar культивировались в течение двух-трех пассажей на чашке Петри в стандартной среде DMEM. Цитотоксичность исследовалась двумя методами.

В первом случае клетки были помещены в 48-луночный планшет в количестве 4000 клеток на лунку, 250 мкл ростовой среды. После культивации в лунки были добавлены водорослевые и бактериальные альгинаты натрия и кальция. Альгинат натрия добавлялся в виде 1% раствора в 0,9 % NaCl по 75 мкл на лунку. Для получения сфер альгината кальция раствор альгината натрия капельным методом помещали в 5% CaCl₂, инкубировали в течение 2 минут, затем

дважды промывали 0,9% NaCl. В лунки добавляли по три сферы (соответствует 75 мкл). Изменение количества клеток через сутки измеряли методом ХТТ по интенсивности окрашивания реагента (чем больше клеток, тем интенсивнее окрашивание). Как видно из графика (рис. 18), АЛГ не обладает цитотоксичностью, не подавляет рост клеток в течение суток, количество клеток в присутствии АЛГ и в отсутствии оно одинаково в пределах стандартного отклонения. Согласно стандартной методике определения цитотоксичности материала материал считается не токсичным, если рост клеток в его присутствии составляет не меньше 90% от роста клеток в отсутствие материала [Narayan, 2019].

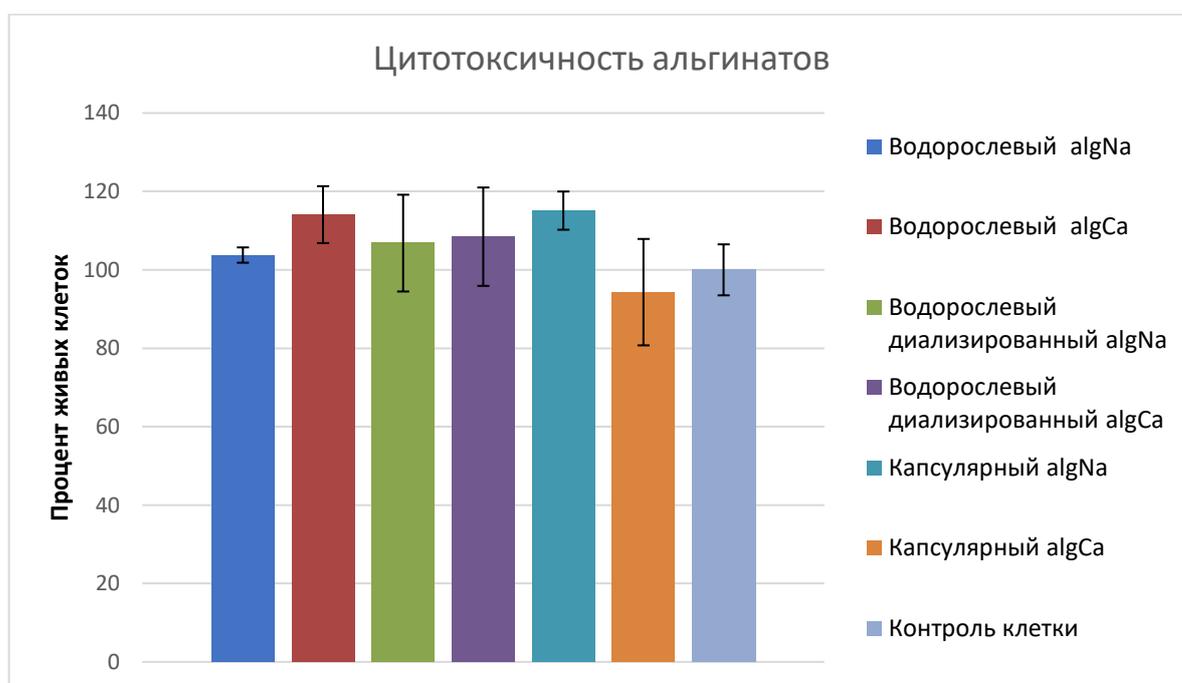


Рисунок 18. Рост МСК в течение суток в присутствии бактериального и водорослевого альгинатов.

Для исследования цитотоксичности МСК были помещены в 96 луночный планшет в количестве 2 000 клеток на лунку в 200 мл. Затем в каждую лунку были добавлены сферы альгината кальция общим объемом 75 мкл.

Цитотоксичность альгината кальция оценивали методом ХТТ по эффективности роста клеток в присутствии альгината.

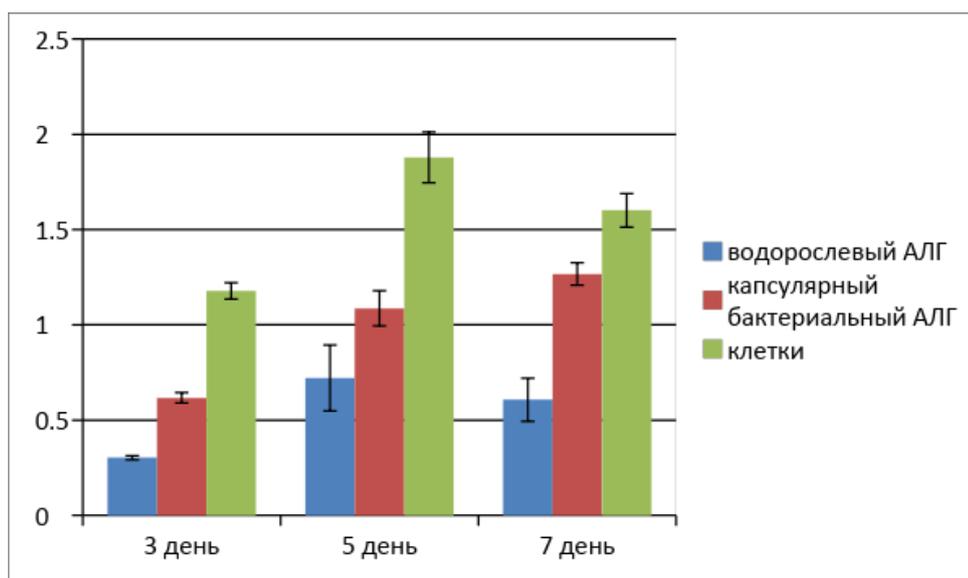


Рисунок 19. Рост МСК в присутствии бактериального и водорослевого альгинатов.

Из диаграммы (Рисунок 19) видно, что оба исследованных альгината кальция в течение недели обладают некоторой цитотоксичностью, однако бактериальный АЛГ показывает более низкую цитотоксичность по сравнению с коммерческим, так как клетки в его присутствии растут в два раза эффективнее.

3.5.2 Изучение роста клеток в альгинатном геле

Для оценки роста клеток в геле из полученных бактериальных АЛГ было проведено культивирование МСК внутри альгинатных гелей.

Готовилась суспензия клеток в 1% альгинате в 0,9% NaCl в концентрации 40 000 клеток на 1мл АЛГ. Полученную суспензию инсулиновым шприцом капали в стерильный 1% раствор хлорида кальция, через минуту промывали 0,9% раствором NaCl и помещали в среду, в которой они далее культивировались.

Количество клеток в альгинатном геле определяли по количеству жизнеспособных клеток, прикрепившихся после растворения альгината кальция цитратом натрия. Количество жизнеспособных клеток определяли методом ХТТ

(Рисунок 20). Из результатов видно, что роста клеток не происходит, но альгинат кальция способен к поддержанию жизнеспособности клеток.

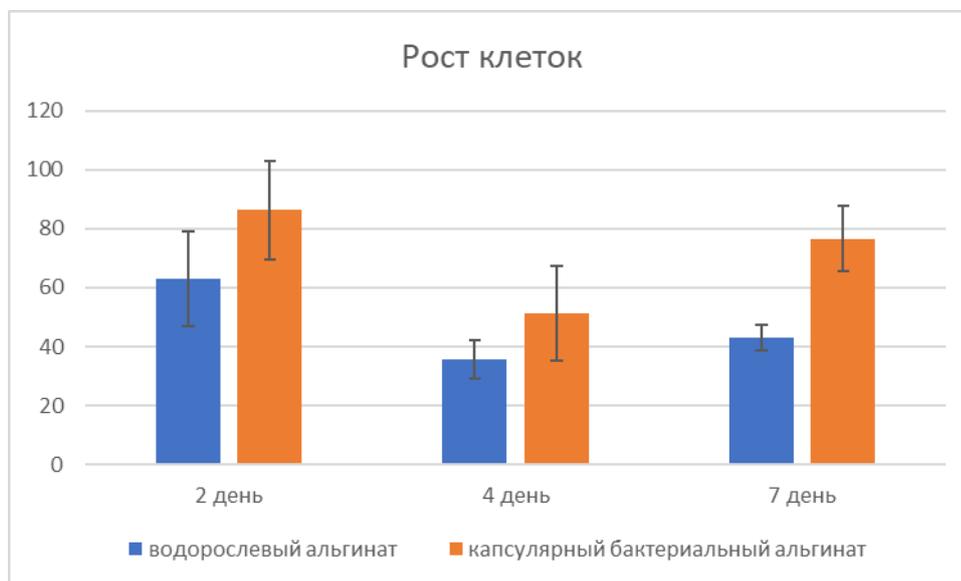


Рисунок 20. Рост клеток в альгинате кальция, ХТГ.

