

# Přehled projektů

## Trainee program

### **Příprava mikrovláken z hyaluronanu srážením pomocí vícemocných kationtů**

TRAINEE PROJEKT: Fyzikální chemie a Mikrovlákna

Vedoucí trainee: František Ondreáš, Josef Chmelař

Odborné vedení v oblasti zvlákňování: Lucie Horáčková, Jolana Kubíčková

Délka řešení projektu: 12 měsíců

Hyaluronan (HA) a jeho deriváty jsou slibnými materiály pro přípravu zdravotnických prostředků, zejména v oblasti hojení ran. Vhodnou aplikační formou jsou mimo jiné různé textilní struktury jako nitě nebo pleteniny. Prvním krokem v přípravě těchto forem je tvorba vláken, jejichž vlastnosti musí být vyhovující jak pro následné textilní zpracování, tak pro finální produkt. Ve společnosti Contipro je zavedena příprava mikrovláken metodami mokrého zvlákňování s využitím koagulačních lázní obsahujících alkoholy a organické kyseliny.

V rámci tohoto trainee projektu bude otestován alternativní proces zvlákňování, který bude založený na srážení pomocí kationtů. Cílem bude omezit použití organických rozpouštědel a zároveň do struktury vlákna vnést ionty s výhodnými vlastnostmi, ať již z pohledu biologie nebo struktury vlákna (iontové síťování). V jednom kroku tak bude vlákno nejen připraveno, ale také doplněno o nové funkční vlastnosti. Příkladem zajímavých kationtů jsou  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  nebo  $\text{Zn}^{2+}$ , další mohou být navrženy na základě rešerše, ze které by měla vzejít také vhodná volba aniontů (anorganické i organické, např. chloridy či octany). Kromě užitečných vlastností by měl být brán zřetel také na bezpečnost, tj. vyhnout se iontům toxickým. Kromě anorganických je možné použít také organické kationty s funkčními vlastnostmi jako jsou například antimikrobiální peptidy s vhodnou strukturou nebo kladně nabitě přírodní polyelektrolyty.

Po úvodní rešerši bude následovat laboratorní studium srážení nativní HA a lauroyl derivátu HA pomocí daných iontů v prostředí čistě vodném (pufry) i v prostředí s obsahem alkoholů a/nebo slabých organických kyselin. Sledován bude také vliv koncentrací a molekulové hmotnosti polymeru. Na základě srážecích a reologických experimentů budou vytipovány vhodné kombinace iontů a podmínek, které budou následně použity k přípravě vláken na zvlákňovací lince. Získaná vlákna budou podrobena charakterizaci (mikroskopie, mechanické vlastnosti, textilní zpracovatelnost, obsah iontů a rozpustnost / bobtnání) a postupy upraveny dle výsledků. Takto budou postupně optimalizovány postupy přípravy vybraných vláken.

Posledním krokem bude biologické testování výsledných vláken zaměřené primárně na *in-vitro* bezpečnost (cytotoxicita) a případně též na účinnost, budeme-li nějaký *in-vitro* měřitelný efekt předpokládat (zejména možné antimikrobiální působení – např. u  $Zn^{2+}$ ).

Projekt bude primárně řešen na dvou pracovištích RnD, Fyzikální chemie a Mikrovlákna. Dílčí úkoly ale budou řešeny ve spolupráci s dalšími výzkumnými skupinami.

### **Syntéza definovaných amidů oligosacharidů kyseliny hyaluronové**

Vedoucí: Tomáš Klejch (Modifikace biopolymerů)

Délka: 12 měsíců

Díky své definované struktuře, biokompatibilitě a biologické aktivitě jsou krátké oligomery kyseliny hyaluronové (HA) vhodné pro přípravu aktivních látek. Vhodně zvolenou modifikací lze zvýšit jejich afinitu k cílovým biomolekulám (enzymy, receptory), včetně možnosti kovalentního připojení.

