

Závěrečná zpráva projektu specifického výzkumu zakázka č. 2109

Název projektu: Vývoj insekticidů založených na inhibici cholinesteras

Specifikace řešitelského týmu

Odpovědný řešitel: Mgr. Veronika Hrabcová

Studenti doktorského studia na PřF UHK: Mgr. Veronika Hrabcová

Studenti magisterského studia na PřF UHK:

Další výzkumní pracovníci: prof. Ing. Kamil Kuča, Ph.D.

Celková částka přidělené dotace: 99 000 Kč

Stručný popis postupu při řešení projektu (max. 2 strany).

Na začátku projektu jsme se zaměřili na výběr vhodného zdroje hmyzí acetylcholinesterasy (AChE). Na základě informací z literatury a dostupnosti v České republice byla jako zdroj AChE zvolena moucha domácí (*Musca domestica*).

Následně byl vyvinut a optimalizován postup pro přípravu homogenátu z muších hlav. Pro naše potřeby bylo homogenizováno 30 hlav v 2 ml 0,1 M fosfátovém pufru, pH 7,4 s obsahem 10 % tritonu X-100. Takto připravený homogenát byl následně zbaven pevných částí centrifugací a Ellmanovou metodou v něm byla prokázána aktivita acetylcholinesterasy.

Protože homogenát obsahuje kromě AChE také další proteiny a lipofilní látky, bylo pro naše potřeby nutné AChE purifikovat. K tomuto účelu jsme využili principu afinitní chromatografie. Jako sorbent nám posloužila Sepharosa 6B s navázanou epoxy skupinou, která byla modifikována inhibitorem acetylcholinesterasy a umístěna v malé kolonce. Pro vyvázání enzymu ze získaného afinitního sorbentu jsme vyzkoušeli dva přístupy, eluci pomocí nadbytku substrátu a pomocí inhibitoru takrinu. Ukázalo se, že eluce takrinem je problematická, protože i po následné dialýze inhibované AChE se nám nepodařilo získat aktivní enzym. Důvodem byla pravděpodobně silná vazba inhibitoru v aktivním místě. Proto jsme přistoupili k vytěšňování enzymu navázaného na sorbent substrátem AChE acetylcholinem. Byly použity koncentrace 15 mM, 20 mM a 30 mM acetylcholin jodidu, největší výtěžky byly pozorovány u 30 mM koncentrace. Při další práci s izolovaným enzymem byla zjištěna nízká stabilita purifikované AChE a omezená životnost Sepharosové kolonky.

Došlo tedy k úpravě postupu při zpracování homogenátu, který byl předčištěn před aplikací na afinitní kolonku filtrací. Dále bylo přistoupeno k pravidelnému čištění kolonky 6 M guanidin hydrochloridem, kdy se nám podařilo její životnost prodloužit. Zachování stability a aktivity purifikované AChE je však dále předmětem optimalizace metody.

Velká časová náročnost izolace a malé množství zpracovaného objemu homogenátu nás vedlo k myšlence využití flash chromatografie pro zpracování většího objemu homogenátu a tím i získání většího množství AChE. Při přenosu metodiky a práci s většími objemy jsme se potýkali s vysokým tlakem v systému, který byl způsobeným nízkou pórovitostí a tím i prostupností našeho sorbentu pro homogenát. Přistoupili jsme tedy k výraznému zkrácení kolony, snížení průtoku mobilní fáze avšak problém se tím nepodařilo vyřešit.

Ve druhé fázi mého specifického výzkumu mělo být na čistém enzymu provedeno hodnocení inhibitorů cholinesteras na bázi derivátů takrinu a 7-methoxytakrinu,

monokvartérních a biskvartérních amoniových solí odvozených od pyridinu a akridinu. Bohužel kvůli větší časové náročnosti a vzniklým problémům během purifikace AChE se nám ještě nepodařilo izolovat dostatečné množství čistého a aktivního enzymu, potřebného k testování potenciálních pesticidů. Tyto experimenty budou proto provedeny v roce 2015.

Splnění cílů řešení a přínos projektu.