Полученные сферы с МСК исследовали на конфокальном и флуоресцентном микроскопах на 1, 3 и 7 день культивации, окраска кальцеином (Рисунок 21).

При культивации клетки сохраняли шарообразную форму, однако на 3 сутки были двойные клетки, как при делении, однако через 7 суток кластеров клеток не наблюдалось, видимо, они после деления расплзаются по толще АЛГ. Распределение клеток в толще АЛГ однородное (Рисунок 21). При подсчете количества клеток в поле зрения микроскопа можно сделать вывод, что количество жизнеспособных клеток с течением времени увеличивалось.

Такую разницу в результатах, полученных разными методами, можно объяснить тем, что, во-первых, после обработки цитратом возможно не все клетки способны к прикреплению к пластику после роста в альгинатном геле. А во-вторых, клетки в толще геля стремятся находиться ближе к поверхности, что влияет на результаты, полученные методами флуоресцентной микроскопии.

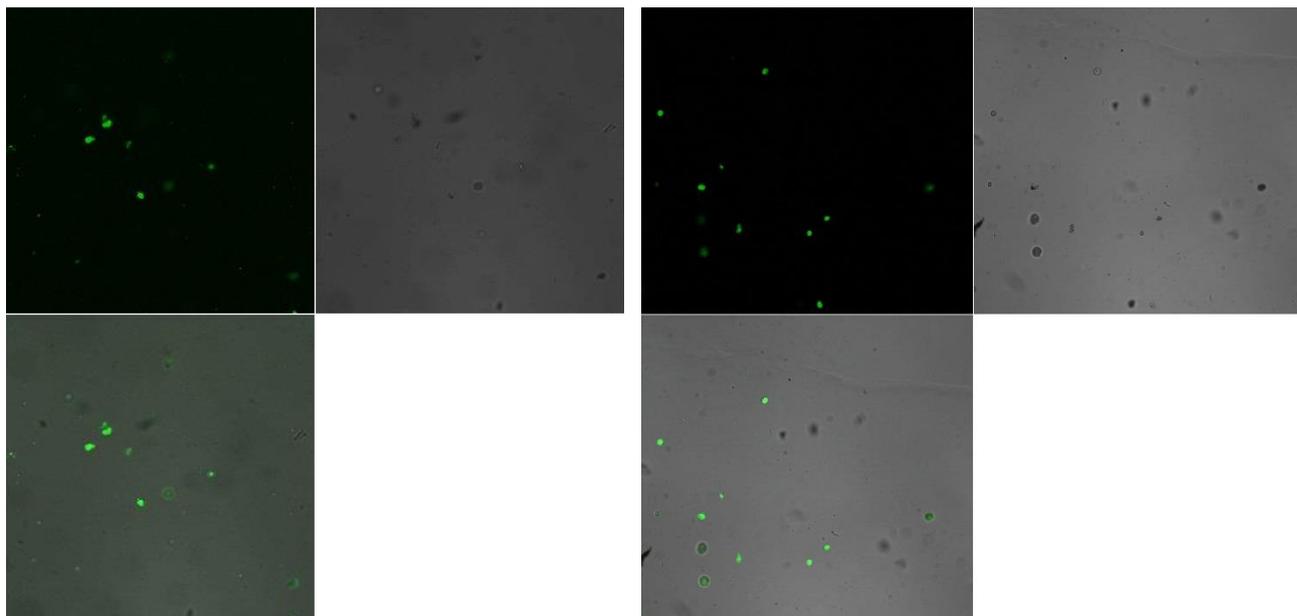


Рисунок 21. МСК в альгинате кальция в поле зрения микроскопа на 3 день (слева) и 7 день (справа) культивирования, $\times 600$, окраска – *Calcein C*.

Полученные данные подтверждают биосовместимость полученных бактериальных АЛГ. Отчетливо видно, что альгинатные матриксы поддерживают пролиферацию клеток (Рисунок 21).

3.6 Разработка изделий из поли-3-оксибутирата

Как уже было сказано, бактерии рода *Azotobacter* способны к синтезу двух полимеров, альгината и поли-3-оксибутирата. Ранее в нашей лаборатории было показано, что синтезированный нами ПОБ является биосовместимым, не цитотоксичным и биоразлагаемым [Бонарцев и др., 2019]. Для разработки конструкций на основе этих двух полимеров сначала были разработаны матриксы из ПОБ и полученное изделие было исследовано на биосовместимость. Также для придания матриксам большей жесткости для увеличения сходства физико-химических свойств с костью были получены матриксы с добавлением гидроксиапатита 10% по массе. В качестве контроля были изготовлены матриксы из полилактида (ПЛА).

Матриксy из ПОБ, ПОБ-ГА и ПЛА были получены методом двойного выщелачивания с использованием карбоната аммония и сахарозы - трехмерные матриксy (Рисунок 22А). Была изучена микроструктура матриксy (Рисунок 22Б).

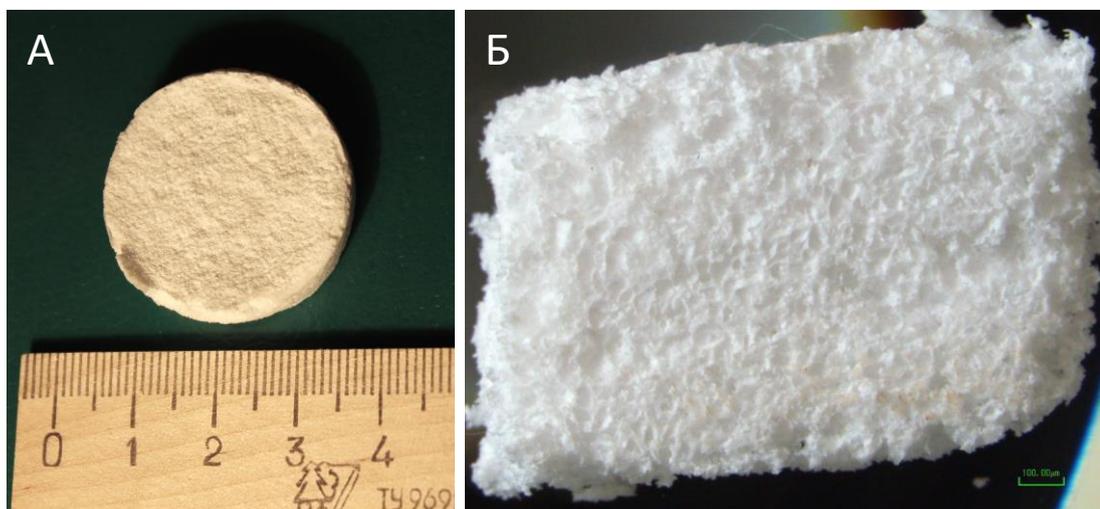


Рисунок 22. Внешний вид пористого матрикса: А - фотография пористого матрикса (зеркальный фотоаппарат Canon 1100D), Б – вид под стереомикроскопом (Nikon SMZ1500 (Япония), $\times 0,75$).

Пористость матриксy рассчитывалась из массы полимера и занимаемого им объема по формуле (6)

$$P = 1 - \left(\frac{m_{\text{мемб}}}{V_{\text{мемб}} * \rho_{\text{ПОБ}}} \right) \times 100 \quad (6)$$

Результаты расчетов пористости вместе с средними размерами пор Ферета представлены в таблице 12. Значения пористости варьируют от 87,5% до 98,2%, что соответствует оптимальным значениям пористости костного мозга [ZHOU и др., 2007].

Таблица 12. Данные пористости и размеры пор матриц в зависимости от состава.

Состав матрикса	Размер пор, мкм	Пористость, %
ПОБ	$114,2 \pm 32,2$	$98,2 \pm 2,9$
ПОБ-ГА	$119,7 \pm 43,4$	$87,5 \pm 5,9$
ПЛА	$125,9 \pm 37,1$	$92,4 \pm 0,1$

Таким образом были получены матрицы состава ПОБ, ПОБ-ГА и ПЛА, обладающие схожими размерами пор и пористостью с костным мозгом, и являющиеся основой для разработки изделия из ПОБ и АЛГ.

3.6.1 Исследование физико-химических свойств матриц из поли-3-оксибутирата

Были получены изображения матриц, полученных различными методами с помощью сканирующего электронного микроскопа CAMSCAN – S4. На рисунке 23 видно, что матрицы обладают сложной внутренней геометрической структурой и большой площадью внутренней поверхности. Сравнивая матрицы разного состава, на изображениях можно видеть различия морфологии поверхности полимера.

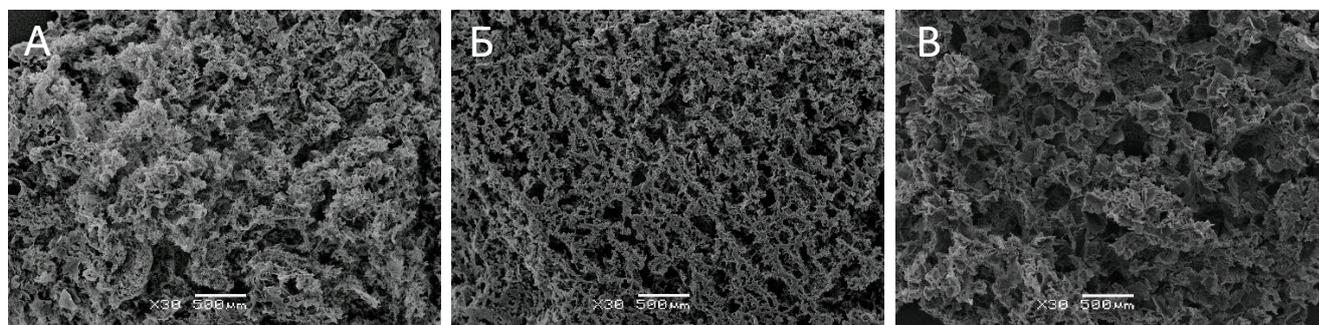


Рис. 23. Микроструктура трехмерных матриц: А - ПОБ, Б - ПОБ/ГА, В - ПЛА, x30, СЭМ.

