



Institut Ruđer Bošković punih deset godina u nanobiotehnoškom istraživanju Jadrana

|| M. Blažina*

Institut Ruđer Bošković
G. Paliaga 5
52 210 Rovinj

Od prvog značajnijeg sudjelovanja Instituta Ruđer Bošković u nanobiotehnoškom istraživanju morskih organizama u sjevernom Jadranu prošlo je već punih deset godina. U tom razdoblju uspješno je ostvareno kroz okvirne programe Europske unije (FP6 i FP7) šest velikih znanstveno-istraživačkih projekata, od kojih su tri upravo u provedbi.

Temelji aktivnosti vezanih uz istraživanje genoma i fiziologije morskih spužava na Institutu Ruđer Bošković datiraju još iz 1970. godine, kada se u Centru za istraživanje mora u Rovinju osniva zasebna Grupa za molekularnu biologiju morskih organizama, koja 1971. prerasta u Laboratorij za morsku molekularnu biologiju – suradnički laboratorij IRB-a i Sveučilišta u Mainzu. Pod vodstvom dr. Rudolfa Zahna u Rovinju se razvijaju metode izolacije i određivanja DNA, RNA i proteina spužvi, a paralelno se razvija i uvodi nova poluautomatska metoda za registraciju sadržaja i svojstava nepoznatih DNA. Kao stalni suradnici u tom Laboratoriju rade zajedno istraživači Instituta Ruđer Bošković i SR Njemačke. Od samih početaka u Laboratoriju radi i dr. Werner Müller, a unazad deset godina kao glavni istraživač svih suradnih projekata ove dvije institucije.

Spužve su još prije mnogo desetljeća prepoznate kao važan izvor bioaktivnih spojeva te novih potencijalnih proizvoda za primjenu u medicini, farmaciji, kozmetici i prehrani. Iako jednostavne, kroz evolucijski proces od 7 mil. godina, razvile su niz učinkovitih biokemijskih mehanizama i spojeva s nebrojenim mogućnostima primjene u humanoj terapiji. Iako su idealan modelni organizam za istraživanja u plavoj biotehnologiji, još uvijek su iznimno slabo istražene i upotrijebljene na komercijalnoj skali.

Projektom SPONGES (FP6) započeli smo suradnju s još šest sveučilišnih instituta diljem Europe, četiri male/srednje tvrtke (SME) i jednim krajnjim korisnikom s ciljem nadgradnje primijenjenih biotehnoških istraživanja morskih spužava u industrijsku proizvodnju utemeljenu na razvojnim aktivnostima malih i srednjih tvrtki. Postignut je velik napredak u razumijevanju fiziologije spužava s ciljem održivog uzgoja, bez pritiska na prirodne populacije.

Premda je održiva proizvodnja spužava u akvakulturi na industrijskoj skali još uvijek izazov, projektom je razvijena tehnologija

* Dr. sc. Maria Blažina, znanstvena suradnica u Centru za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković
e-pošta: mblazina@irb.hr

IRB Institut Ruđer Bošković



Slika 1 – Spužva *Dysidea avara* (Schmidt 1862.), živi u Sredozemnom moru

održive proizvodnje dvije bioaktivne komponente: *avarola* (izoliranog iz spužve *Dysidea Avara*, slika 1) i *silikateina* (izoliranog iz spužve *Suberites domuncula*, slika 2), u dovoljnoj mjeri za predtržišna istraživanja.

Pomoću rezultata projekta SPONGES razvijena je linija kozmetičkih proizvoda (slika 3) na bazi bioaktivnih spojeva iz morskih spužava, a do predtržišne faze doveden je i novi kozmetički proizvod, Eleana – krema na bazi *avarola*, pogodna za iziritiranu kožu, s umirujućim i protuupalnim svojstvima. Projekt je rezultirao i značajnim napretkom u istraživanjima Crambescidin 800 i njegove potencijalne primjene u antitumorskim lijekovima.

