

## **Interakce střevní sliznice s hyaluronanem**

Skupina: Fyziologie buňky/Fyzikální chemie

Vedoucí: Kristina Nešporová

Délka: 12 měsíců

V regenerativní medicíně je hyaluronan (HA) často podáván perorálně a v případě slizničních aplikací ve střevě se také uvažuje o aplikaci přímo na sliznici během laparoskopických a jiných zákroků. Vzhledem k specifickým vlastnostem střevní sliznice (topografie, peristaltika a slizniční hlen) však není známo, jak materiály či molekuly HA a jeho derivátů s tímto povrchem interagují, zda dostatečně adherují či dokonce po rozpuštění pronikají do sliznice či hlubších vrstev.

Úkolem trainee bude charakterizovat povrch střevní sliznice modelových organismů a tkáňových kultur pomocí histologických a proteomických metod (dle potřeby optimalizovat tyto metody pro tento typ tkáně) a následně detekovat mukoadhezivitu a penetraci HA a HA-derivátů v různých formách tímto povrchem. Výsledkem bude predikce délky setrvání HA materiálů při střevních aplikacích a informace o možnosti využití těchto materiálů v regenerativní medicíně.

## Syntéza biologicky aktivních látek na bázi oligosacharidů kyseliny hyaluronové

Skupina: Modifikace biopolymerů

Vedoucí: Tomáš Klejch

Délka: 12 měsíců

Polymerní kyselina hyaluronová je díky své biokompatibilitě, odbouratelnosti a blahodárným účinkům ideálním výchozím materiálem pro přípravu léčivých substancí a prostředků. Její vlastnosti lze ještě vylepšit vhodnou chemickou modifikací. Příkladem je acylace<sup>1</sup> mastnými kyselinami, které HA dávají amfifilní charakter, nebo chlorace<sup>2</sup> amidové skupiny, díky které může mít HA antimikrobiální účinky. Díky těmto modifikacím lze deriváty použít například jako nosiče léčiv. Vzhledem k práci s polymery lze tímto způsobem těžko připravit chemická individua, připravené látky se liší distribucí substituce i molekulovou hmotností.

Jedním z možných řešení přípravy definovaných látek s vlastnostmi HA je deprivatizace jejích oligosacharidů. Ty si zachovávají některé vlastnosti polymerní HA (například biokompatibilitu, snadnou odbouratelnost, afinitu k receptorům HA), v jiných se ale dramaticky liší (angiogeneze, ovlivnění zánětu...). Jejich působení je také silně závislé na jemných změnách struktury oligosacharidu, kterou lze v porovnání s polymerem snáze modifikovat selektivně.

Cílem tohoto projektu bude příprava chemicky modifikovaných oligosacharidů HA. Nativní oligosacharidy budou derivatizovány pomocí metod organické syntézy, včetně fotochemických reakcí. Takto připravené látky budou izolovány chromatografickou separací (RP, ionex) a charakterizovány pomocí pokročilých NMR a MS technik. Dále bude zkoumána jejich biokompatibilita a biologické působení.

Projekt bude probíhat primárně na oddělení Modifikace biopolymerů s možností zapojení oddělení Farmakokinetika a Fyzikální chemie.

<sup>1</sup> Huerta-Ángeles, G., et al.: Retinoic acid grafted to hyaluronan for skin delivery: Synthesis, stability studies, and biological evaluation. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 231, 115733.

<sup>2</sup> Buffa, R., et al.: Hyaluronic acid chloramide-Synthesis, chemical structure, stability and analysis of antimicrobials. *Carbohydrate polymers*, 2020, 250, 116928.

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

Skupina: Farmakokinetika

Vedoucí: Matěj Šimek

Délka: > 4 měsíce

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).