Как мы видим, полученные матриксы обладают пористой равномерной структурой, незначительно отличающейся между собой.

Были исследованы физические свойства полученных матриксов с помощью методов дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Нас интересовали данные по кристалличности и температуре плавления, которые мы получали из графиков разницы теплоты поглощения. Данные ДСК показали, что кристалличность и жесткость матриксов отличается в зависимости от состава матрикса, однако температура плавления у ПОБ и ПОБ-ГА одинаковая (Таблица 13).

Таблица 13. Данные ДСК.

Тип матрикса	ΔH , Дж/г	H_0 , Дж/г	$T_{нач.пл.}$, °С	$T_{пика}$ пл., °С	$X_{кр}$, %	Модуль Юнга, кПа
ПОБ	94	146	167	175	65	8,7
ПОБ/ГА	88	146	156	176	67	69,8
ПЛА	28	93	141	146	30	113

Как мы видим, кристалличность матриксов ПОБ и ПОБ-ГА одинакова, однако добавление гидроксиапатита в состав полимера предсказуемо увеличивает жесткость (модуль Юнга) получаемого матрикса, приближая это значение к жесткости матрикса из полилактида.

3.6.2 Оценка биосовместимости матриксов из поли-3-оксибутирата *in vitro*

Полученные матриксы были исследованы на биосовместимость *in vitro* на культуре мезенхимальных стволовых клеток крыс. Для оценки жизнеспособности клеток использовался стандартный метод оценки жизнеспособности клеток и биосовместимости полимерных материалов – ХТТ.

Как мы видим из полученных данных (Рисунок 24), все три варианта матриц способны к поддержанию пролиферации клеток и рост клеток на матрицах статистически не отличается в зависимости от состава матрикса.

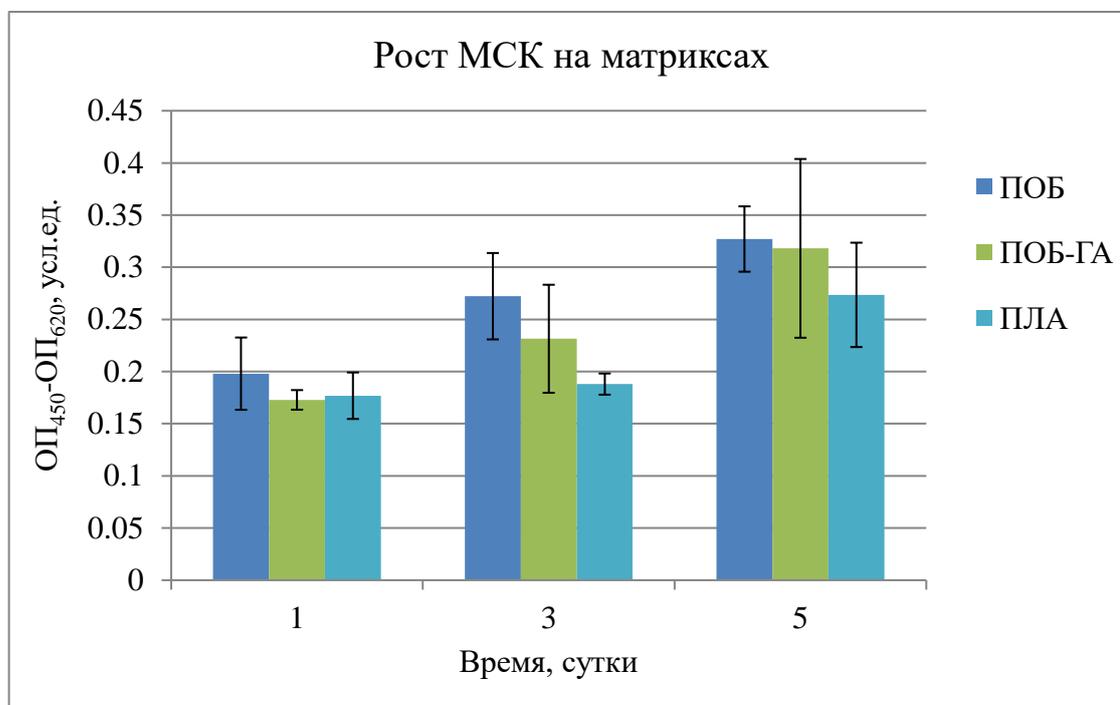


Рисунок 24. Рост мезенхимальных стволовых клеток на трехмерных матрицах состава ПОБ, ПОБ-ГА и ПЛА.

Так же были получены фотографии клеток, культивируемых на матрицах методом сканирующей электронной микроскопии (Рисунок 25). Фотографии были сделаны на третьи сутки культивирования.

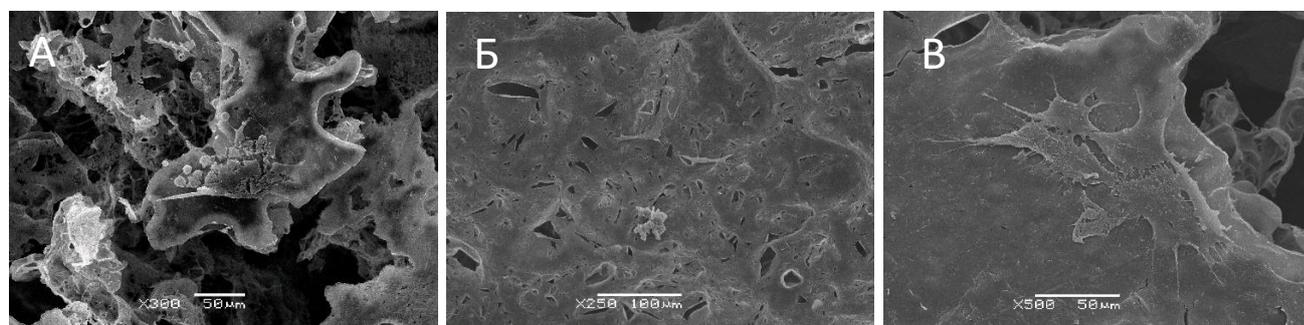


Рисунок 25. Рост клеток на матрицах: А - ПОБ, Б - ПОБ/ГА, В – ПЛА, СЭМ

Клетки хорошо прикрепляются к матриксам, образуя скопления, что подтверждает способность матриксов к поддержанию роста и пролиферации клеток.

3.7 Разработка биоинженерных конструкций на основе поли-3-оксибутирата и альгинатов

На основе матрикса из ПОб, описанного выше, была разработана конструкция из ПОб и АЛГ для тканевой инженерии. Для исследования данной конструкции *in vivo* был разработан эксперимент по зарастанию критического дефекта костной ткани.

Для разработки конструкции для эндопротезирования был использован водорослевый альгинат, так как бактериальный альгинат на момент проведения экспериментов не сертифицирован для эндопротезирования в животных.

Для получения конструкции определенной формы из ПОб и АЛГ подготовили пластиковую модель в соответствии с планируемым дефектом крысиного черепа, которую заполняли сахарозой и карбонатом аммония, и пропитывали раствором ПОб 60 мг/мл или ПОб-ГА 60 мг/мл с 10% содержанием ГА по массе.

После промывания полученные матриксы заполняли 1% раствором альгината натрия в физиологическом растворе до полного насыщения и затем погружали в 5% раствор хлорида кальция до полного гелирования АЛГ в матриксе. Полученную конструкцию отмывали в фосфатном буфере.

Для исследования полученных конструкций был смоделирован критический дефект костной ткани в теменной части черепа крыс диаметром 8 мм, который является показательным, поскольку такой дефект сам по себе не зарастает. Модель имплантата была выполнена таким образом, что она заполняла костный дефект, а также перекрывала его снаружи.

После анестезии на черепе крысы делались продольные и поперечные разрезы, формирующие треугольник, после чего в результате рассечения были обнажены теменные кости. Округлое дефект-отверстие было высверлено в середине сагиттального шва теменных костей избегая повреждения сагиттального синуса. Рану ушивали послойно.

Так как регенерация кости происходит послойно, для визуализации процесса регенерации кости крысам последовательно вводили доксициклин (8, 9 и 10 дни после операции – время активной минерализации), тетрациклин (15, 16 и 17 дни после операции), и ализариновый красный С (22, 23 и 24 дни после операции). На 28-ой день после операции крысы умерщвлялись передозировкой Золетил/Рометар. Поверхность черепа очищали от мышц, область дефекта извлекали с помощью цилиндрической дрели. Время окончания эксперимента было выбрано в соответствии с окончанием периода первичного процесса образования кости [Burr, Allen, 2013].

Изучение серийных гистологических срезов не выявило перекрытие дефекта новообразованной костной тканью на срок 28 сут. Полученные результаты показали равномерное накопление флуоресцентных меток, что говорит об успешном заживлении дефекта на протяжении всех 28 суток (Рисунок 26).