Pro využití takových derivátů v klinických aplikacích je nezbytným předpokladem selektivní derivatizace a vysoká čistota. Dále je nutné zachování biokompatibility a dostatečná stabilita provedené modifikace, aby nedocházelo k příliš rychlé metabolizaci.

Jedním z vhodných způsobů derivatizace je aktivace karboxylových skupin a tvorba relativně stabilní amidické vazby. Podle povahy substituentu lze takto upravit polaritu, zavést fluorescenční značku, sířovací prvek nebo další reaktivní skupinu(y).

V rámci tohoto projektu se trainee bude zabývat optimalizací syntéz oligomerů HA substituovaných přes amidickou vazbu s důrazem na (regio)selektivitu reakcí. Dále se bude zabývat jejich charakterizací (NMR, LC MS, UV-VIS), chromatografickou separací (RP, ionex) a zkoumáním jejich dalšího využití (např. v inhibici enzymů). Projekt bude probíhat na oddělení Modifikace biopolymerů, Farmakokinetika a Fermentace.

### **Hydrofobně modifikované deriváty hyaluronanu jako nosiče vybraných aktivních látek pro topickou protizánětlivou aplikaci**

Vedoucí trainee: František Ondreáš, Kristína Nešporová

Odhadovaná doba: 1 rok

Nosiče aktivních látek představují pokročilou platformu pro řízené doručování ve vodě většinou nerozpustných léčiv na potřebné místo v lidském těle. Deriváty kyseliny hyaluronové byly identifikovány jako jedna z nejperspektivnějších skupin biomateriálů pro topické aplikace. Proto

se zabýváme výzkumem samouspořádání a vázání aktivních látek do hydrofobně modifikovaných derivátů hyaluronanu. V rámci našeho výzkumu jsme narazili na specifickou kombinaci pomocných a aktivních látek, která vedla k řadovému zvýšení vaznosti a stability. Tím získal tento systém vysoký aplikační potenciál. Tento trainee projekt naváže na zmiňovaný výzkum. Zpočátku proběhne literární rešerše za účelem výběru vhodných pomocných a aktivních látek s protizánětlivým účinkem. Bude následovat příprava nosičů a charakterizace jejich struktury pomocí dynamického rozptylu světla, zeta potenciálu, fluorescence a reologie. Množství navázané aktivní látky bude stanoveno pomocí UV-VIS spektroskopie a případně dalších analytických chromatografických metod. Jednou z nejdůležitějších schopností použitého nosičového systému je zprostředkování penetrace do kůže. Ta bude testována ve Franzových celách a vyhodnocena kvantitativně pomocí analytických metod. Navíc budou řezy kůže podrobeny fluorescenční konfokální mikroskopii za účelem lokalizace aktivních látek a sond v rámci různých částí kůže. Při aplikaci mohou nosiče léčiv interagovat s různými látkami. Jako hlavní aplikační vlastnost bude testována protizánětlivá aktivita těchto systémů na modelu prozánětlivě aktivovaných buněk. Vzhledem k zamýšlené topické aplikaci nosičů s aktivní látkou na kůži budou jako model použity aktivované keratinocyty simulující kožní zánět in vitro. Metody stanovení míry zánětu budou zahrnovat qRT-PCR analýza vybraných markerů, dle získaných výsledků je lze doplnit dalšími standardními metodami, např. ELISA cytokinů. Tento trainee projekt poskytne příležitost navrhnout vlastní reálný systém s potenciálem pomoci lidem s kožními problémy zahrnujícími zánět. Očekává se, že do trainee projektu bude zahrnuta oblast fyzikální chemie, nosičů léčiv, fyziologie buňky a analytiky. To zaručí setkání s různými oblastmi výzkumu v CONTIPRO a umožní výběr preferovaného směru budoucího zaměření.