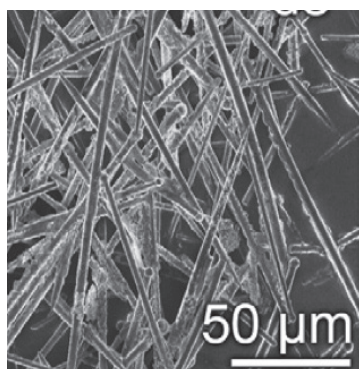


Slika 2 – Spužva *Suberites domuncula* (Olivi 1792.), obično obrasta puževu kućicu u kojoj je nastanjen rak samac, s kojim živi u simbiozi



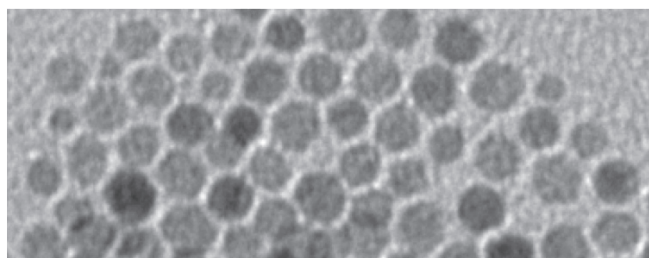
Slika 3 – Kozmetička linija Elana na bazi bioaktivnih spojeva iz morskih spužava

Daljnijim radom na projektima BIOCAPITAL (FP6-MOBILITY) i BIOMINTEC (FP7-PEOPLE) uspostavljena je multidisciplinarna mreža biologa, kemičara i IT stručnjaka s ciljem sustavne potrage za korisnim bioaktivnim spojevima iz morskih beskralješnjaka, protuobraštajnih, antibakterijskih, antiviralnih, citostatičkih te biomineralizacijskih svojstava. Najznačajniji rezultati postignuti su u području enzimatskih procesa depozicije biogenog silicija, te primjene silikateina s drugim materijalima poput titana i cirkonija. Konstruirana je i baza podataka za sve proteine uključene u proces biomineralizacije kalcijeva karbonata u metazoa. Zahvaljujući katalitičkoj aktivnosti silikateina, po prvi put su pri blagim fiziološkim uvjetima sintetizirani organometalni nanokompoziti različitih metalnih oksida sa slojevitom, tzv. Core-Shell strukturom sličnom staklastim spikulama spužava (slika 4). Time su se otvorili horizonti k mnoštvu primjena u medicini, poput zamjene ili regeneracije koštanog, hrskavičnog ili vezivnog tkiva.



Slika 4 – SEM prikaz spikula staklaste strukture u primorfima spužve *S. domuncula* (izvor: Müller i sur. 2011)

Cilj projekta CORESHELL (FP7) je proizvesti enzimatski aktivne nanočestice s metalno-oksidnom jezgrom (slika 5). Nanočestice na čijoj površini je imobiliziran enzim (npr. Mn, Cu-oksidaza, silikatein) mogu naći primjenu u izolaciji teških metala iz onečišćenih izvora vode u okolišu. Daljnjom biomineralizacijom već funkcionaliziranih nanočestica, uz pomoć rekombinantnog silikateina, nastaju čestice s jezgrom od željeznog oksida i više plašteva različitih metalnih oksida. Tako strukturirane Core-Shell nanočestice imaju visoke mogućnosti primjene u nanomedicini, u prijenosu lijekova u organizmu.



Slika 5 – SEM prikaz funkcionaliziranih čestica Fe_2O_3 sa slojem silikateina

Za razliku od većih čestica, nanočestice posjeduju ekstremno veliku funkcionalno aktivnu površinu. To svojstvo daje im iznimnu ekonomsku prednost prilikom primjene u procesnoj tehnologiji. Primjerice, obećavajuća je primjena Ti-Fe-nanočestica u razvoju fotoindukcijsko-fotokatalitičkih metoda mikrobiološkog pročišćavanja otpadnih voda (Müller, 2014).

Sredinom 2012. godine lansiran je veliki kolaborativni projekt ukupne vrijednosti 8 mil. EUR punog naziva "Exploiting marine genomics for an innovative and sustainable European blue biotechnology industry" (BLUEGENICS, EU FP7-KBBE). Projektom BLUEGENICS namjera je multinacionalnog konzorcija sastavljenog od osam partnera iz akademskog sektora, šest malih ili srednjih poduzeća i jedne neprofitne biotehnoške istraživačko-razvojne organizacije, identificirati i omogućiti primjenu genetskog otiska morskih organizama poput dubokomorskih spužava i pridruženih bakterija, s ciljem proizvodnje spojeva od biomedicinskog značaja. Nakon svih ovih godina, projektom BLUEGENICS, po prvi put se konzorciju pridružila i farmaceutska razvojna tvrtka (SME) iz Hrvatske – Fidelta d. o. o.

