

Náměty pro postgraduální studium v rámci „Institutu pro studium lékařských nanobiotechnologií“ realizované ve spolupráci s Farmaceutickou fakultou UK v Hradci Králové

1. Studium a optimalizace fyzikálně-chemických a mechanických vlastností hydrogelů na bázi hyaluronanu

Student by se v rámci postgraduálního studia zabýval studiem fyzikálně-chemických a mechanických vlastností hydrogelů na bázi chemicky modifikovaných hyaluronanu, jejich přípravou a optimalizací vlastností ve vztahu k jejich zamýšlené medicínské aplikaci. Dále studiem faktorů ovlivňujících jejich finálních vlastnosti *in-vitro* a *in-vivo* a optimalizací vlastností v rámci biodegradability těchto hydrogelů a jejich interakce s vybranými buněčnými liniemi. Profil vhodného uchazeče předpokládá znalosti z oboru chemie materiálů, polymerní chemie, fyzikální chemie, fyzikální chemie polymerů a reologie popř. bioreologie.

Konzultant: Ing. Lucie Wolfová, Ph.D.

2. Využití nanovláknenných materiálů pro lékařské prostředky

Ve své práci by se student zabýval přípravou a charakterizací nanovláknenných prostředků určených pro několik typů využití v lékařství. Nanovláknena budou připravována metodou elektrostatického zvlákňování na základě studia vybraných materiálových a roztokových vlastností na bázi kyseliny hyaluronové. Vyrobené materiály budou podrobně charakterizovány pomocí chemických analytických metod a testovány biologické vlastnosti. Tato problematika je široce interdisciplinární a předpokládá znalosti a zájem uchazeče o obory jako je fyzikální chemie, biologie, farmacie, materiálové inženýrství a nanotechnologie v obecném smyslu.

Konzultant: Ing. Jana Růžičková, Ph.D.

3. Vývoj originálních metod na síťování hyaluronanu ve vodě

Síťování hyaluronanu je proces, který je hodně používán při přípravě omezeně rozpustných, biokompatibilních a biodegradovatelných materiálů aplikovatelných v tkáňovém inženýrství. Vzhledem k finální aplikaci by samotný síťovací proces měl probíhat ve vodě, v podmínkách pokud možno blízkých podmínkám fyziologickým. Jako síťovací činidla je možné použít bifunkční nebo multifunkční linkery, které budou mít dostatečnou reaktivitu na uskutečnění reakce minimálně ve dvou stupních. Při výběru potenciálních metod je nutné zvážit také toxicitu použitých sloučenin. Přístupy, které používají větší množství vysoce toxických látek, nejsou z důvodu možné aplikace *in situ* přijatelné. Navržené řešení by mělo být originální a patentovatelné.

Konzultant: Mgr. Radovan Buffa Ph.D.

4. Studium homogenity distribuce derivátů hyaluronanu

Student by se zabýval studiem distribuce modifikovaných skupin u derivátů hyaluronanu. Strukturální analýza derivátů polysacharidů je náročné a v posledních letech mnoho diskutované téma. I když progres v charakterizaci látek je pozorován na všech strukturálních úrovních (monomer, polymer, supramolekulární architektura), dodnes jsou výsledky naměřené v rámci sady porovnatelných vzorků typicky prezentovány jako „více heterogenní“, „méně rozpustné“, „lépe dosažitelné pro enzymy“ atd. Cílem disertační práce je popsat distribuci substituentů v řetězci derivátů

hyaluronanu a také to, jak je tato distribuce ovlivněna způsobem a podmínkami provedení modifikační reakce. To vše ale musí být úzce spojeno s optimalizací vlastností připravených derivátů ve vztahu k jejich zamýšlené medicínské aplikaci. Tato problematika je široce interdisciplinární a předpokládá znalosti a zájem uchazeče o obory jako je fyzikální a analytická chemie, statistika, biologie a farmacie.
Konzultant: Mgr. Martina Hermannová, Ph.D.