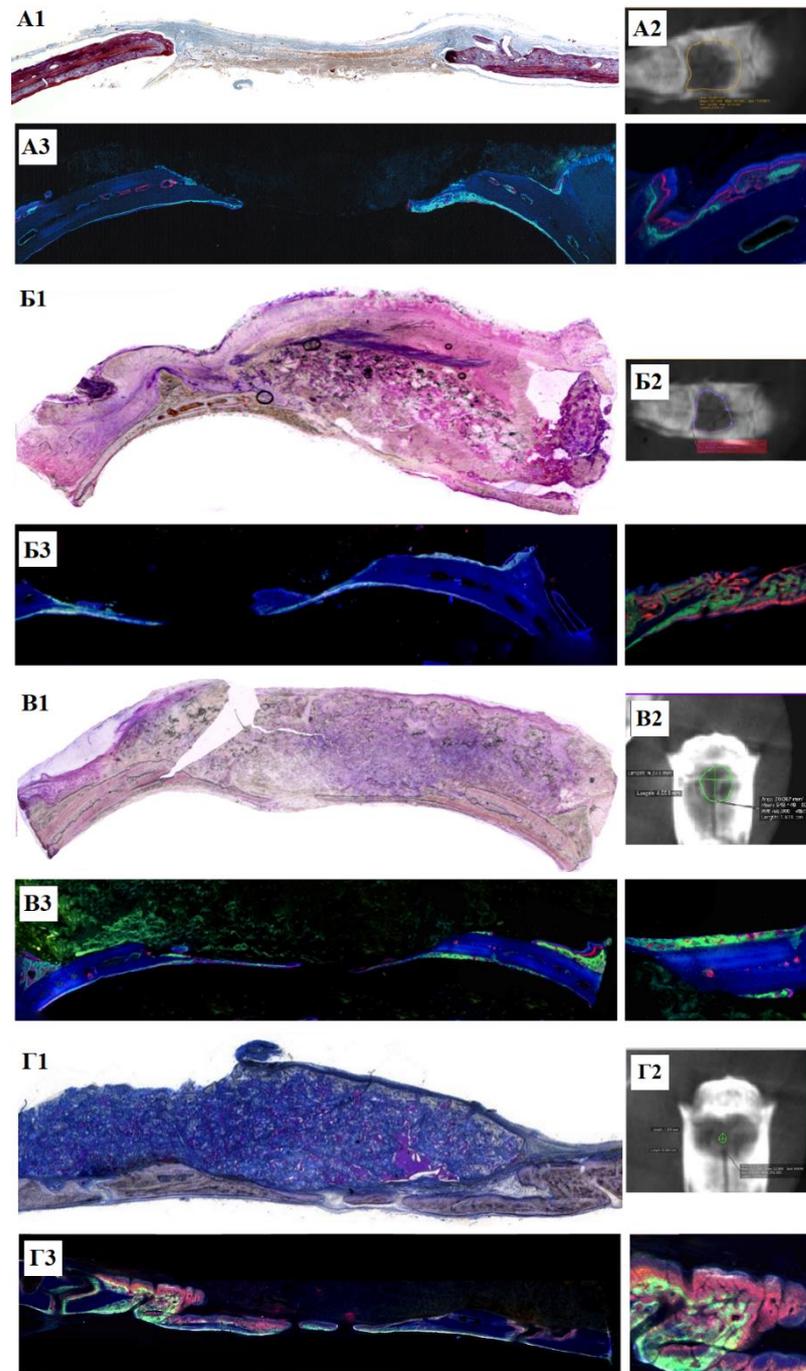


Рисунок 26. Гистологическая картина регенерации костного дефекта (А-Г1), заполненного матриксом, изображения компьютерной томографии (аксиальная проекция) (А-Г2), и мультиканальная гистопантограмма гистологического среза теменных костей крыс с отдельным флуоресцентным окрашиванием на 28 сутки после имплантации (А-Г3). Контроль (без имплантации матрикса) (А1-3), ПОБ-АЛГ (Б1-3), ПОБ-ГА-АЛГ (В1-3), ПОБ-ГА-АЛГ+МСК (Г1-3)

Изучение серийных гистологических срезов (Рисунок 26) на 28 сутки показало, что в случае контроля без имплантации матрикса заращения дефекта не происходит, в случае использования матрикса ПОб-АЛГ наблюдается начало образования пластинчатой кости со стороны мозговой оболочки и перекрытие дефекта происходит на 27%. Матрикс ПОб_ГА_АЛГ обеспечивает перекрытие дефекта до 50%, а матрикс с добавлением мезенхимальных стволовых клеток максимально поддерживает новообразование кости и дефект в лучших случаях зарастает до 93%.

Данные гистологических исследований подтверждаются методами компьютерной томографии (Рисунок 26, А2, Б2, В2, Г2). Мы видим, что размер дефекта при использовании трех типов матрикса отличается от заращения дефекта без матриксов. Таким образом показано, что гибридный матрикс из поли-3-оксибутирата и альгината кальция обладает ограничительной функцией, обеспечивая условия для нормальной регенерации плоских костей черепа у крыс. Разработанный гибридный 3D-матрикс не препятствует течению нормального остеогенеза и обеспечивает благоприятные для регенерации условия и в перспективе подобные конструкции могут быть использованы для регенерации костных дефектов человека.

Вышеописанная конструкция из гидрофобного ПОб и гидрофильного АЛГ в качестве гидрогеля обладает потенциальной возможностью включения как жирорастворимых лекарственных веществ в поли-3-оксибутират – цитостатиков, антимикробных препаратов, и прочее, так и водорастворимых веществ в АЛГ – белков, ферментов, пептидов, цитокинов, гормонов, ростовых факторов, и других лекарственных веществ для терапии различных заболеваний, а также для введения клеточных культур, в том числе и стволовых клеток, для поддержания регенерации тканей.

Заключение

В работе впервые была проведена оценка коллекции бактерий рода *Azotobacter* (*A. chroococcum* 12Б, *A. chroococcum* 7Б, *A. agile* 12, *A. indicum* 8, *A. vinelandii* 17, *A. vinelandii* 5Б) на способность к биосинтезу двух полимеров – гидрофильного альгината и гидрофобного поли-3-оксибутирата. Бактерии рода *Azotobacter* синтезируют альгинат – экзополисахарид, который выполняет защитную функцию, а в клетке аккумулирует ПОБ в виде гранул, выполняющий запасную функцию. Было выявлено 5 штаммов, в разной степени способных к биосинтезу этих полимеров (*A. chroococcum* 12Б, *A. chroococcum* 7Б, *A. agile* 12, *A. indicum* 8). Показано, что разнообразие штаммов влияет на вариабельность количества синтезируемых полимеров и их физико-химические свойства, такие как молекулярная масса, мономерный состав полимерной цепи АЛГ, процент ацетилирования маннуроновых остатков.

Методами ИК спектроскопии показано, что синтезируемый бактериями АЛГ практически идентичен водорослевому альгинату, и отличается только мономерным составом и наличием ацетилирования, что согласуется с литературными данными [Clementi, 1997; Усов, 1999].

Для изучения возможности варьирования синтеза и физико-химических свойств бактериальных АЛГ было исследовано влияние условий культивирования на синтез и физико-химические свойства альгината. Показано, что снижение концентрации фосфатов в ростовой среде, увеличение концентрации источника углеводов и добавление источника азота в среду приводит к увеличению синтеза и меняет физико-химические свойства получаемых АЛГ. Так же показано, что кислород является наиболее существенным фактором, влияющим на регуляцию биосинтеза АЛГ.

Для дальнейшего исследования АЛГ на биосовместимость были разработаны и модифицированы методы выделения и очистки полимера из культуральной

среды. Наиболее оптимальным методом был признан метод выделения АЛГ с использованием ЭДТА с дальнейшим проведением диализа. Полученный АЛГ разделяли на «свободный» и «капсулярный». Свободный АЛГ обладает низкой молекулярной массой и находится в свободной форме в виде альгината натрия в растворе культуральной жидкости, влияя на ее вязкость. «Капсулярный» АЛГ – высокомолекулярный и образует капсулу вокруг бактерии для защиты нитрогеназы от кислорода и защиты бактерии от двухвалентных катионов.

Методами реометрии показано, что альгинат натрия, при растворении в 0,9% хлориде натрия, являющемся жидкостью, при взаимодействии с двухвалентными ионами кальция образует гель, представляющим собой твердое тело и сохраняющим свою структуру и форму под действием напряжения, что указывает на то, что гель альгината кальция является сшитым полимером.

Такое свойство АЛГ образовывать поддерживающий свою форму гель позволило рассмотреть его использование в биотехнологии в качестве гидрогеля для роста клеток. Бактериальные альгинаты натрия и кальция были исследованы на цитотоксичность и биосовместимость. Показано, что АЛГ не цитотоксичны и способны к поддержанию роста и пролиферации клеток внутри альгинатного геля.

