**Témata diplomových prací firmy Contipro pro FCH VUT**

začátek laboratoří oboru I v letním semestru 2024, obhajoba v LS 2025

v případě zájmu kontaktujte prof. Pekaře

**Studium interakcí hyaluronanu s jeho receptory s využitím biosenzorických systémů**

Vedoucí práce: Ing. František Ondreáš, Ph.D.

Konzultant: Ing. Eliška Švecová

Moderní a neustále se rozvíjející biosenzorické systémy nabízí možnost unikátního způsobu sledování kinetiky a rozsahu afinitních reakcí různorodých biomolekul a buněk na molekulární úrovni. Jedna ze sledovaných molekul je při experimentu ukotvena k povrchu biosenzoru, zatímco druhá molekula proudí nad povrchem. Při jejich interakci dochází ke změně měřené fyzikálně-chemické veličiny, jež danou interakci charakterizuje. Zaznamenávané veličiny mohou být různé a determinují princip fungování takového biosenzoru. V této práci budou využity QCM (quartz crystal microbalance) a OWLS (optical waveguide lightmode spectroscopy) biosenzorické systémy.

Principy a mechanismy interakcí hyaluronanu (HA) a jeho derivátů s receptory jsou dlouhodobým předmětem vědeckého bádání. Pochopení těchto interakcí má výrazný dopad na využití HA materiálů v různých aplikacích, včetně cíleného doručování léčiv. Náplní této práce proto bude vývoj a optimalizace QCM a OWLS metod využívajících modifikované biosenzory, které budou v real-time uspořádání tuto afinitní interakci zaznamenávat. Prvním krokem bude provedení a ověření chemické modifikace povrchu biosenzoru za účelem kotvení požadovaných molekul. V dalším kroku bude monitorována a vyhodnocována kinetika a velikost interakce mezi HA derivátem a příslušným receptorem. Bude studován vliv fyzikálně-chemických parametrů na tuto interakci (pH, teplota, iontová síla) a výsledky korelovány s dalšími fyzikálně-chemickými technikami vhodnými pro sledování afinitních interakcí.

**Charakterizace hyaluronanu pomocí technik SEC-MALS a AF4-MALS**

Odpovědný školitel/konzultant: Ing. Matěj Šimek Ph.D.

Kyselina hyaluronová je přírodní lineární polysacharid, který nachází své uplatnění v řadě oblastech medicínského výzkumu. Přes relativně jednoduchou strukturu má tento polymer vykazuje tento polymer řadu různých chemickofyzikálních a biologických vlastností, tyto vlastnosti jsou odvozeny od délky hyaluronového řetězce, respektive od molekulové hmotnosti. Přesné stanovení molekulové hmotnosti a dalších parametrů jako viskozita, polydisperzita apod. jsou tak pro medicínský výzkum kyseliny hyaluronové klíčové. Gelová permeační chromatografie ve spojení s detekcí pomocí víceúhlového rozptylu světla je nejmodernější technikou a zároveň zlatým standardem k charakterizaci polymerů. Pro charakterizaci biopolymerů však nemusí být technika chromatografické separace ve všech případech vhodná. Pokud je polymer velké molekulové hmotnosti a může se při průchodu chromatografickou kolonou „trhat“ což zkresluje výsledek stanovení molekulové hmotnosti. Pro studium biopolymerů tak lze využít i techniku frakcionace tokem (AF4), kde k „trhání“ polymeru nedochází. Navíc tato technika umožňuje i studium makromolekul obecně a charakterizaci různých protein-protein, polymer-protein, polymer-polymer interakcí. V rámci diplomové práce by byla vyvinuta metodika pro charakterizaci různých forem hyaluronanu pomocí AF4-MALS a tato metodika by pak aplikována pro stanovení molekulové hmotnosti hyaluronanu a charakterizaci komplexů hyaluronanu s proteiny.