5. Metabolismus hyaluronanu v průběhu hojení rány

V procesu hojení dochází k intenzivnímu metabolismu extracelulární matrix obecně. Hyaluronan jako jeho významná složka podléhá degradaci vlivem působení reaktivních forem kyslíku, které vznikají v ráně v důsledku poranění, a dále je katabolizován enzymem hyaluronidázou (HYAL). Jeho syntéza je naopak zajištěna činností hyaluronan syntázy (HAS). V buňce existují čtyři isoformy enzymu HYAL (HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4) a tři isoformy enzymu HAS (HAS1, HAS2 a HAS3). V obou případech enzymy vykazují jak různou afinitu k hyaluronanu, tak různou míru aktivity. Isoformy enzymu HAS jsou schopny produkovat hyaluronan o různé molekulové hmotnosti. Naopak, HYAL enzymy jsou schopny degradovat nativní hyaluronan na různě velké molekuly. Navíc, patogeny přítomné v ráně také mohou mít aktivní enzym HYAL a dále přispívat k degradaci hyaluronanu. V průběhu hojení se v ráně vyskytuje hyaluronan o různých molekulových hmotnostech v rozpětí MDa až po jednotky kDa. Cílem této práce bude popsat změny exprese a aktivit výše zmíněných enzymů během hojení rány, zaměřit se na způsoby regulace exprese a aktivity těchto enzymů. Ověřit předpoklad, zda i samotný hyaluronan má schopnost regulovat svůj vlastní metabolismus.

Konzultant: Ing. Lucie Vištejnová

6. Role hyaluronanu v angiogenezi

Angiogeneze představuje proces tvorby nových cév ze stávající vaskulatury a má významnou roli při hojení rány, kdy zajišťuje prokrvení a přívod živin do nově vznikající tkáně. Angiogeneze je stimulována řadou faktorů, jako jeden z klíčových je uváděn VEGF. V posledních letech jsou oligosacharidy hyaluronanu zmiňovány v souvislosti s podporou angiogeneze. Cílem práce bude vytvořit model pro studium angiogeneze *in vitro* a zaměřit se na studium role oligosacharidů hyaluronanu na tento proces. Bude sledována migrace endoteliálních buněk, jejich proliferace a schopnost vytvářet novou vaskulaturu.

Konzultant: Ing. Lucie Vištejnová

7. Hyaluronový pericelulární obal buněk

Buňky jsou obecně v tkáni obklopeny extracelulární hmotou (ECM), která jim vytváří trojrozměrné prostředí. V některých případech jsou buňky schopny vytvářet kolem sebe hustý obal tvořený polysacharidy a jinými polymery nazývaný pericelulární obal. Mezi buňky, které tento obal produkují, patří fibroblasty či chondrocyty a hlavní složkou obalu je hyaluronan. Náplní této práce bude popsat stavy, za kterých buňky pericelulární obal vytváří a jaký význam tento obal pro buňku má. U fibroblastů je zmiňována souvislost hyaluronového obalu s jejich migrací. Obal by měl soužit k prvotnímu kontaktu buňky s okolním prostředím a měl by buňce napomáhat se orientovat v prostoru. Bude zkoumána možná souvislost hyaluronového obalu s aktivací buněk, s přenosem signálu z extra- do intracelulárního prostoru a jejich stimulaci k migračnímu chování.

Konzultant: Ing. Lucie Vištejnová

8. Vliv hyaluronanu na buněčnou migraci

Migrace buněk je významná v mnoha buněčných procesech jako je embryogeneze, hojení rány či stárnutí tkání. Migrace buněk je realizována za pomoci interakcí buněk s extracelulární hmotou (ECM). Předpokládá se, že hyaluronan jako složka extracelulární matrix hraje roli v migraci buněk, zejména imunitních buněk, fibroblastů, keratinocytů a endoteliálních buněk. Práce se bude zabývat studiem mechanismu migrace u kožních buněk (fibroblasty, keratinocyty) se zaměřením na receptory hyaluronanu (CD44, RHAMM, layilin) a dalších složek extracelulární matrix (integriny, cadheriny), která se účastní migrace buněk. Bude se hledat spojení mezi přenosem signálu z vnějšího prostředí a zahájením procesu migrace v buňce, tj. změna v organizaci cytoskeletonu. Důležitým předpokladem práce bude vyvinout vhodný model, na kterém půjde migraci buněk studovat (různé varianty migrace přes membrány, scratch wound assay, navození stresového prostředí rány).