На основе двух полимеров, синтезируемых бактериями рода *Azotobacter* – АЛГ и ПОБ, была разработана конструкция для обеспечения условий для нормальной регенерации костной ткани крыс. В начале были разработаны трехмерные пористые матриксы из водонерастворимого ПОБ методами выщелачивания и формования с использованием карбоната аммония и сахарозы в качестве водорастворимых агентов соответственно. Матриксы были исследованы на биосовместимость и была показана их способность к поддержанию пролиферации клеток. Затем была разработана конструкция на основе матрикса из поли-3-оксибутирата, который заполняли раствором альгината натрия и затем гелировали ионами кальция. Данная конструкция была исследована на

критическом дефекте теменной кости черепа крыс. Показано, что гибридный матрикс из ПОВ и альгината кальция обладает ограничительной функцией, обеспечивая условия для нормальной регенерации плоских костей черепа у крыс. Разработанный гибридный 3D-матрикс не препятствует течению нормального остеогенеза и обеспечивает благоприятные для регенерации условия и в перспективе подобные конструкции могут быть использованы для регенерации костных дефектов человека.

ВЫВОДЫ

1. Проведена оценка коллекции бактерий рода *Azotobacter* на способность к синтезу альгинатов, выявлены потенциальные продуценты альгинатов. Показана возможность регуляции биосинтеза альгинатов и поли-3-оксибутирата за счет изменения условий культивирования. Наиболее существенным фактором, влияющим на регуляцию синтеза АЛГ и ПОБ, является кислород. Увеличение аэрации приводит к увеличению синтеза АЛГ, уменьшение – способствует синтезу ПОБ. Разработаны методы выделения и очистки синтезированных свободных и капсулярных альгинатов.
2. Методом ИК спектроскопии показано сходство бактериальных и водорослевых альгинатов, отмечено наличие в полимерной цепи ацетильных групп, характерных только для бактериальных альгинатов (от 10 до 40%). Соотношение M/G мономерного состава цепи бактериальных альгинатов и степень ацетилирования в большей степени варьирует в зависимости от штамма культуры и в меньшей степени от условий культивирования (M/G от 50/50 до 80/20, ацетилирование от 10% до 40%). У штамма *A. chroococcum* 7Б отмечено высокое содержание гулурановой кислоты в полимерной цепи (M/G – 50/50).
3. Молекулярная масса синтезированных свободных альгинатов в зависимости от условий выращивания у исследованных штаммов варьировала незначительно (от 70 до 150 кДа). Молекулярная масса капсулярного альгината варьировала от 250 до 600 кДа.
4. Показано, что гидрогели альгината кальция представляют собой твердое тело и сохраняют свою структуру под действием напряжения, то есть являются сшитым полимером.
5. Впервые проведено исследование биосовместимости бактериальных альгинатов. Показано отсутствие цитотоксичности синтезированных бактериальных альгинатов. Полимер обладает способностью к

поддержанию роста и пролиферации внутри альгинатного геля культуры мезенхимальных стволовых клеток крыс линии *Wistar*.

6. Впервые разработана гибридная конструкция на основе поли-3-оксибутирата и альгината, которая обеспечивает условия для нормальной регенерации костной ткани крыс *in vivo*, что открывает перспективы для использования бактериального альгината в тканевой инженерии.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность сотрудникам лаборатории «биохимии азотфиксации и метаболизма азота» Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» за возможность проведения работы, в особенности сотрудникам группы «биополимеры», а именно, своему руководителю Бонарцевой Г.А., Махиной Т.К., Мышкиной В.Л., за поддержку и помощь в проведении работы, заведующему лаборатории Топунову А.Ф. А так же коллегам: Жарковой И.И., Зернову А.Г., Яковлеву С.Г., Чесноковой Д.В. за неоценимую помощь и поддержку. Автор выражает благодарность кафедре биоинженерии Биологического факультета Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова за возможность использования лабораторного оборудования, своему руководителю Бонарцеву А.П. за организацию работы и ценные советы, проф. Шайтану К.В. за организацию работы, Кудряшовой К.С. и проф. Феофанову А.В. за помощь в исследовании с использованием конфокального микроскопа; кафедре электронной микроскопии в лице заведующего Давидовича Н.Д. за помощь в работе со сканирующими электронными микроскопами. Электронная микроскопия была выполнена на уникальном оборудовании «3D-EMS» МГУ, в работе использовано оборудование ЦКП «Электронная микроскопия в науках о жизни» МГУ им. М. В. Ломоносова. В работе было использовано оборудование Центров коллективного пользования МГУ имени М.В.Ломоносова (в т.ч. в рамках Программы развития МГУ имени М.В.Ломоносова до 2020 года) и Института биохимии им. А.Н.Баха РАН.

Работы, описанные в диссертации, были поддержаны рядом российских грантов, в том числе, грантами Российского Научного Фонда №№ 15-15-10014 (в части получения тканеинженерных конструкций), 17-74-20104 (в части биосинтеза альгинатов) и 20-64-47008 (в части получения поли-3-оксибутирата), Российского Фонда Фундаментальных исследований № 20-54-00021 (в части культивирования МСК).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Босхонджиев А.П., Бонарцев А.П., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Иванов Е.А., Багров Д.В., Филатова Е.В., Иорданский А.Л., Бонарцева Г.А. Сравнительное изучение кинетики биodeградации биополимерных систем на основе поли-3-оксибутирата. // Биомедицинская химия. 2009. № 6 (55). С. 702–712.
2. Василец В.Н., Казбанов И.В., Ефимов А.Е., Севастьянов В.И. Разработка новых методов формирования имплантационных материалов с использованием технологий электроспиннинга и биопринтирования // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2014. № 2 (11). С. 47–53.
3. Волков А.В. Синтетические биоматериалы на основе полимеров органических кислот в тканевой инженерии // Гены и клетки. 2005. № 2 (2). С. 43–45.
4. Волова Т.Г., Севастьянов В.И., Шишацкая Е.И. Полиоксиалканоаты (ПОА)–биоразрушаемые полимеры для медицины. (под редакцией академика В.И. Шумакова), 2-е изд. дополн. и переработ. / Т.Г. Волова, В.И. Севастьянов, Е.И. Шишацкая, Издательство СО РАН, 2003. 1–331 с.
5. Горюнов В.А., Черников А.И., Чуйков А.М. Дифференциально-термический и термогравиметрический анализ термодеструкции полимерных материалов 2012. 154–157 с.
6. Егорова В.А. Физико-химические и биологические свойства матрикса на основе бактериального полимера для биоискусственных органов и тканей 2005.
7. Ефимова А.И., Зайцев В.Б., Болдырев Н.Ю., Кашкаров П.К. Инфракрасная Фурье - Спектрометрия / А.И. Ефимова [и др.], Физический факультет МГУ, 2008. 1–123 с.
8. Иванов С.Ю., Мухаметшин Р.Ф., Мураев А.А., Бонарцев А.П., Рябова В.М. Синтетические материалы, используемые в стоматологии для замещения дефектов костной ткани // Современные проблемы науки и образования. 2013. (1). С. 60.
9. Логинов Я.О. Биосинтез и свойства экзополисахарида *Azotobacter vinelandii* 2011.
10. Логинов Я.О., Худайгулов Г.Г., Четвериков С.П., Мелентьев А.И., Логинов О.Н.

- Биополимер альгинатной природы с преобладанием L-гулуруновой кислоты // Прикладная биохимия и микробиология. 2011. № 3 (47). С. 343–347.
11. Марковцева М.Г., Немец Е.А., Севастьянов В.И. Пористые трехмерные носители для культивирования и трансплантации клеток на основе сополимера гидроксibuтирата с гидроксивалератом // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2006. № 4 (8). С. 83–88.
12. Олтаржевская Н.Д., Коровина М.А., Савилова Л.Б. Текстиль и медицина. Перевязочные материалы с пролонгированным лечебным действием // Российский химический журнал. 2002. № 1 (44). С. 133–141.
13. Охлобыстин А.В. Современные возможности применения антацидных препаратов // Русский Медицинский Журнал. 2002. № 2 (4). С. 51.
14. Петрова Е.А., Кедик С.А., Алексеев К.В., Блынская Е.В., Панов А.В., Суслов В.В., Тихонова Н.В. Оценка эффективности метода двойного эмульгирования при получении микросфер налтрексона на основе сополимера молочной и гликолевой кислот // Тонкие химические технологии. 2013. № 2 (8). С. 58–63.
15. Севастьянов, В. И., Кирпичников, М. П. Биосовместимые материалы / М.П. Севастьянов, В. И., Кирпичников, 2011.
16. Севастьянов В.И., Васин С.Л., Перова Н.В. Методы исследования биоматериалов и медицинских изделий //М.: ИЦ ВНИИ геосистем. под ред. В.И. Севастьянов, М.: ИЦ ВНИИ геосистем, 1999. 47–87 с.
17. Усов А.И. Альгиновые кислоты и альгинаты: методы анализа, определения состава и установления строения // Успехи химии. 1999. № 11 (68). 1051–1061 с.
18. Четвериков С.П., Логинов Я.О., Пигильцова С.А., Черкасова Д.В., Логинов О.Н. Оптимизация условий культивирования и биосинтеза экзополисахарида *Azotobacter vinelandii* // Башкирский химический журнал. 1994. № 5 (13).
19. Шехтер А.Б., Серов В.В. Воспаление и регенерация 1995. 200–219 с.
20. Шрамм Г. Основы практической реологии и реометрии / Г. Шрамм, Москва: КолосС, 2003. 311 с.
21. Юданова Т., Решетов И. Современные раневые покрытия: получение и свойства