### **Zavedení kultivace MSC v laboratorním bioreaktoru**

Vedoucí: Kristina Nešporová (Fyziologie buňky)

Délka: 9 měsíců

Kmenové buňky jsou stálíci nově vyvíjených terapeutických postupů v regenerativní medicíně. O jejich léčebném účinku lze uvažovat také v hojení chronických ran či popálenin a terapii akutních či chronických onemocnění šlach a chrupavek. Jednou z limitací podobných terapeutických postupů je nutnost standardizovaně připravovat velké množství buněk v intervalu několika dní až týdnů. Zavedení dynamické kultivace MSC v laboratorní bioreaktoru bude prvním krokem k navýšení kapacity přípravy kmenových buněk či jejich produktů (např. sekretomu) pro jejich terapeutické využití v regenerativní medicíně. Léčba kmenovými buňkami si typicky žádá minimálně desítky až stovky milionů buněk v jedné léčebné dávce a

příprava podobného množství buněk v 2D systému kultivačních lahví je náročná na materiál, přístrojové vybavení i lidskou práci. Dynamická kultivace v bioreaktoru navíc umožňuje efektivnější distribuci živin a kyslíku, což může podporovat růst buněk snižovat environmentální stres a např. indukci senescence MSC.

Trainee v rámci své stáže bude optimalizovat kultivační podmínky pro mesenchymální kmenové buňky (zvířecí a/nebo lidské izolované z tukové tkáně nebo kostní dřeně či dentální pulpy) v laboratorním bioreaktoru. Cílem bude dosáhnout kontinuální kultivace MSC po dobu minimálně 10 dní, při zachování fenotypu MSC (minimálně povrchové markery stanovené pomocí FCM) a viability buněk (> 70 %). Součástí optimalizace bude výběr vhodných nosičů buněk (komerčně dostupných), složení kultivačního média (variace standardního aMEM) a obsah FBS. Po dokončení optimalizace kultivačních podmínek bude následovat fáze ověření použitelnosti takto připravených kmenových buněk pro jejich potenciální terapeutické aplikace. Tyto downstream procesy budou zahrnovat jejich řízenou diferenciaci, kryoprezervaci a znovu obnovení po minimálně 30 dnech zamražení s opakovaným ověřením jejich vlastností.

### **Vliv kombinace antiseptik jódu a oktenidinu na jejich účinnost a toxicitu**

Vedoucí: Vojtěch Pavlík (Fyziologie buňky)

Délka: 5 měsíců

V praxi léčby ran jsou často kombinovány prostředky obsahující různá antiseptika. Mohou tak vznikat deriváty antiseptik, které se budou chovat jinak, než je specifikováno, což může zhoršit hojení. Je známo, že kombinace některých antiseptik vede k tvorbě viditelné sraženiny, případně dochází ke změně barvy nebo dokonce vývinu plynu (Campbell et al. 2017).

Co se týče našich produktů pro léčbu ran obsahujících oktenidin nebo jód, lékaři také vznášejí dotazy k možnosti vzniku nežádoucích efektů při kombinacích s jinými antiseptiky. Proto je cílem navrhovaného tématu prozkoumat vliv kombinace antiseptik oktenidinu, jódu a chloramidu hyaluronanu s jinými běžně dostupnými antiseptiky (polyhexanid, chlorhexidin, NaOCl, stříbrné ionty a nanočástice, triklosan) na jejich antimikrobiální účinnost (mikrodiluční metoda, případně antibiofilmová účinnost) a cytotoxicitu (MTT metoda, keratinocyty a fibroblasty). Cytotoxicita u kombinací s jódem a oktenidinem bude také zhodnocena na finálních prostředcích (Hyiodine, Sorelex) a bude určen vliv přítomnosti hyaluronanu na případné snížení toxicity. Pokud budou pozorovány interakce oktenidinu nebo jódu s jinými antiseptiky, je možné pokračovat v projektu fyzikálně-chemickou charakterizací reakcí a vzniklých produktů.