**Zvlákňování hyaluronanu pro medicínské aplikace**

Konzultant: Ing. Lenka Piskláková

Nanovlákenné vrstvy na bázi hyaluronanu (HA) jsou vhodné pro medicínské aplikace – např. hojení ran, protože nanovlákenná forma se na ráně rozpustí a tvoří gel, který významně přispívá k hojení rány. Převedení hyaluronanu do formy nanovláken pomocí elektrostatického zvlákňování však není přímočaré. Vodný roztok hyaluronanu vykazuje fyzikální vlastnosti, které nejsou slučitelné s tvorbou bezdefektních nanovláken. Proto se pro přípravu nanovlákenných vrstev s hyaluronanem používají tzv. vláknotvorné polymery, které jsou zpravidla komerčně dostupné a upravují roztokové parametry jako je viskozita, elektrická vodivost, povrchové napětí a umožňují tak převedení hyaluronanu do nanovlákenné formy. Polyvinylpyrrolidon (PVP) a polyvinylalkohol (PVA) jsou ve vodě rozpustný polymer, který je využíván jak ve farmaceutických aplikacích, tak pro přípravu nanovláken. Je tak vhodným materiálem právě pro tvorbu směsných, hydrofilních nanovláken. Biologická funkčnost takové nanovlákenné matrice v procesu hojení ran může být podpořena přidáním přírodních biomolekul do struktury – např. exosomy. Taková nanovlákenná vrstva by při aplikaci a přechodu na gel zvýšila atraktivitu pro žádoucí buněčnou proliferaci a urychlila tak hojící proces. Cílem diplomové práce je provedení rešerše problematiky zvlákňování HA/PVP s biomolekulárními aditivy, náplní praktické části pak bude příprava kompozic na bázi HA/PVP s biomolekulami, která bude poskytovat bezdefektní nanovlákenné vrstvy s dobrou výtěžností vláknícího procesu. Součástí práce bude i charakterizace morfologie a solubilních vlastností připravených nanovlákenných vrstev a otestování buněčné proliferace v porovnání s nanovlákennou vrstvou bez biomolekul.

**Nové přístupy při elektrostatickém zvlákňování kyseliny hyaluronové**

Konzultant: Ing. Kristýna Skuhrovcová

Spojení nanovlákenné formy a kyseliny hyaluronové (HA) přináší inovativní pohled do oblasti pokročilých biomateriálů. Ty nacházejí své využití na poli kosmetiky, dermatologie nebo regenerativní medicíny. Efektivní technologií, jak HA biopolymerní nanovlákna připravovat, je proces elektrostatického zvlákňování (ES). Klíčovým krokem, pro předpoklad stabilního a produktivního procesu vláknění je vhodně navržené složení zvlákňovacího roztoku. Polymerní roztok, na který je aplikováno vysoké napětí, má totiž své specifické nároky na fyzikálně-chemické parametry, které přímo ovlivňují konkrétní fyzikální veličiny, jako je elektrická vodivost, povrchové napětí, či viskozita. Právě rovnováhou mezi zmíněnými veličinami lze získat vzhledné nanovlákenné vrstvy. Roztoky hyaluronanu na vodné bázi jsou však z důvodu zapletení volných řetězců a rozložení elektrického náboje pro ES problematické. Výhodným řešením je obohacení vodného roztoku hyaluronanu aditivy, která přirozeně zvyšují elektrickou vodivost roztoku. Takovými látkami mohou být např. komplexy solí, nebo nízkomolekulární polymery, které mohou ve finální nanovlákenné vrstvě zastat jak procesně funkční roli, tak zároveň mohou nést benefity spojené s finální aplikací, např. minerální výživa pleti, efektivní hojení ran, senzorická funkce. Cílem diplomové práce bude návrh složení zvlákňovacích roztoků, včetně jejich fyzikálně-chemické analýzy, ověření jejich zvláknitelnosti a finálně příprava nanovlákenných vrstev – vše na bázi kyseliny hyaluronové s přídavkem komplexů solí/nízkomolekulárních polymerů. Součástí práce bude i zhodnocení efektivity a vlivu typu aditiv na zvlákňovací proces, rozpustnost nanovláken a jejich morfologii.