- (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. 2006. № 2 (40). С. 24–31.
22. Янова О.Б., Березина О.И., Ким В.А. Эффективность нового альгинат-антацидного препарата в устранении постпрандиального рефлюкса // Лечащий врач. 2013. (4). С. 74.
23. Agarova O.I., Efimov A.E., Moisenovich M.M., Bogush V.G., Agarov I.I. Comparative analysis of three-dimensional nanostructure of porous biocompatible scaffolds made of recombinant spidroin and silk fibroin for regenerative medicine // Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs. 2015. № 2 (17). С. 37.
24. Ahmed E.M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review // Journal of Advanced Research. 2015. № 2 (6). С. 105–121.
25. Akita S., Einaga Y., Miyaki Y., Fujita H. Solution Properties of Poly(D- β -hydroxybutyrate). 1. Biosynthesis and Characterization // Macromolecules. 1976. № 5 (9). С. 774–780.
26. Antich C., Vicente J. de, Jiménez G., Chocarro C., Carrillo E., Montañez E., Gálvez-Martín P., Marchal J.A. Bio-inspired hydrogel composed of hyaluronic acid and alginate as a potential bioink for 3D bioprinting of articular cartilage engineering constructs // Acta Biomaterialia. 2020. (106). С. 114–123.
27. Ashton R.S., Banerjee A., Punyani S., Schaffer D. V., Kane R.S. Scaffolds based on degradable alginate hydrogels and poly(lactide-co-glycolide) microspheres for stem cell culture // Biomaterials. 2007. № 36 (28). С. 5518–5525.
28. Augst A.D., Kong H.J., Mooney D.J. Alginate hydrogels as biomaterials. // Macromolecular bioscience. 2006. № 8 (6). С. 623–33.
29. Barnard G.N., Sanders J.K. The poly-beta-hydroxybutyrate granule in vivo. A new insight based on NMR spectroscopy of whole cells. // The Journal of biological chemistry. 1989. № 6 (264). С. 3286–91.
30. Beale J., Foster J. Carbohydrate fluxes into alginate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* NCIB 8789: NMR investigations of the triose pools. // Biochemistry. 1996. (35). С. 4492–4501.
31. Bixler H.J., Porse H. A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry //

Journal of Applied Phycology. 2011. № 3 (23). C. 321–335.

32. Bonartsev A.P., Bonartseva G.A., Shaitan K. V., Kirpichnikov M.P. Poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate)-based biopolymer systems // Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry. 2011. № 1 (5). C. 10–21.

33. Bonartsev A.P., Yakovlev S.G., Zharkova I.I., Boskhomdzhev 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. № 1 (14). C.12.

34. 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. № 2 (11). C. 4–16.

35. Brigham, Sinskey Applications of Polyhydroxyalkanoates in the Medical Industry // International Journal of Biotechnology for Wellness Industries. 2012. № 1 (1). C. 53–60.

36. Burr D.B., Allen M.R. Basic and applied bone biology // Academic Press. 2013. C. 392.

37. Castaneda M., Guzman J., Moreno S., Espín G. The GacS Sensor Kinase Regulates Alginate and Poly- β -Hydroxybutyrate Production in *Azotobacter vinelandii* // Journal of Bacteriology. 2000. № 9 (182). C. 2624–2628.

38. Castañeda M., Sánchez J., Moreno S., Núñez C., Espín G. The global regulators GacA and σ S form part of a cascade that controls alginate production in *Azotobacter vinelandii* // Journal of Bacteriology. 2001. № 23 (183). C. 6787–6793.

39. Caterson E.J., Nesti L.J., Li W.-J., Danielson K.G., Albert T.J., Vaccaro A.R., Tuan R.S. Three-dimensional cartilage formation by bone marrow-derived cells seeded in polylactide/alginate amalgam // Journal of Biomedical Materials Research. 2001. № 3 (57). C. 394–403.

40. Chatfield S. A Comparison of the Efficacy of the Alginate Preparation, Gaviscon

- Advance, with Placebo in the Treatment of Gastro-Oesophageal Reflux Disease // *Current Medical Research and Opinion*. 1999. № 3 (15). C. 152–159.
41. Chen X., Martin B.D., Neubauer T.K., Linhardt R.J., Dordick J.S., Rethwisch D.G. Enzymatic and chemoenzymatic approaches to synthesis of sugar-based polymer and hydrogels // *Carbohydrate Polymers*. 1995. № 1 (28). C. 15–21.
42. Clementi F., Fantozzi P., Mancini F., Moresi M. Optimal conditions for alginate production by *Azotobacter vinelandii* // *Enzyme and Microbial Technology*. 1995. № 11 (17). C. 983–988.
43. Clementi F. Alginate Production by *Azotobacter Vinelandii* // *Critical Reviews in Biotechnology*. 1997. (17). C. 327–361.
44. Deavin L., Jarman T.R., Lawson C.J., Righelato R.C., Slocombe S. The Production of Alginic Acid by *Azotobacter vinelandii* in Batch and Continuous Culture под ред. P.A. Sandford, A. Laskin, American Chemical Society, 1977. 14–26 с.
45. Delibegović S., Iljazović E., Katica M., Koluh A. Tissue Reaction to Absorbable Endoloop, Nonabsorbable Titanium Staples, and Polymer Hem-o-lok Clip After Laparoscopic Appendectomy // *JSLs: Journal of the Society of Laparoendoscopic Surgeons*. 2011. № 1 (15). C. 70.
46. Distler T., Solisito A.A., Schneidereit D., Friedrich O., Detsch R., Boccaccini A.R. 3D printed oxidized alginate-gelatin bioink provides guidance for C2C12 muscle precursor cell orientation and differentiation via shear stress during bioprinting // *Biofabrication*. 2020. № 4 (12). C. 045005.
47. Dobereiner J., Day J.M., Dart P.J. Nitrogenase Activity and Oxygen Sensitivity of the *Paspalum notatum*-*Azotobacter paspali* Association // *Journal of General Microbiology*. 1972. № 1 (71). C. 103–116.
48. Draget K.I., Skjåk Bræk G., Smidsrød O. Alginic acid gels: the effect of alginate chemical composition and molecular weight // *Carbohydrate Polymers*. 1994. № 1 (25). C. 31–38.
49. Earle R.D. Removing Algin Food Coating. U.S. Patent 3,493,398; Chem. Abstr. 73. // 1970. 2844 с.

50. Ertesvåg H., Valla S. The A Modules of the *Azotobacter vinelandii* Mannuronan-C-5-Epimerase AlgE1 Are Sufficient for both Epimerization and Binding of Ca²⁺ // *Journal of Bacteriology*. 1999. № 10 (181). C. 3033–3038.
51. Feksa L.R., Troian E.A., Muller C.D., Viegas F., Machado A.B., Rech V.C. Hydrogels for biomedical applications Elsevier, 2018. 403–438 c.
52. Ferrala N., Westervelt P., Mabbott G., Fekete F. Relation between extracellular polysaccharide production and medium iron concentration in nitrogen fixing *Azotobacter chroococcum* B-8. // *Abstr Annu Meet Am Soc Microbiol* 86:Meeting K-143. 1986.
53. Fischer M., Gebhard F., Hammer T., Zurek C., Meurer G., Marquardt C., Hofer D. Microbial alginate dressings show improved binding capacity for pathophysiological factors in chronic wounds compared to commercial alginate dressings of marine origin. // *Journal of biomaterials applications*. 2017. № 9 (31). C. 1267–1276.
54. Foster L.J.R. Biosynthesis, properties and potential of natural–synthetic hybrids of polyhydroxyalkanoates and polyethylene glycols // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007. № 6 (75). C. 1241–1247.
55. Franklin M.J., Nivens D.E., Weadge J.T., Howell P.L. Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Extracellular Polysaccharides, Alginate, Pel, and Psl. // *Frontiers in microbiology*. 2011. (2). C. 167.
56. Gacesa P. Alginates // *Carbohydrate Polymers*. 1988. № 3 (8). C. 161–182.
57. 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. (6). C. 7.
58. García A., Castillo T., Ramos D., Ahumada-Manuel C.L., Núñez C., Galindo E., Büchs J., Peña C. Molecular weight and viscosifying power of alginates produced by mutant strains of *Azotobacter vinelandii* under microaerophilic conditions // *Biotechnology Reports*. 2020. (26). C. e00436.
59. Ge Z., Fan L., Yang S. Synthesis and characterization of novel fluorinated polyimides derived from 1,1'-bis(4-aminophenyl)-1-(3-trifluoromethylphenyl)-2,2,2-