#### Literatura:

Campbell ST, Goodnough LH, Bennett CG, Giori NJ. Antiseptics Commonly Used in Total Joint Arthroplasty Interact and May Form Toxic Products. *J Arthroplasty*. 2018 Mar;33(3):844-846. doi: 10.1016/j.arth.2017.10.028. Epub 2017 Nov 11. PMID: 29137898.

Zubko EI, Zubko MK. Co-operative inhibitory effects of hydrogen peroxide and iodine against bacterial and yeast species. *BMC Res Notes*. 2013 Jul 15;6:272. doi: 10.1186/1756-0500-6-272. PMID: 23856115; PMCID: PMC3716994.

### **Metabolomické profilování *Streptococcus zooepidemicus***

Vedoucí: Matěj Šimek (Farmakokinetika)

Délka: 4 měsíce

pozn.: práce bude probíhat ve výzkumných skupinách Fermentace a Farmakokinetika

Jedná se o multioborové téma spojující biotechnologie, analytickou chemii a bioinformatiku. Bakteriální kmeny *Streptococcus zooepidemicus* jsou základem biotechnologické výroby kyseliny hyaluronové. Při fermentačním procesu bakterie zpracovávají nutrienty přítomné v živném médiu na širokou škálu metabolitů skrze řadu metabolických drah. Na konci jedné z těchto drah je konečným produktem kyselina hyaluronová. Proces její výroby a aktivity jednotlivých metabolických drah může být ovlivňován řadou faktorů (teplota, míchání, přítomnost nutrientů, genová výbava bakterie apod.). Tyto parametry ovlivňují nejen množství získané kyseliny hyaluronové, ale i její kvalitativní parametry jako např. molekulovou hmotnost. Pro opakovatelnost fermentačního procesu je nutné porozumět tomu, jak jednotlivé parametry fermentačního procesu ovlivňují metabolické dráhy v buňkách a jakých metabolických drah se jednotlivé nutrienty účastní.

Cílem práce v rámci trainee stáže bude zavést metodu pro charakterizaci metabolomu bakterií při různých parametrech fermentačního procesu. K tomuto účelu budou využity metody metabolomiky a fluxomiky zahrnující značení nutrientů nezářivými izotopy (např.  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) a analytické metody využívající techniky vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (Orbitrap).

## **Proteomické profilování *Streptococcus zooepidemicus***

Vedoucí: Matěj Šimek (Farmakokinetika)

Délka: 4 měsíce

pozn.: práce bude probíhat ve výzkumných skupinách Fermentace a Farmakokinetika

Bakteriální kmeny *Streptococcus zooepidemicus* jsou základem biotechnologické výroby kyseliny hyaluronové. Při fermentačním procesu bakterie zpracovávají nutrienty přítomné v živném médiu na širokou škálu metabolitů skrze řadu metabolických drah. Na konci jedné z těchto drah je konečným produktem kyselina hyaluronová. Schopnost tvorby bakterie produkovat kyselinu hyaluronovou a aktivita jednotlivých metabolických drah je kontrolována řadou enzymů. Struktura a funkce enzymů je pak zakódována v genetické informaci bakterie. Pro fermentační proces může být výhodné určitou část této informace pozměnit a dosáhnout tak např. jiné struktury enzymů, jež mohou vést k vyšší energetické efektivitě procesu nebo vyšším výtěžkům kyseliny hyaluronové. Cílem práce bude zavést metodiku pro proteomické mapování vybraných proteinů z přibližně dvou tisíc proteinů obsažených v bakterii *Streptococcus zooepidemicus*. Smysl takové metodiky spočívá v kontrole přepisu upravené genetické informace na aminokyselinovou sekvenci daných proteinů, která nemusí být vždy stoprocentně otisknuta ve finálním proteomu. K tomuto účelu bude využito proteomických technik jako je fingerprinting proteinů a zejména pak peptidové mapování využívající techniky vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (Orbitrap).