## **Peptidomické profilování zdrojů dusíků pro kultivaci *S. zooepidemicus***

Skupina: Farmakokinetika

Vedoucí: Matěj Šimek

Délka: > 4 měsíce

Bakteriální kmeny *Streptococcus zooepidemicus* jsou základem biotechnologické výroby kyseliny hyaluronové. Při fermentačním procesu bakterie zpracovávají nutrienty v živném médiu na širokou škálu metabolitů skrze řadu metabolických drah. Na konci jedné z těchto drah je konečným produktem kyselina hyaluronová. *S. zooepidemicus* vyžaduje pro svůj optimální růst a zajištění buněčných procesů mnoho růstových faktorů, aminokyselin a polypeptidů. Ty jsou v kultivačním médiu zpravidla zajištěny přidavkem komplexních zdrojů dusíku (např. proteinovými hydrolyzáty). Jelikož se N-zdroje připravují různými výrobními procesy štěpení proteinů z živočišných i neživočišných zdrojů, vykazují často také rozdílný vliv na fermentační proces. Cílem této práce je vypracovat metodologii pro peptidomické profilování N-zdrojů, která by umožňovala suroviny vzájemně porovnávat, a to jak od různých dodavatelů, tak i mezi šaržemi dané suroviny v rámci kontroly kvality. Peptidomický profil každé testované suroviny bude dán do vztahu k produktivitě HA za daných kultivačních podmínek. Metodologie by tak podle analýzy peptidomu měla umožnit kontrolu kvality N-zdrojů i jejich rychlejší a méně nákladný screening pro fermentační proces produkce hyaluronanu. K tomuto účelu bude využito proteomických technik jako je fingerprinting proteinů a zejména pak peptidové mapování využívající techniky vysokoúčinné kapalinové chromatografie, nanoprůtokové kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (Orbitrap).

## **Optimalizace média pro mikrobiální produkci kyseliny hyaluronové**

Skupina: Fermentace  
Vedoucí: Matouš Čihák  
Délka: 12 měsíců

Bakteriální kmeny *Streptococcus zooepidemicus* jsou produkčním systémem biotechnologické výroby kyseliny hyaluronové. Streptokok v průběhu fermentačního procesu zpracovává živné médium do velkého množství metabolitů. Jedním z nich je i kyselina hyaluronová, která streptokokovi poskytuje ochranný buněčný obal. *S. zooepidemicus* je kultivačně náročný mikroorganismus a v médiu vyžaduje přítomnost některých esenciálních živin. Ty mohou být součástí komplexních zdrojů dusíku či uhlíku. Protože jsou tyto suroviny různého původu a připravují se rozdílnými postupy, vykazují odlišné složení a mají jedinečný nepředvídatelný vliv na fermentaci. Cílem této práce je charakterizace vybraných komplexních surovin z hlediska jejich využití při optimalizaci média pro produkci kyseliny hyaluronové. Tato práce zahrnuje mikrobiální techniky, peptidomické profilování a konvenční i moderní optimalizační techniky. Srovnávací analýza optimalizačních technik umožní určit nejvhodnější strategii pro návrh a úpravu fermentačního média, a to s cílem dosahovat zefektivnění produkce. Kromě výběru nejvhodnější strategie optimalizace média, by měl být vypracován také postup pro laboratorní kontrolu kvality komplexních surovin a jejich screening.

