

**Výroční zpráva specifického výzkumu**  
**Zakázka č.2108/2020**

**Název projektu:** Cílená proteomická analýza potenciálních markerů ozáření v lidské plazmě metodou SRM

**Specifikace řešitelského týmu:**

Odpovědný řešitel: Mgr. Gabriela Kultová

Další výzkumní pracovníci: RNDr. Alena Myslivcová Fučíková, Ph.D.

**Anotace (10 řádků):**

Rostoucí riziko akutního ozáření velkého počtu osob (jaderná energetika, terorismus) vyžaduje vývoj nových metod, které by mohly poskytnout rychlé posouzení zdravotních účinků a korelaci odhadu obdržené dávky. Proto je kladen důraz na hledání nových markerů ozáření s využitím tzv. high-throughput technologií, jelikož stávající metody jsou pracné a časově náročné. Ionizující záření způsobuje v savčí periferní krvi komplexní změny na úrovni genové exprese. Některé proteiny byly již popsány jako potenciální indikátory radiačního poškození *in vitro* nebo na zvířecích modelech. Předchozí studie si kladla za cíl ověřit tuto hypotézu na krevní plasmě celotělově ozářených leukemických pacientů, kde byly stanoveny určité kvantitativní proteinové změny. V navazující studii budou pomocí cílené proteomické analýzy vybrané potenciální markery verifikovány a bude ověřen jejich bioanalytický potenciál.

**Celková částka požadované dotace (na celé období řešení projektu): 76 350 Kč**

**Cíle řešení a přínos projektu:**

Hlavním cílem projektu je vývoj metody cílené proteomické analýzy, která se zaměřuje na detekci a kvantifikaci předem vybraných tzv. proteotypických peptidů z proteinů, které byly z předchozích experimentů (iTRAQ) nebo z literatury vybrány, jako vhodné indikátory daného stavu organismu, v tomto případě ozáření. V případě, že vývoj metody bude úspěšný, významnou měrou přispěje k včasné detekci a posouzení stavu ozářené osoby, což pak může zefektivnit, a hlavně urychlit navazující zdravotní péči.

Cíle v bodech:

- výběr vhodných proteotypických peptidů pomocí bioinformatických analýz
- tvorba metody cílené proteomické analýzy (SRM, selected reaction monitoring)
- ověření metody SRM na vybrané kohortě pacientů a srovnání s kontrolní skupinou

## **Stručný popis řešené problematiky včetně metodiky a časového plánu řešení:**

V minulém projektu byla studie zaměřena na proteiny jako biomarkery ozáření v krevní plasmě. Periferní krev byla odebírána před a 24 hodin po ozáření. Abychom snížili bias způsobený vlivem nádorového onemocnění, byly výsledky srovnávány s kontrolní skupinou zdravých dobrovolníků (věkem a pohlavím srovnatelnou se skupinou pacientů), kterým byla krev také odebrána v čase 0 a 24 hodin, abychom vyloučili proteiny měnící se u neozářených osob vlivem času. Pomocí směsných vzorků a s využitím metody iTRAQ jsme určili, jaké proteiny byly přítomny v plasmě v detekovatelném množství. Výsledkem byl seznam proteinů, které byly porovnávány s literaturou a posuzovány z hlediska relevance k ozáření. Tyto proteiny jsme označili za potenciální markery ozáření.

Současný navazující projekt má za cíl vybrat a otestovat sadu proteotypických peptidů. Jedná se o unikátní peptidy, které jsou specifické pro každý protein. Nelze je tedy identifikovat ve dvou odlišných proteinech.

Výběr bude probíhat podle daných kritérií (vhodná délka řetězce, vhodné složení aminokyselin, izoelektrický bod,...) z naší vybraných proteinů (20). Výsledkem bude sada více jak 20 peptidů, které budou dále analyzovány a pořízeny ve formě izotopických standardů (IS). IS slouží pro získání kvantitativní informace o nativním shodném peptidu. Izotopicky značený standard umožňuje díky posunu hmotností ve spektru posoudit kvantitu hledaného analytu.

K analýze bude použita hmotnostní spektrometrie, která pracuje v režimu monitorování vybraných reakcí (SRM – selected reaction monitoring). Jedná se o velmi citlivou metodu, která monitoruje nejen peptid, ale i jeho fragmenty. SRM analýza je často využívána díky své citlivosti a specifčnosti v biomedicinském odvětví např. při hledání biomarkerů indikujících přítomnost tumoru a v klinickém odvětví, kde neexistují spolehlivé na protilátkách založené detekční metody.