- trifluoroethane and aromatic dianhydrides // *European Polymer Journal*. 2008. № 4 (44). C. 1252 – 1260.
60. Gimmetstad M., Ertesvåg H., Marita T., Heggeset B., Aarstad O., Iren B., Svanem G., Valla S. Characterization of Three New *Azotobacter vinelandii* Alginate Lyases , One of Which Is Involved in Cyst Germination □ // *Journal of Bacteriology*. 2009. № 15 (191). C. 4845–4853.
61. Griffith L.G. Emerging design principles in biomaterials and scaffolds for tissue engineering. // *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2002. (961). C. 83–95.
62. Griffith L.G., Naughton G. Tissue Engineering--Current Challenges and Expanding Opportunities // *Science*. 2002. № 5557 (295). C. 1009–1014.
63. 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. № 4 (2). C. 497–502.
64. Hamidi M., Azadi A., Rafiei P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery // *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008. № 15 (60). C. 1638–1649.
65. Hampson F., Farndale A., Strugala V., Sykes J., Jolliffe I., P D. Alginate rafts and their characterisation // *International Journal of Pharmaceutics*. 2005. № 1–2 (294). C. 137–147.
66. Haug A., Larsen B., Smidsrød O. The degradation of alginate at different pH values // *Acta Chem Scand*. 1963. № 5 (17). C. 1466–1468.
67. Hay I.D., Rehman Z.U., Rehm B.H.A. Membrane topology of outer membrane protein AlgE, which is required for alginate production in *Pseudomonas aeruginosa*. // *Applied and environmental microbiology*. 2010. № 6 (76). C. 1806–12.
68. Heo D.N., Alioglu M.A., Wu Y., Ozbolat V., Ayan B., Dey M., Kang Y., Ozbolat I.T. 3D Bioprinting of Carbohydrazide-Modified Gelatin into Microparticle-Suspended Oxidized Alginate for the Fabrication of Complex-Shaped Tissue Constructs // *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2020. № 18 (12). C. 20295–20306.
69. Hernández-González A.C., Téllez-Jurado L., Rodríguez-Lorenzo L.M. Alginate

- hydrogels for bone tissue engineering, from injectables to bioprinting: A review // *Carbohydrate Polymers*. 2020. (229). C. 115514.
70. Hernández R.M.A., Orive G., Murua A., Pedraz J.L. Microcapsules and microcarriers for in situ cell delivery. // *Advanced drug delivery reviews*. 2010. № 7–8 (62). C. 711–30.
71. Hoefler D., Schnepf J.K., Hammer T.R., Fischer M., Marquardt C. Biotechnologically produced microbial alginate dressings show enhanced gel forming capacity compared to commercial alginate dressings of marine origin // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2015. № 4 (26). C. 162.
72. Hoesli C., Raghuram K., Kiang R., Mocinecová D., Hu X., Johnson J., Lacík I., Kieffer T., Piret J. Pancreatic cell immobilization in alginate beads produced by emulsion and internal gelation // *Biotechnology and Bioengineering*. 2011. № 108 (2). C. 424–434.
73. Hrynyk M., Martins-Green M., Barron A.E., Neufeld R.J. Alginate-PEG Sponge Architecture and Role in the Design of Insulin Release Dressings // *Biomacromolecules*. 2012. № 5 (13). C. 1478–1485.
74. Hwang Y.-S., Cho J., Tay F., Heng J.Y.Y., Ho R., Kazarian S.G., Williams D.R., Boccaccini A.R., Polak J.M., Mantalaris A. The use of murine embryonic stem cells, alginate encapsulation, and rotary microgravity bioreactor in bone tissue engineering // *Biomaterials*. 2009. № 4 (30). C. 499–507.
75. Imrie F. Process for the production of polysaccharide // 1973.
76. Jiménez D.J., Montaña J.S., Martínez M.M. Characterization of free nitrogen fixing bacteria of the genus *Azotobacter* in organic vegetable-grown Colombian soils // *Brazilian Journal of Microbiology*. 2011. № 3 (42). C. 846–858.
77. Kashyap N., Kumar N., Kumar M. Hydrogels for pharmaceutical and biomedical applications // *Crit Rev Ther Drug Carr Syst*. 2005. (22). C. 107–149.
78. Krsko P., McCann T.E., Thach T.-T., Laabs T.L., Geller H.M., Libera M.R. Length-scale mediated adhesion and directed growth of neural cells by surface-patterned poly(ethylene glycol) hydrogels // *Biomaterials*. 2009. № 5 (30). C. 721–729.
79. Larsen B., Haug A. Biosynthesis of alginate // *Carbohydrate Research*. 1971. № 2

(17). C. 287–296.

80. Lee K.Y., Mooney D.J. Alginate: Properties and biomedical applications // *Progress in Polymer Science*. 2012. № 1 (37). C. 106–126.

81. Lemoigne M. Produit de deshydratation et de polymerisation de l'acide β -oxybutyrique // *Ann Inst. Pasteur*. 1926. (41). C. 148–165.

82. Leong M.F., Rasheed M.Z., Lim T.C., Chian K.S. In vitro cell infiltration and in vivo cell infiltration and vascularization in a fibrous, highly porous poly(D,L-lactide) scaffold fabricated by cryogenic electrospinning technique // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2009. № 1 (91A). C. 231–240.

83. LeRoux M.A., Guilak F., Setton L.A. Compressive and shear properties of alginate gel: Effects of sodium ions and alginate concentration // *Journal of Biomedical Materials Research*. 1999. № 1 (47). C. 46–53.

84. Löbler M., Saß M., Kunze C., Schmitz K., Hopt U. Biomaterial implants induce the inflammation marker CRP at the site of implantation // *Journal of Biomedical Materials Research*. 2002. № 1 (6). C. 165–167.

85. Macrae R.M., Wilkinson J.F. Poly- β -hydroxybutyrate Metabolism in Washed Suspensions of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium* // *J. gen. Microbiol.* 1958. (19). C. 210–222.

86. Mærk M. Looking for the Big Picture: Genome-Based Approaches to Improve Alginate Production in *Azotobacter vinelandii* 2014. № January.

87. Manchak J., Page W.J. Control of polyhydroxyalkanoate synthesis in *Azotobacter vinelandii* strain UWD // *Microbiology*. 1994. № 4 (140). C. 953–963.

88. Maniatopoulos C., Meleher A., Melcher A., Programme M. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats // *Cell Tissue Res*. 1988. (254). C. 317–330.

89. Maquet V., Jerome R. Design of Macroporous Biodegradable Polymer Scaffolds for Cell Transplantation // *Materials Science Forum*. 1997. (250). C. 15–42.

90. Martins S., Sarmiento B., Souto E.B., Ferreira D.C. Insulin-loaded alginate microspheres for oral delivery – Effect of polysaccharide reinforcement on

physicochemical properties and release profile // *Carbohydrate Polymers*. 2007. № 4 (69). C. 725–731.

91. 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. № 2 (15). C. 171–193.

92. Meyer A. *Practicum der botanischen Bakterienkunde* // Gustav-Fischer. 1903. (2).

93. Moe S.T., Draget K.I., Skjåk-Bræk G., Smidsrød O. Alginates // *Food Polysaccharides and Their Applications*. 1995. C. 245–286.

94. Myshkina V.L., Nikolaeva D.A., Makhina T.K., Bonartsev A.P., Bonartseva G.A. Effect of growth conditions on the molecular weight of poly-3-hydroxybutyrate produced by *Azotobacter chroococcum* 7B // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2008. № 5 (44). C. 482–486.

95. Nam Y.S., Yoon J.J., Park T.G. A novel fabrication method of macroporous biodegradable polymer scaffolds using gas foaming salt as a porogen additive // *Journal of Biomedical Materials Research*. 2000. № 1 (53). C. 1–7.

96. Narayan R. *Encyclopedia of biomedical engineering* / R. Narayan, под ред. R. Narayan, Elsevier Inc., 2019. 281–309 c.

97. Nebe B., Forster C., Pommerenke H., Fulda G., Behrend D., Bernewski U., Schmitz K.-P., Rychly J. Structural alterations of adhesion mediating components in cells cultured on poly- β -hydroxy butyric acid // *Biomaterials*. 2001. № 17 (22). C. 2425–2434.

98. 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. № 3 (183). C. 1047–1057.

99. Nussinovitch A. *Alginates* Boston, MA: Springer US, 1997. 19–39 c.

100. Obika H., Sakakibara J., Kobayashi Y. Direct control of the constituent ratio in a wide range in alginate produced by *Azotobacter vinelandii* // *Biosci Biotechnol Biochem*. 1993. № 2 (57). C. 332–333.

101. Pandey A., Kumar S. Inhibitory effects of *Azotobacter chroococcum* and *Azospirillum brasiliense* on a range of rhizosphere fungi // *Indian Journal of Experimental*

Biology. 1990. (28). C. 52–53.

102. Parente E., Crudele M.A., Ricciardi A., Mancini M., Clementi F. Effect of ammonium sulphate concentration and agitation speed on the kinetics of alginate production by *Azotobacter vinelandii* DSM576 in batch fermentation // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2000. № 5 (25). C. 242–248.

103. Park J.H., Kim D. Preparation and characterization of water-swelling natural rubbers // *Journal of Applied Polymer Science*. 2001. № 1 (80). C. 115–121.

104. Pena, C; Galindo, E; Buchs J. The viscosifying power, degree of acetylation and molecular mass of the alginate produced by *Azotobacter vinelandii* in shake flasks are determined by the oxygen transfer rate Pe_{na} // *Process Biochemistry*. 2011. (46). C. 290–297.

105. Peña C., Castillo T., Núñez C., Segura D. Bioprocess Design: Fermentation Strategies for Improving the Production of Alginate by *Azotobacter vinelandii* 2011. 217–242 c.

106. Peña C., Hernandez L., Galindo E. Manipulation of the acetylation degree of *Azotobacter vinelandii* alginate by supplementing the culture medium with 3-(N-morpholino)-propane-sulfonic acid. // *Letters of Applied Microbiology*. 2006. № 43. C. 200–204.

107. Peña C., Trujillo-Roldán M.A., Galindo E. Influence of dissolved oxygen tension and agitation speed on alginate production and its molecular weight in cultures of *Azotobacter vinelandii* ☆ // *Enzyme and Microbial Technology*. 2000. № 6 (27). C. 390 – 398.