## **Příprava enzymů pro prodej na e-shopu**

Skupina: Fermentace

Vedoucí: Jana Jílková

Délka: 6 měsíců

Hyaluronan je polysacharid s molekulovou hmotností vyšší než 1 MDa. Snižování molekulové hmotnosti hyaluronanu lze provést enzymaticky, pomocí hyaluronidáz a hyaluronan lyáz. Tyto enzymy lze použít i pro analytické účely ve výzkumu derivátů hyaluronanu. Existuje několik typů hyaluronidáz a hyaluronan lyáz, které se vzájemně liší kromě jiného reakčním mechanismem, délkou nejkratšího produktu reakce a taky tím, jaký druh monosacharidu se nachází na koncích řetězce produktů. Několik druhů hyaluronidáz a hyaluronan lyáz je pro výzkumníky komerčně dostupných, například hovězí enzym BTH, nebo lyáza ze *Streptomyces hyalurolyticus*. V minulosti jsme v naší laboratoři zavedli postupy pro přípravu několika rekombinantních hyaluronidáz a hyaluronan lyáz, z nichž některé nejsou na trhu typově zastoupené. Trainee projekt bude stavět na výsledcích našeho výzkumu. Úkolem trainee bude získání dat a příprava podkladů potřebných pro uvedení vybraného enzymu na trh. Součástí práce bude příprava několika šarží enzymu s cílem ověřit opakovatelnost postupu kultivace, ale i purifikace. Kultivace bude probíhat ve fermentorech s objemem 30L. Při purifikaci enzymu budeme používat kapalinovou chromatografii. V definovaných časových intervalech bude ověřovaná stabilita enzymu. Kromě práce v laboratoři trainee vypracuje ve spolupráci s dalšími odděleními bezpečnostní list, specifikaci enzymu, příbalovou informaci a další potřebnou dokumentaci.

## **Příprava nano- a mikrovláken z hyaluronanu s aktivními farmaceutickými látkami**

Skupina: Mikrovlákna

Vedoucí: Tomáš Medek

Délka: 6 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 nano- a mikrovláknenné struktury, které jsou ve společnosti Contipro připravovány technologiemi dry spinning (suché zvlákňování) a solution blow spinning. V rámci tohoto trainee projektu bude otestováno obohacení těchto vláknenných forem o další aktivní farmaceutické látky, zejména o ty s antimikrobiálními účinky.

Po úvodní rešerši bude následovat ověření vhodnosti stávajících analytických metod pro vybrané látky, případně budou navrženy a zavedeny metody nové. Následně bude testována materiálová kompatibilita vybraných látek a na jejím základě budou navrženy vhodné metody inkorporace těchto látek do vláken z hyaluronanu. Tyto metody budou dále optimalizovány s ohledem na ztrátovost a opakovatelnost procesu, homogenitu obsahu antimikrobiálních látek, kinetiku jejich uvolňování v modelovém prostředí, sterilizovatelnost a mechanické vlastnosti výsledné formy. Posledním krokem bude testování stability a biologické testování výsledných vláken zaměřené primárně na in-vitro antimikrobiální účinky, a případně též na bezpečnost (cytotoxicitu).

Projekt bude primárně řešen na pracovišti podskupiny Mikrovlákna. Dílčí úkoly ale budou řešeny ve spolupráci s dalšími výzkumnými skupinami.

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

Skupina: Fyzikální chemie a Mikrovlákna

Vedoucí: František Ondreáš, Josef Chmelař

Odborné vedení v oblasti zvlákňování: Lucie Horáčková, Jolana Kubíčková

Délka: 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.

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  $\text{Zn}^{2+}$ ).

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



## **Vývoj směsných filmů s obsahem hyaluronanu pro hojení komplikovaných ran**

Skupina: Filmy

Vedoucí: Jiří Mrázek

Délka: 6 měsíců

Naše výzkumná skupina se zabývá vývojem samonosných filmů z hyaluronanu a jeho derivátů. Tyto filmy jsou určeny pro aplikace v medicíně, zejména jako zdravotnické prostředky. Primární využití filmů je v oblasti hojení ran, díky své biokompatibilitě se mohou uplatnit také jako vstřebatelné implantáty.

Náplní projektu bude příprava filmů z derivátů hyaluronanu ve směsi s jinými polymery. Na úvod bude provedena rešerše zaměřená na vytipování vhodných polymerů, případně i charakterizačních metod. Účelem přidavku dalšího materiálu může být například dosažení vyšší pevnosti filmu, ovlivnění adheze filmu ke tkáním, úprava doby degradace nebo i zlevnění produktu při zachování jeho užitečných vlastností. Přidané polymery mohou mít také biologické účinky, např. hemostatické či antiseptické. Kromě přípravy filmů se bude trainee podílet také na jejich fyzikální a chemické charakterizaci (homogenita filmů, bobtnavost, mechanické vlastnosti v suchém i hydratovaném stavu, kinetika degradace) a na interpretaci získaných výsledků.