Úprava vzorku na SRM analýzu zahrnuje přefiltrování vzorku a odstranění nežádoucích abundantních proteinů pomocí afinitivní imunodeplece na chromatografické koloně (MARS Hu-14, Agilent). Dalším krokem je přečištění a štěpení vzorků pomocí trypsinu. Takto připravené peptidové vzorky budou smíseny s izotopickým standardem, analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie a data budou následně bioinformaticky vyhodnocena.

## **Kontrolovatelné výsledky řešení.**

Tab. 1 Sumář plánovaných výstupů řešení projektu.

Typ výstupu	Plán 1. rok	Plán 2. rok	Plán 3. rok	Poznámka
<b>Hodnocené výstupy projektu</b>				
Jimp (databáze WoS)		1		
Jsc (databáze Scopus)				
B (recenzovaná odborná kniha) <sup>1*</sup>				
C (kapitola v recenzované odborné knize)*				
D (článek ve sborníku ve WoS, Scopus)				
P (patent)				
<b>Počet výsledků</b>		1		
<b>Nehodnocené výstupy projektu</b>				
Počet obhájených dizertačních prací				
Počet obhájených diplomových prací				
poster/prezentace				
<b>Počet výsledků</b>				

**Podrobný rozpočet očekávaných výdajů:**

**a) Spotřeba materiálu (položka dle IS Magion č. 501):**

Materiálové náklady (nutno soutěžit v rámci DNS)	Stručné zdůvodnění nákupu	Přesná specifikace	Cena včetně DPH (Kč)
Externí disk, USB flash disk, podložka	K ukládání výsledků		<b>2 081,2</b>
Manuální pipeta	Pro snadnější práci se vzorky		<b>6 643</b>

Spotřební náklady (spotřební a kancelářské potřeby)	Stručné zdůvodnění nákupu	Cena včetně DPH (Kč)
Kancelářské potřeby	K dokumentaci výsledků	<b>299,35</b>
spotřební materiál a chemikálie pro hmotnostní spektrometrii a přípravu vzorků	Zkumavky, pufr, etikety, kryobox	<b>46 554,02</b>

Pouze v oborech, pro které se databáze Scopus započítává do hodnocení

b) **Cestovné** (položka dle IS Magion č. 512):

titul, jméno a příjmení zaměstnance	konferenční poplatek (cca Kč)	ubytování (cca Kč)	cestovné (cca Kč)	stravné (cca Kč)	celkem (Kč)	plánovaná konference (název, místo a datum konání)

c) **Ostatní služby** (položka dle IS Magion č. 518):

Typ služby	Stručné zdůvodnění služby	Cena včetně DPH (Kč)

d) **Mzdové náklady** (položka dle IS Magion č. 521):

titul, jméno a příjmení	odměna (Kč)	zdůvodnění	Celkem (Kč)

e) **Zákonné pojištění** (položka dle IS Magion č. 524):

titul, jméno a příjmení	odvody z odměn 34,52 % (Kč)	Celkem (Kč)

f) **Jiné ostatní náklady** (položka dle IS Magion č. 549):

**Stipendium studentů za práci na řešení projektu**

titul, jméno a příjmení studenta/tky	číslo studenta/tky	typ studia (Mgr./PhD.) / ročník studia	obor studia	bankovní spojení	stipendium (Kč)
Mgr. Gabriela Kultová	S18BI002DP	PhD./2.r očník	Aplikovaná biologie a ekologie	115- 3331690257/0100	<b>8 000</b>

### Cestovní stipendia studentů

titul, jméno a příjmení studenta/tky	konferenční poplatek (cca Kč)	ubytování (cca Kč)	cestovné (cca Kč)	stravné (cca Kč)	celkem (Kč)	plánovaná konference (název, místo a datum konání)
Mgr. Gabriela Kultová	5 600	4 500	1 344	1 388	12 832	Letní škola hmotnostní spektrometrie 9/2020

Součástí každého návrhu specifického výzkumu bude Tab. 2.