**Olejové emulze s aktivními látkami stabilizované hydrofobními deriváty hyaluronanu pro biomedicínské aplikace**

Vedoucí práce: Ing. František Ondreáš, Ph.D.

Konzultant: Ing. Jaroslav Sita

Materiály z hydrofobně modifikovaného hyaluronanu (H-HA) jsou díky svému amfifilnímu charakteru schopné v kombinaci s olejovou fází tvořit emulze. Hydrofilní shell z hyaluronanu zachovává pro vzniklé emulze pozitivní vlastnosti hyaluronanu (biokompatibilita, zlepšená penetrace do kůže, …), graftované hydrofobní řetězce stabilizují olejovou fázi. Oleje zajišťují vysokou rozpustnost hydrofobních aktivních látek a samy mají pozitivní účinky na lidské tělo. Kombinace H-HA s oleji se proto jeví nadějně pro kosmetické a farmaceutické formulace.

V rámci této práce budou připraveny emulze z H-HA o různém typu substituce (C18:1, C12, …) a molekulové hmotnosti v kombinaci s vybraným olejem. Velikost a stabilita částic tvořících emulzi bude korelována s dalšími fyzikálně-chemickými vlastnostmi (např. mezifázovým napětím olej-vodná fáze). Pro různé aplikace může být vhodná různá velikost částic tvořících emulzi, která by se měla dát řídit pomocí molekulové hmotnosti H-HA. Bude provedena rešerše na použití vhodných v oleji rozpustných aktivních látek (např. karotenoidy). Vybrané (ideálně fluorescenční) látky budou rozpuštěny v oleji, který bude přidán k H-HA a bude sledována stabilita připravených systémů. Pomocí konfokálního fluorescenčního mikroskopu bude ověřena schopnost H-HA dopravit aktivní látku do kůže či sliznice. V neposlední řadě bude stanovena biologická aktivita připravených systémů (např. antioxidační aktivita pomocí DPPH testu, …). Získané základní poznatky pomohou k pochopení chování systému H-HA-olej a budou využité při následném aplikovaném vývoji.

**Proteomické profilování *Streptococcus zooepidemicus***

Odpovědný školitel/konzultant: Ing. Matěj Šimek Ph.D.

Bakterie kmenu *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 zooepidermicus.* Smysl takové metodiky spočívá v kontrole přepisu upravené genetické informace na aminokyselinovou sekvenci daných proteinů, která se 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).

**Metabolomické profilování kůže pomocí LC-MS**

Odpovědný školitel/konzultant: Ing. Matěj Šimek Ph.D.

Správná hydratace pleti je jedním z hlavních cílů kosmetických přípravků. Hydratace kůže je zajištěna především přítomností hygroskopických molekul, které jsou společně označovány jako přirozený hydratační faktor. Tyto látky jsou vysokoúčinnými humektanty schopnými vázat vodu i v extrémně suchém prostředí. Tato diplomová práce se zaměřuje na vývoj analytické metody pomocí techniky vysokoúčinné kapalinové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií (Orbitrap) pro stanovení nízkomolekulárních látek, které jsou spojeny s hydratací kůže. Přirozený hydratační faktor je složen z různých aminokyselin a jejich derivátů (močovina, kyselina glutamová, urokanová kyselina atd.), anorganických solí, cukrů a laktátu různého původu. Cílem této práce je vyvinout metodu pro charakterizaci složek přirozeného hydratačního faktoru ve vzorcích odebraných metodou tape stripping. Vyvinutá metoda pak bude aplikována na reálné vzorky odebrané v rámci některé z kosmetických studií prováděných ve firmě Contipro.