Već su prethodna istraživanja pokazala da je bioaktivne spojeve moguće sintetizirati primjenom rekombinantne molekularne biologije. Primjerice, *defensin*, obrambeni peptid koji proizvode spužve, posjeduje svoju biološku aktivnost i kada je proizveden rekombinantnom tehnikom, u bakterijama ili eukariotskim stanicama. Takav pristup omogućava održivu uporabu bioloških resursa mora i oceana, bez negativnog učinka na bioraznolikost. Pregrišt učinkovitih sekundarnih metabolita s antiviralnim, antibiotskim ili citotoksičnim djelovanjem izolirano je iz morskih spužava, te je pitanje vremena mogućnost njihove primjene u borbi protiv neželjenih biofilмова i obraštaja. Primjerice, izoliran je gen odgovoran za ekspresiju ASABF-peptida (eng. "Ascaris suum antibacterial factor") iz spužve *S. Domuncula* te je pokazana njegova *in vitro* jako izražena antibakterijska aktivnost prema Gram-pozitivnim (*S. aureus*, *Bacillus subtilis* i *Micrococcus luteus*) te nešto slabija prema Gram-negativnim (*Pseudomonas aeruginosa* i *E. coli*) bakterijama (Wiens i sur., 2011). Daljnji pokusi na morskim organizmima na mezo-skali pokazali su visoku protuobraštajnu aktivnost ASABF-peptida, te ukazali na potencijal primjene u tehnologijama zaštite brodova, plutača, naftnih platformi i drugih struktura u moru od obraštanja morskim organizmima. Mehanizmi antibakterijske i protuobraštajne aktivnosti utemeljeni su na analognim biokemijskim principima te skriveni u obrambenim strategijama i simbiozama morskih organizama. Razumijevanjem procesa kojim se organizam brani od obraštaja, odnosno kolonizacije, primarno bakterija u biofilmu, a potom viših obraštajnih organizama, zahtijeva multidisciplinarni pristup biologa, fizičara i kemičara. Nadalje, nužno je temeljna saznanja primjenom nanotehnologije i biotehnologije primijeniti u razvoju naprednih biomimetičkih rješenja; protuobraštajnih premaza, ciljanih (pametnih) antibiotskih lijekova itd.

Jedan od osnovnih ciljeva projekta BLUEGENICS je identifikacija te izgradnja baze peptida/proteina s ciljanim bioaktivnim karakteristikama poput neuroprotektivne, antimikrobne, anti-aging, anti-osteoporotske te imuno – supresivne aktivnosti. Uz pomoć naprednih molekularno-bioloških i kemijskih tehnika razvit će se

metode brze identifikacije poznatih spojeva. Izgradnjom metagenomske DNA baze te pretraživanjem genoma spužava omogućit će se stjecanje uvida u gene od komercijalnog interesa, kodirajući za enzime/proteine uključene u biosintezu/biotransformaciju molekula s potencijalom terapijske ili biotehnoške primjene. Naposljetku, otkrivanjem trodimenzionalne strukture bioaktivnih peptida, očekuje se uspješno sintetiziranje njihovih analoga, razvoj i optimizacija fermentacijskog proizvodnog procesa te potencijalno uvođenje u prekliničke studije.

Na posljetku, nanotehnologija je značajno prisutna u mnogim industrijskim granama, a primjena nanočestica učestala je u mnoštvu područja: kozmetici, farmaciji, medicini, prehrambenoj tehnologiji i dr. Kao odgovor na rastući trend prisutnosti nanočestica u svakodnevnom životu i okolišu EU je lansirala još jedan projekt SMART-NANO (FP7), u svrhu razvoja tehnološke platforme za mjerenje nanočestica, s krajnjim ciljem praćenja prijenosa nanočestica tijekom njihove primjene. Znanstvenici Centra za istraživanje mora rade na razvoju jeftinih i učinkovitih metoda specifično prilagođenih radu na kompleksnim okolišnim matricama (*Stipić i sur.*, 2015).

Velikom dijelom budućnost razvoja naprednih materijala leži u plavoj biotehnologiji. Odgovori na mnoga pitanja današnjice skriveni su u morima i oceanima, a za njihovo održivo gospodarenje nužno je razumijevanje ekoloških procesa te nove metode identifikacija promjena u ekosustavu mora. Da sinergija između znanstveno-istraživačkih instituta i gospodarskog sektora nudi posebnu dodanu vrijednost, prepoznali su još prije deset godina Institut Ruđer Bošković, Sveučilište u Mainzu i mnogi partneri koji su nam se u međuvremenu pridružili. U narednom projektnom razdoblju, osim produbljenja postojećih suradnji, potrebno je i

stvaranje novih modernijih i otvorenijih modela suradnje, posebice vezanih uz razvojne potrebe malih i srednjih poduzetnika u Hrvatskoj i regiji.