108. Peralta-Gil M., Segura D., Guzmán J., Servín-González L., Espín G. Expression of the *Azotobacter vinelandii* Poly- β -Hydroxybutyrate Biosynthetic *phbBAC* Operon Is Driven by Two Overlapping Promoters and Is Dependent on the Transcriptional Activator *PhbR* // *Journal of Bacteriology*. 2002. № 20 (184). C. 5672–5677.

109. Pettinari M.J., Vázquez G.J., Silberschmidt D., Rehm B., Steinbüchel A., Méndez B.S. Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis genes in *Azotobacter* sp. strain FA8. // *Applied*

- and environmental microbiology. 2001. № 11 (67). C. 5331–4.
110. Pindar B.D.F., Bucke C. The Biosynthesis of Alginate Acid by *Azotobacter vinelandii* // *Biochemical Journal*. 1975. № 3 (152). C. 617–622.
111. Ponticiello M.S., Schinagl R.M., Kadiyala S., Barry F.P. Gelatin-based resorbable sponge as a carrier matrix for human mesenchymal stem cells in cartilage regeneration therapy // *Journal of Biomedical Materials Research*. 2000. № 2 (52). C. 246–255.
112. Pravdyuk A.I., Petrenko Y.A., Fuller B.J., Petrenko A.Y. Cryopreservation of alginate encapsulated mesenchymal stromal cells // *Cryobiology*. 2013. № 3 (66). C. 215–222.
113. Rastogi P., Kandasubramanian B. Review of alginate-based hydrogel bioprinting for application in tissue engineering // *Biofabrication*. 2019. № 4 (11). C. 042001.
114. Remminghorst U., Rehm B.H. Bacterial alginates: from biosynthesis to applications // *Biotechnology Letters*. 2006. № 21 (28). C. 1701–1712.
115. Roy D., Cambre J.N., Sumerlin B.S. Future perspectives and recent advances in stimuli-responsive materials // *Progress in Polymer Science*. 2010. № 1–2 (35). C. 278–301.
116. Sabra W., Zeng A.-P., Sabry S., Omar S., Deckwer W.-D. Effect of phosphate and oxygen concentrations on alginate production and stoichiometry of metabolism of *Azotobacter vinelandii* under microaerobic conditions // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1999. № 6 (52). C. 773–780.
117. Sabra W., Zeng A.-P., Lunsdorf 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. № 9 (66). C. 4037–4044.
118. Sabra W., Zeng A.-P., Deckwer W.-D. Bacterial alginate: physiology, product quality and process aspects // *Applied Microbiology Biotechnology*. 2001. (56). C. 315–325.
119. Salmeron V., Martinez M.V., Gonzalez J. Nitrogen fixation and production of auxins, gibberellins and cytokinin by *Azotobacter chroococcum* strain isolated from root of *Zea mays* in presence of insoluble phosphate // *Chemosphere*. 1990. (20). C. 417–422.

120. Saxena A.K. Synthetic biodegradable hydrogel (PleuraSeal) sealant for sealing of lung tissue after thoracoscopic resection // *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2010. № 2 (139). C. 496–497.
121. Scudiero D.A., Shoemaker R.H., Paull K.D., Monks A., Tierney S., Nofziger T.H., Currens M.J., Seniff D., Boyd M.R. Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines // *Cancer Research*. 1988. № 17 (48).
122. Segura D., Cruz T., Espín G. Encystment and alkylresorcinol production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in poly- β -hydroxybutyrate synthesis // *Archives of Microbiology*. 2003. № 6 (179). C. 437–443.
123. Segura D., Guzman J., Espin G. *Azotobacter vinelandii* mutants that overproduce poly-b-hydroxybutyrate or alginate // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2003. № 2 (63). C. 159–163.
124. Segura D., Vargas E., Espín G. β -Ketothiolase genes in *Azotobacter vinelandii* // *Gene*. 2000. № 1–2 (260). C. 113–120.
125. Senior P.J., Dawes E.A. The regulation of poly β hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii* // *Biochemical Journal*. 1973. № 1 (134). C. 225–238.
126. Sevastianov V.I. Technologies of tissue engineering and regenerative medicine // *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2014. № 3 (0). C. 93.
127. Sikareepaisan P., Ruktanonchai U., Supaphol P. Preparation and characterization of asiaticoside-loaded alginate films and their potential for use as effectual wound dressings // *Carbohydrate Polymers*. 2011. № 4 (83). C. 1457–1469.
128. Singh A., Sharma P.K., Garg V.K., Garg G. Hydrogels: A review // *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 2010. № 2 (4). C. 97–105.
129. Skjak-Bræk G., Grasdalen H., Larsen B. Monomer sequence and acetylation pattern in some bacterial alginates. // *Carbohydrate Research*. 1986. № 1 (154). C. 239–250.
130. Stapp C., Ruschmann G. Zur biologie von *Azotobacter* // *Arb. biol. Reichsanstalt Land-u. Forstwirtschaft., Berlin-Dahlem*. 1924. (13). C. 305–368.
131. Steinbüchel A., Hustede E., Liebergesell M., Pieper U., Timm A., Valentin H.

- Molecular basis for biosynthesis and accumulation of polyhydroxyalkanoic acids in bacteria. // *FEMS microbiology reviews*. 1992. № 2–4 (9). C. 217–30.
132. Sun J., Tan H. Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications. // *Materials (Basel, Switzerland)*. 2013. № 4 (6). C. 1285–1309.
133. Tejera N., Lluch C., Martínez M., González J. Isolation and characterization of *Azotobacter* and *Azospirillum* strains from the sugarcane rhizosphere // *Plant and Soil*. 2005. (27). C. 223–232.
134. Timell T. The acid Hydrolysis of glycosides I. General conditions and the effect of the nature of the aglycone. // *Can J Chem*. 1964. (42). C. 1456–1472.
135. Trujillo-roldan M.A., Segura D., Moreno S., Galindo E., Espin G. Alginate production by an *Azotobacter vinelandii* mutant unable to produce alginate lyase // *Applied Microbiology Biotechnology*. 2003. (60). C. 733–737.
136. Trujillo-Roldan M.A., Moreno S., Espin 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. № 6 (63). C. 742–747.
137. 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. (33). C. 198–208.
138. Venkatesan J., Bhatnagar I., Manivasagan P., Kang K.H., Kim S.K. Alginate composites for bone tissue engineering: A review // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2015. T. 72. 269–281 c.
139. Wang F., Li Z., Khan M., Tamama K., Kuppusamy P., Wagner W.R., Sen C.K., Guan J. Injectable, rapid gelling and highly flexible hydrogel composites as growth factor and cell carriers // *Acta Biomaterialia*. 2010. № 6 (6). C. 1978–1991.
140. Warson H. Modern Superabsorbent Polymer Technology, Edited by F L Buchholz and A T Graham, // *Polymer International*. 2000. № 11 (49). C. 1548–1548.
141. Wayne J.S., McDowell C.L., Shields K.J., Tuan R.S. In Vivo Response of Polylactic Acid–Alginate Scaffolds and Bone Marrow-Derived Cells for Cartilage Tissue Engineering // *Tissue Engineering*. 2005. № 5–6 (11). C. 953–963.

142. Weiner S., Wagner H.D. THE MATERIAL BONE: Structure-Mechanical Function Relations // *Annual Review of Materials Science*. 1998. № 1 (28). С. 271–298.
143. Williams S.F., Martin D.P., Horowitz D.M., Peoples O.P. PHA applications: addressing the price performance issue // *International Journal of Biological Macromolecules*. 1999. № 1–3 (25). С. 111–121.
144. Yates M., Barlow C. Life cycle assessments of biodegradable, commercial biopolymers—A critical review // *Resources, Conservation and Recycling*. 2013. (78). С. 54–66.
145. Yilmazer G., Carrillo A.R., Kokini J.L. Effect of propylene glycol alginate and xanthan gum on stability of oil emulsions // *J. Food. Sci.* 1991. № 56. С. 513–517.
146. Zapata-Vélez A., Trujillo-Roldán M. The lack of a nitrogen source and/or the C/N ratio affects the molecular weight of alginate and its productivity in submerged cultures of *Azotobacter vinelandii*. // *Annals of Microbiology*. 2010. (60). С. 661–668.
147. Zhang H., Cheng J., Ao Q. Preparation of Alginate-Based Biomaterials and Their Applications in Biomedicine // *Marine Drugs*. 2021. № 5 (19). С. 264.
148. Zhang L., Li K., Xiao W., Zheng L., Xiao Y., Fan H., Zhang X. Preparation of collagen–chondroitin sulfate–hyaluronic acid hybrid hydrogel scaffolds and cell compatibility in vitro // *Carbohydrate Polymers*. 2011. № 1 (84). С. 118–125.
149. ZHOU Y., CHEN F., HO S., WOODRUFF M., LIM T., HUTMACHER D. Combined marrow stromal cell-sheet techniques and high-strength biodegradable composite scaffolds for engineered functional bone grafts // *Biomaterials*. 2007. № 5 (28). С. 814–824.
150. Бонарцев А.П., Бонарцева Г.А., Решетов И.В., Кирпичников М.П., Шайтан К.В. Применение полиоксисланоатов в медицине и биологическая активность природного поли-3-оксибутирата // *Acta Naturae (русскоязычная версия)*. 2019. № 2 (41) (11). С. 4–16.