Konzultant: Ing. Lucie Vištejnová

9. Role receptorů hyaluronanu

Hyaluronan jako složka extracelulární matrix (ECM) a jako molekula účastnící se buněčných procesů je buňkami specificky rozpoznáván pomocí receptorů. Nejčastěji zmiňovaný je receptor CD44 vyskytující se na povrchu celé škály buněk od imunitních a po buňky kůže. Specifikem tohoto receptoru je, že se může vyskytovat v mnoha transkripčních variantách, což má vliv i na rozpoznávací schopnost vůči hyaluronanu. Dalšími receptory jsou RHAMM a layilin. RHAMM je protein vyskytující se jak na povrchu buněk, tak v intracelulárním prostoru. Je opět exprimovaný v celé škále buněk, především však v imunitních buňkách a ve fibroblastech. Layilin je poměrně nově identifikovaný receptor hyaluronanu, podobně jako CD44 se nachází v buněčné membráně a propojuje extracelulární prostor s intracelulárním skeletem. Receptory CD44 a RHAMM jsou spojovány s četnými buněčnými procesy jako je migrace buněk, přenos signálu z vnějšího prostředí pomocí extra a intracelulární matrix, angiogeneze, a dále s procesy embryogeneze, stárnutí či hojení ran. Cílem této práce bude prozkoumat roli receptorů hyaluronanu u kožních buněk fibroblastů a keratinocytů. Zaměřit se na roli interakcí receptorů a hyaluronanu v procesech proliferace a migrace.

Konzultant: Ing. Lucie Vištejnová

10. Význam molekulové hmotnosti hyaluronanu ve fyziologii buněk

Četné studie naznačují, že hyaluronan vykazuje různé účinky na buněčné procesy v závislosti na jeho molekulové hmotnosti (MW). Je známo, že oligosacharidy hyaluronanu pozitivně podporují angiogenezi, proces důležitý například během hojení rány. Naopak, vysokomolekulární hyaluronan tyto účinky nevykazuje. Cílem této práce bude zjistit, jakou roli hraje MW hyaluronanu v jeho signalizačních schopnostech. Bude třeba zvolit vhodný buněčný model, který bude citlivý k hyaluronanu, a zaměřit se na interakce hyaluronanu s jeho receptory (RHAMM, CD44, layilin). Budou zmapovány procesy, ve kterých hyaluronan s různou MW vykazuje odlišné efekty.

Konzultant: Ing. Lucie Vištejnová

11. Vliv látek na produkci a aktivitu degradačních enzymů působících v procesu hojení rány

V procesu hojení rány dochází vlivem enzymů k degradaci složek extracelulární hmoty (ECM; hyaluronan, kolagen, fibrin, fibronektin, elastin). Jako degradační enzymy se nejčastěji uplatňují matrixmetalloproteinasy. Degradace ECM je do určité míry žádoucí, ale pokud je jí nadbytek, dochází ke vzniku chronické rány, ve které nedochází ke tvorbě granulační tkáně a následnému zhojení. Cílem této práce bude vybrat nejdůležitější degradační enzymy účastníci se tohoto procesu a zavést model, který by umožňoval analýzu produkce a aktivity degradačních enzymů. Dále bude následovat výběr a otestování látek, které by mohly vykazovat inhibující účinek na produkci či aktivitu výše zmíněných degradačních enzymů.

Konzultant: Ing. Lucie Vištejnová

12. Vliv vybraných látek na produkci složek extracelulární matrix

Složky extracelulární matrix (kolagen, elastin, glykosaminoglykany, fibronektin) jsou důležité komponenty procesu hojení ran, kdy dochází k jejich degradaci i syntéze. Pro správný průběh hojení je nutná rovnováha mezi degradací a syntézou těchto makromolekul, která není vždy zajištěna, což může vést až ke vzniku chronické rány. Cílem této práce bude navrhnout a otestovat látky, které by mohly pozitivně podpořit tvorbu složek ECM, a tím přispívat ke správnému průběhu hojení akutní i chronické rány.

Konzultant: Ing. Lucie Vištejnová

13. Vytipování a sledování exprese genů ovlivňujících syntézu kyseliny hyaluronové ve *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* pomocí technologií DNA-čipů a real-time PCR

DNA čip je technologie umožňující molekulárně-biologické analýzy výrazně paralelního rázu, především analýzu exprese genů. Pomocí této metody by bylo možné provádět celogenomové porovnání jednotlivých kmenů *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (SEZ) a tím zjistit, jak změny v genomu (bodové mutace, delece apod.) ovlivňují intenzitu syntézy hyaluronanu. Technologie DNA čipů je také účinným nástrojem pro sledování metabolických změn v průběhu kultivace. Pro přesnější určení kvantitativních změn exprese jednotlivých genů by byla využita real-time PCR analýza. Cíle dizertační práce je navržení designu DNA čipu, vytipování genů ovlivňujících syntézu hyaluronanu pomocí DNA čipu, sledování aktivity vytipovaných genů pomocí real-time PCR a porovnání celogenomové exprese různých kmenů SEZ.