Literatura

1. W. E. G. Muller, X. Wang, M. Wiens, U. Schlossmacher, K. P. Jochum, H. C. Schröder, Hardening of bio-silica in sponge spicules involves an aging process after its enzymatic polycondensation: Evidence for an aquaporin-mediated water absorption, *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*. **1810** (7) (2011) 713–726, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.04.009>.
2. M. Wiens, H. C. Schröder, M. Korzhev, X. Wang, R. Batel, W. E. G. Müller, Inducible ASABF-Type Antimicrobial Peptide from the Sponge *Suberites domuncula*: Microbicidal and Hemolytic Activity in Vitro and Toxic Effect on Molluscs in Vivo, *Mar. Drugs* **9** (2011) 1969–1994, doi: <http://dx.doi.org/10.3390/md9101969>.
3. W. E. G. Müller, T. Link, Q. Li, H. C. Schröder, R. Batel, M. Blažina, V. A. Grebenjuk, X. Wang, A novel TiO₂-assisted magnetic nanoparticle separator for treatment and inactivation of bacterial contaminants in aquatic systems, *RSC Adv.* **4** (2014) 48267–48275, doi: <http://dx.doi.org/10.1039/C4RA09055A>.
4. F. Stipić, G. Pletikapić, Ž. Jakšić, L. Frkanec, G. Zgrablić, P. Burić, D. M. Lyons, Application of Functionalized Lanthanide-based Nanoparticles for the Detection of Okadaic Acid-Specific Immunoglobulin G, *J. Phys. Chem. B* **119** (4) (2015) 1259–1264, doi: <http://dx.doi.org/10.1021/jp506382w>.

Znanstveni projekt “Razvoj fotokatalitičkih polimernih nanokompozita za obradu otpadnih voda”

|| Z. Hrnjak Murgić*

Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
Zavod za polimerno inženjerstvo i
organsku kemijsku tehnologiju
Savska c. 16/II, 10 000 Zagreb

Uvod

Znanstveni projekt “Razvoj fotokatalitičkih polimernih nanokompozita za obradu otpadnih voda” ili na engleskom “*Development of Photocatalytic Polymer Nanocomposites for Wastewater Treatment*” (DePoNPhoto) istraživački je projekt (IP-11-2013-5092) koji financira *Hrvatska zaklada za znanost* za razdoblje od četiri godine (1. rujna 2014. – 31. kolovoza 2018.). Budući da je projekt interdisciplinarni, uključeni su i istraživači, eksperti iz različitih znanstvenih područja i to iz područja sinteze polimera i iz područja pročišćavanja otpadnih voda. Istraživači s Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu su

dr. sc. Ljerka Kratožil Krehula, dr. sc. Zvonimir Katančić, doktorandica Vanja Gilja, mag. ing. oecoling. zaduženi za sintezu polimernog nanokompozita s katalitičkim djelovanjem, zajedno s voditeljom projekta prof. dr. sc. Zlatom Hrnjak-Murgić. U rad projekta uključena je profesorica dr. sc. Jadranka Travaš-Sejdić sa Sveučilišta u Aucklandu, kao ekspert iz područja vodljivih polimera. Ekspert iz područja pročišćavanja otpadnih voda naprednim oksidacijskom procesima je dr. sc. Igor Peternel s Sveučilišta u Karlovcu te docentica dr. sc. Anita Ptiček Siročić s Geotehničkog fakulteta u Varaždinu Sveučilišta u Zagrebu. Da bi se projekt uspješno realizirao, bilo je nužno nabaviti određenu specifičnu opremu, kao i čitav niz druge nužne laboratorijske opreme. Od značajnije opreme kupljen je simulator sunčevog zračenja te uređaj za dobivanje ultra-čiste vode. Ostali očekivani značajni doprinosi realizacije projekta DePoNPhoto su zapošljavanje jednog doktoranda i jednog postdoktoranda, realizacija doktorskog rada i više diplomskih i završnih radova, čime je omogućeno obrazovanje mladih znanstvenika i studenata. Očekuje se objavljivanje većeg broja znanstvenih radova kojima će se znatno doprinijeti razvoju i modernizaciji znanosti i tehnologije u Hrvatskoj iz navedenih znanstvenih područja.

* Prof. dr. sc. Zlata Hrnjak Murgić
e-pošta: zhrnjak@fkit.hr