**Tab. 2 Plán čerpání finančních prostředků v Kč**

Položka Magionu	Položka	Plán Kč za 1. rok	Plán Kč za 2. rok	Plán Kč za 3. rok	Poznámka
		Počet členů řešitelského týmu čerpajících mzdové prostředky			
	Počet studentů čerpajících mzdové prostředky				
501	Spotřeba materiálu	55 577,57			
512	Cestovné				
518	Ostatní služby				
521	Mzdové náklady				
524	Zákonné pojištění				
549	Jiné ostatní náklady (stipendia)	20 832			
	<b>Celkové náklady za uvedený rok</b>	<b>76 409,57</b>			
	<b>Celkové náklady</b>	<b>76 409,57</b>			

Datum: 10.11. 2020

Podpis odpovědného řešitele:

*Kultová*

Výsledovka po účtech s pohyby  
Pohyby za období 2020 / 01 - 12

Pracoviště:	*****	Všechny vybrané analytiky
Činnost:	****	Všechny vybrané analytiky
Fullcost:	*****	Všechny vybrané analytiky
Zakázka:	2108	SV - Proteomická analýza potenc.markerů
Podzakázka:	***	Všechny podzakázky

Účet	Název účtu	Má dáti	Dal	Zůstatek k 2020 / 12
501 003	Spotřeba materiálu kancelářské DU			
	Počáteční stav	0,00		
	ZAV/0411/00921/20	01.12.2020	299,34	0,00 kancelářské potřeby
501 003	Spotřeba materiálu kancelářské I	299,34	0,00	299,34
501 008	Spotřeba materiálu DHIM DU			
	Počáteční stav	0,00		
	MAJ/0407/00031/20	14.09.2020	1 609,00	0,00 000020428 DISK ADATA EXTERNÍ SD700 Kultová
	MAJ/0407/00036/20	02.10.2020	6 643,00	0,00 000020545 NÁSTAVEC PIPETOVÝ LEVO PLUS Kultové
501 008	Spotřeba materiálu DHIM DU	8 252,00	0,00	8 252,00
501 099	Spotřeba materiálu ostatní DU			
	Počáteční stav	0,00		
	ZAV/0411/00528/20	18.08.2020	16 308,38	0,00 lab. potřeby
	ZAV/0411/00529/20	18.08.2020	7 698,50	0,00 eppendorfky
	ZAV/0411/00535/20	19.08.2020	3 005,64	0,00 lab. potřeby
	ZAV/0411/00578/20	04.09.2020	472,20	0,00 podložka pod myš 2 ks
	ZAV/0411/00662/20	24.09.2020	9 196,00	0,00 lab. potřeby
	ZAV/0411/00757/20	21.10.2020	6 279,90	0,00 eppendorfky- Kultová - sp.v .2108
	ZAV/0411/00777/20	26.10.2020	4 065,60	0,00 eppendorfky - materiál- Kultová - sp.v .2108
501 099	Spotřeba materiálu ostatní DU	47 026,22	0,00	47 026,22
501	Spotřeba materiálu	55 577,56	0,00	55 577,56
549 006	Jiné ostatní náklady mimoř.stip. DU			
	Počáteční stav	0,00		
	BAN/0802/16044/20	02.07.2020	11 070,00	0,00 3 mimořádné stipendium
	BAN/0971/00348/20	25.09.2020	9 762,00	0,00 1 mimořádná stipendia
549 006	Jiné ostatní náklady mimoř.stip. I	20 832,00	0,00	20 832,00
549	Jiné ostatní náklady	20 832,00	0,00	20 832,00
	Náklady celkem	76 409,56	0,00	76 409,56

Výsledovka po účtech s pohyby  
Pohyby za období 2020 / 01 - 12

Pracoviště:	*****	Všechny vybrané analytiky
Činnost:	****	Všechny vybrané analytiky
Fullcost:	*****	Všechny vybrané analytiky
Zakázka:	2108	SV - Proteomická analýza potenc.markerů
Podzakázka:	***	Všechny podzakázky

Účet	Název účtu	Má dáti	Dal	Zůstatek k 2020 / 12
691 006	Provoz.dotace věda MŠMTspecifický výzkum			
	Počáteční stav		0,00	
MAN/0910/00009/20	17.02.2020	0,00	76 350,00	Specifický výzkum 2020
691 006	Provoz.dotace věda MŠMTspecif	0,00	76 350,00	76 350,00
691	Přijaté přís. mezi zúčt.mezi org.slož.	0,00	76 350,00	76 350,00
	Výnosy celkem	0,00	76 350,00	76 350,00
	Hospodářský výsledek k 2020 / 12:			-59,56
	Náklady za vybrané:	76 409,56		76 409,56
	Výnosy za vybrané:		76 350,00	76 350,00
	Hospodářský výsledek za vybrané k 2020 / 12:			-59,56

Výběrová kritéria (omezení sestavy se řídí právy uživatele trojoin1 (uvedena v závorce))

Pracoviště:	( 04** )
Činnost:	( ***)
Fullcost:	
Zakázka:	2108 ( * )
Podzakázka:	