Konzultant: Mgr. Marcela Tlustá

14. Production, characteristic and biological activity of low molecular weight beta-1.3/1.6-glucan schizophyllan

Schizophyllan, a high molecular weight polysaccharide consisting of a backbone of beta-1,3-linked D-glucopyranosyl residues bearing branches of single beta-1,6-linked D-glucopyranosyl residues, is elaborated extracellularly by *Schizophyllum commune* fungus. It exhibits a potent host-mediated antitumor activity, but the preparation and administration for clinical uses are difficult because of high viscosity of its aqueous solutions. Schizophyllan molecular weight can be decreased by means of various physical and chemical methods. However, little information is available on biological activity of the resulting low molecular weight fragments. Within the research there will be studied different methods of low molecular weight schizophyllan production,

physical, chemical properties of the substance will be described, and biological activity will be characterised.

Konzultant: Mgr. Dzianis Smirnou, Ph.D.

15. Věkem podmíněná nepravidelná pigmentace kůže a možnosti jejího ovlivnění

Fotoprotektivní funkce pigmentace zprostředkovaná fyziologickým barvivem melaninem syntetizovaným v kožních melanocytech je zásadní pro zdraví a funkčnost lidské kůže. Jednou z nejvíce patrných změn na lidské kůži spojenou se stárnutím je její nepravidelná pigmentace. Projevuje se nepravidelným střídáním světlých téměř nepigmentovaných oblastí s místy tmavými hyperpigmentovanými zvanými *lentigo*. Podle některých odborných prací se tento problém ve větší či menší míře dotýká až devadesáti procent světové bělošské populace starší padesáti let. Korektivní kosmetika, pomineme-li značnou technickou náročnost, řeší sice estetickou stránku věci, nicméně opomíjí funkční důsledky nepravidelné pigmentace kůže, mezi něž patří zejména snížená ochrana proti ultrafialovému záření. Tato práce proto bude zaměřena na studium mechanismů nepravidelné kožní pigmentace a vyhledávání a sledování účinků látek zasahujících do procesu syntézy, degradace a distribuce melaninu a umožňujících tak kausální přístup k řešení problematiky věkem podmíněné nepravidelné pigmentace kůže.

Konzultant: Mgr. Tomáš Muthný, Ph.D.

16. Charakterizace epidermálního stárnutí na molekulární úrovni a možnosti jeho ovlivnění

Epidermis je vrchní vrstva kůže tvořená převážně buněčnou složkou, konkrétně keratinocyty. Je hranicí mezi organismem a jeho vnějším prostředím. Zabraňuje nadbytečným únikům vody kůží, umožňuje prostup plynům, a naopak chrání před negativními vlivy okolí. Nezanedbatelná je rovněž funkce estetická. Všechny tyto funkce jsou však s přibývajícím věkem narušeny. Podíl na tom má jak genetická výbava jedince tak kumulativní poškození vnějšími vlivy. To vede například k rozvoji mírného chronického zánětu v epidermis se všemi důsledky včetně narušení výše zmíněných epidermálních funkcí. Všechny změny ve stárnoucí epidermis lze však tímto způsobem vysvětlit stěží. Tato práce se proto bude věnovat sledování rozdílů v genové a proteinové expresi v epidermis v závislosti na věku. Dalším cílem pak bude na základě získaných výsledků navrhnout a ověřit možnosti pozitivního ovlivnění těchto změn.

Konzultant: Mgr. Tomáš Muthný, Ph.D.