Podařilo se nám splnit část vytyčených cílů a to vypracování metodiky přípravy hmyzího homogenátu. Následná purifikace AChE z homogenátu se však ukázala daleko problematičtější a časově náročnější než jsme předpokládali. Proto se nám nepodařilo provést testování potencionálních pesticidů na muši AChE. V souvislosti s absencí experimentálních dat bude také související publikace vydána v příštím roce.

Splnění kontrolovatelných výsledků řešení.

Uveďte především, publikace, které vznikly na základě řešení projektu. Dále uveďte, zda byly publikace skutečně zadány do OBD s vazbou na RIV.

Tab. 1 Sumář výstupů řešení projektu

Typ výstupu	Plán	Skutečnost	Poznámka (např. vyšlo, přijato, v redakčním řízení apod.
Počet dizertačních prací	0	0	
Počet diplomových prací	0	0	
Zařazeno do kategorie excellence	0	0	
Jimp - výstup v impaktovaném časopisu	1	0	Absence experimentálních dat
Jsc – výstup v databázi Scopus	0	0	
Jneimp – výstup v databázích Scopus a WOS	0	0	
Jrec – výstup v recenzovaném časopisu	0	0	
B – odborná kniha	0	0	
C – kapitola v odborné knize	0	0	
D – článek ve sborníku	0	0	
Počet výsledků celkem	1	0	

Podrobné zdůvodnění výdajů a doložení dodatečných žádostí o změnu rozpočtu:

- osobní náklady** (mzdy, odměny; odvody na zdravotní, sociální a úrazové pojištění; tvorba sociálního fondu, dohody o provedení práce a dohody o pracovní činnosti) a jejich stručné zdůvodnění,
Osobní náklady byly čerpány v souladu s plánem.
- stipendia** a jejich stručné zdůvodnění
Stipendia byla čerpána v souladu s plánem.
- spotřební materiál** (výdaje na pořízení kancelářských potřeb a ostatního spotřebního materiálu) a jejich stručné zdůvodnění
V položce spotřební materiál došlo ke změně čerpání. Důvodem byla neschopnost firmy dodat lidskou acetylcholinesterasu. Byla podána žádost o změnu rozpočtu a peníze byly využity na nákup chemikálií, spotřebního materiálu a kancelářských potřeb.

- d) **drobný hmotný majetek** a jejich stručné zdůvodnění,
Finance byly čerpány na externí harddisk, který bude sloužit k uchování naměřených dat. Protože disk byl na základě výběrového řízení pořízen za nižší cenu než bylo původně plánováno, byla zbyla částka převedena do položky spotřebního materiálu viz. žádost o změnu rozpočtu v příloze.
- e) **další náklady** a jejich stručné zdůvodnění
Další náklady se nevyskytly.
- f) **náklady nebo výdaje na služby** a jejich stručné zdůvodnění
V souladu s plánem byla zakoupena licence GraphPad Prism V6 softwaru, který bude sloužit k vyhodnocení laboratorních výsledků. Pořizovací cena byla nižší, než se plánovalo, a tak zbylé prostředky byly převedeny do položky spotřebního materiálu.
- g) **doplňkové (režijní) náklady** nebo výdaje v souladu s příslušným řídicím aktem UHK
- h) **cestovné** a jeho stručné zdůvodnění.

Tab. 2 Čerpání finančních prostředků v Kč

Položka	Plán	Žádost o změnu rozpočtu	Skutečnost
Počet členů řešitelského týmu čerpajících mzdové prostředky	1	1	1
Počet studentů čerpajících mzdové prostředky	1	1	1
Stipendia	17 000	17 000	17 000
DPP, DPČ - studenti	0	0	0
Odměny, DPP, DPČ - ostatní	3 601	3 601	3 601
Zákonné zdravotní a sociální pojištění	1 899	1 899	1 899
Celkem osobní náklady	22 500	22 500	22 500
Spotřební materiál	61 000	63 219	62 183,03
Drobný hmotný majetek	2 000	1 694	2 777
Materiálové náklady celkem	63 000	64 913	64 960,03
Služby celkem	13 500	11 587	11 587
Cestovné celkem	0	0	0
Celkové náklady	99 000 Kč	99 000 Kč	99 047,03 Kč

Přílohy:

- a) výsledovka z ekonomického informačního systému Magion – vyúčtování dotace.

Datum:

Podpis odpovědného řešitele