17. Charakterizace dermálního stárnutí na molekulární úrovni a možnosti jeho ovlivnění

Dermis je střední vrstva kůže tvořená z větší části extracelulární hmotou, která je produkována hlavním typem dermálních buněk, a sice fibroblasty. Dermis poskytuje kůži zejména její mechanické vlastnosti, ale představuje zároveň výživovou a komunikační základnu pro epidermis, hraje významnou roli v procesu termoregulace, ovlivňuje celkový vzhled kůže, atd. Tyto vlastnosti jsou do značné míry dány houbovitou vysoce organizovanou strukturou extracelulární hmoty, jejíž hlavní složkou jsou kolagenová a elastinová vlákna. V průběhu stárnutí však dochází k disregulaci produkce, degradace a organizace jednotlivých složek dermis a následně k narušení jejich funkcí. Děje se tak jak na úrovni produkčních fibroblastů, tak na úrovni například oxidativního poškození vlivem vnějších negativních faktorů. Tato práce se proto zaměří na sledování a charakterizaci těchto změn na proteinové a

mRNA úrovni jakož i na výzkum možností zmírnění negativních projevů stárnutí v dermis.

Konzultant: Mgr. Tomáš Muthný, Ph.D.

18. Senilní hyperkeratinizace kůže a možnosti jejího ovlivnění

Keratinizace je fyziologický proces, který umožňuje lidské kůži plnit jednu z jejích nejdůležitějších funkcí, a sice funkci bariérovou. Proces keratinizace začíná v nejhlubších vrstvách epidermis, kde nově vzniklé keratinocyty začínají diferencovat v korneocyty. Mírou diferenciací je v tomto případě syntéza vláknitého proteinu keratinu, který propůjčuje buňkám pevnost a odolnost, tedy vlastnosti zásadní pro plnění bariérové funkce. V průběhu diferenciací keratinocyty pasivně migrují směrem k povrchu kůže, kde už jako plně diferencované korneocyty tvoří nejsvrchnější bariérovou vrstvu kůže, stratum corneum. V poslední životní fázi korneocyty odumírají a jsou odstraněny z povrchu kůže při procesu deskvamace. Průběh keratinizace je s přibývajícím věkem nadměrně stimulován, čehož výsledkem je suchá praskající kůže se sníženými bariérovými schopnostmi. Cíleně zvýšená hydratace kůže, ač schopná proces senilní hyperkeratinizace pozitivně ovlivnit, má své limity. Cílem této práce tak bude výzkum mechanismů senilní hyperkeratinizace a vyhledávání a ověřování látek schopných normalizovat věkem narušenou proliferaci, diferenciaci, apoptózu a deskvamaci keratinocytů resp. korneocytů lidské kůže.

Konzultant: Mgr. Tomáš Muthný, Ph.D.

19. Nosičové systémy léčivých látek na bázi hyaluronanu

Celá řada látek s léčivými účinky vykazuje velmi nízkou rozpustnost jak ve vodném tak i fyziologickém prostředí. Pro farmaceutické účely lze parametr rozpouštění ovlivňovat požadovaným směrem různými metodami při současném zachování původní aktivity léčivé látky. Jedním ze způsobů může být inkorporace léčiva do nosičového systému. Cílem práce bude navrhnout a připravit vhodné nosičové systémy na bázi hyaluronanu, charakterizovat je z hlediska množství inkorporované látky, jejího uvolňování a samotné stability nosičového systému. Profil vhodného uchazeče předpokládá znalosti z oboru fyzikální a makromolekulární chemie a dále základní orientaci v oblasti analytické chemie a farmacie.

Konzultant: Ing. Daniela Šmejkalová, Ph.D.

20. Studium bioadhezivních vlastností, disolučních charakteristik vybraných látek a kinetiky biodegradace nano a mikrovláknenných nosičů biologicky aktivních látek na bázi derivátů hyaluronanu

V dnešní době se vedle klasických nosičů biologicky aktivních látek, jako jsou například liposomy či různé nanočástice, začínají uplatňovat i nano a mikrovláknenné struktury připravované z různých materiálů. Zcela specifickou skupinou jsou vláknenné struktury připravené z chemicky modifikovaného biopolymeru hyaluronanu, u kterého lze řídit dobu degradace a různé fyzikální parametry výsledných vláken a z nich připravených struktur. Cílem práce bude prozkoumat výše uvedené vlastnosti ve vztahu k použitému způsobu modifikace, stupni substituce derivátu, charakteru vlákna a způsobu zpracování do výsledné textilní struktury a vyvodit z nich závěry, které by dovolovaly cílený vývoj různých typů nosičových struktur pro externí i interní medicínské aplikace. Na základě získaných poznatků navrhnout a vyvinout aplikaci pro abdominální chirurgii.

Konzultant: RNDr. Vladimír Velebný, CSc.