

**Průběžná výroční zpráva projektu specifického výzkumu  
zakázka č. 2106 /2023**

**Název projektu:** Fyzikálně-chemická a biochemická analýza nízkomolekulárních látek

**Specifikace řešitelského týmu**

Odpovědný řešitel: Mgr. Tereza Hofmanová; PharmDr. Rudolf Andrýs, Ph.D.

Studenti doktorského studia na UHK: Mgr. Tereza Hofmanová, Mgr. Klára Faistauerová

Studenti magisterského studia na PŘF UHK: Bc. Michaela Dohnalová, Bc. Jan Hurdálek

Další výzkumní pracovníci: PharmDr. Rudolf Andrýs, Ph.D.; doc. RNDr. Lucie Zemanová, Ph.D.; PharmDr. Adam Skarka, Ph.D.; doc. Ing. Miroslav Lísa, Ph.D.

**Celková částka přidělené dotace:** 225 550,- Kč

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

V rámci tohoto projektu byla připravena nová derivatizační činidla se základní strukturou obsahující pyridin, isochinolin nebo chinolin s různými reaktivními funkčními skupinami (NHS-ester, karbonyl-chlorid nebo sulfonyl-chlorid). Činidla byla následně podrobně analyzována. Jejich struktura byla potvrzena pomocí NMR spektroskopie a doplněna o IR spektra. Čistota připravených činidel byla zjištěna pomocí LC-MS. Byla zaznamenána také UV spektra, teplota tání a u vybraných činidel také excitační a emisní absorpční maxima, která byla následně využita pro stanovení intenzity fluorescence. Mimo jiné byla stanovena jejich stabilita ve dvou mediích – a to acetonitrilu a reakční směsi (acetonitril:pufr). Činidla byla dále podrobena analýze se základní směsí aminokyselin, která se skládala z alaninu, serinu, histidinu, tyrosinu a cysteinu. Byla posuzována reaktivita činidel, jejich celková účinnost a následně i chování činidla, která následně reagovala se všemi proteinogenními aminokyselinami a byla pro derivatizovaných produktů v LC-MS systému. Po projití všech zjištěných dat byla vybrána nejslibnější a optimalizována LC-MS metoda. Paralelně byla studována komerčně dostupné derivatizační činidlo – dansyl-chlorid, který je v praxi velmi používaným činidlem. Výsledky nově připravených činidel pak budou porovnány s komerčně dostupným. Mimo jiné se v rámci tohoto projektu podařilo také začít s přípravou derivatizačního činidla, které nese jako základní strukturu  $\beta$ -karbolin. V nynější době bude tato nová strukturní jednotka charakterizována výše zmíněnými metodami a také u ní proběhne první test se základní směsí aminokyselin.

Mgr. Klára Faistauerová se zabývala chemickou analýzou neurotransmiterů - katecholaminů a jejich metabolitů. Tato analýza je komplikovaná, jelikož koncentrace těchto látek v biologických vzorcích je velice nízká, jsou málo stabilní a vysoce polární. Studentka začala s optimalizací extrakčního postupu katecholaminů, který umožní jejich analýzu metodou LC/MS v mozkové tkáni nebo krevní plasmě s použitím metod extrakce na pevné fázi s ohledem na charakter analytů a komplexnost matrice.

Studentka Bc. Michaela Dohnalová se věnovala problematice vlivu halogenové substituce na fyzikálně-chemické a biochemické vlastnosti oximů využitelných jako antidota při léčbě otrav organofosfáty. Úspěšně porovnávala vliv halogenové substituce na disociační konstantu ( $pK_a$ ), distribuční koeficient ( $\log D$ ) a stabilitu za fyziologických podmínek. V rámci biochemického testování stanovila vliv halogenové substituce na inhibiční potenciál ( $IC_{50}$ ) a reaktivační účinnost testovaných oximů. Výsledky shrnula ve své diplomové práci, kterou úspěšně obhájila v roce 2023. Výsledky budou rovněž součástí připravované vědecké publikace.

Studentka Bc. Veronika Mičková se zabývá tvorbou imobilizovaných enzymových katalyzátorů jako nástrojů pro biochemické hodnocení nízkomolekulárních látek. Pomocí His-Trap technologie se jí úspěšně podařilo imobilizovat obě izoformy lidské monoaminoxidasy (MAO-A i MAO-B) a lidské cholinesterasy (AChE a BChE) na povrch magnetických mikročástic o průměru 1  $\mu\text{m}$ . U takto imobilizovaných enzymů určila jejich základní kinetické parametry ( $K_m$ ,  $V_{\text{max}}$ ), ověřila jejich schopnost interakce s vybranými inhibitory a stanovila jejich stabilitu s možností opětovného použití. Následně demonstrovala, že imobilizované enzymy jsou oproti dialýze nebo rozředovací metodě ideálním řešením pro stanovení reverzibility inhibice nízkomolekulárních látek. Získané výsledky budou součástí vědecké publikace.

Mgr. Jan Hurdálek se v rámci své diplomové práce věnoval enzymům, kdy navrhoval a připravoval fúzní proteiny pro medicínské i průmyslové využití, které je v praxi často omezeno přítomností nežádoucích mezidoménových interakcí, které ovlivňují jejich funkčnost. Za účelem zevrubnějšího porozumění tomuto jevu byly připraveny rekombinantní fúzní proteiny FD5A a FD6A (složené z PDZ3 domény proteinu ZO-1 a arteficiálního proteinu GA88) a samotný protein GA88. Tyto byly charakterizovány širokým spektrem biofyzikálních metod (AEC, DLS, AUC, CD a DSF) a to zejména za účelem porovnání jejich hydrodynamických vlastností. Získané výsledky byly diskutovány v jeho diplomové práci, která byla úspěšně obhájena v roce 2023. Na své dosažené výsledky dále navazuje v rámci PhD studia, kde tyto data budou rozšířeny a následně zúročeny v podobě publikace.

### **Splnění cílů řešení a přínos projektu.**

Cíle projektu byly splněny. Byla připravena nová derivatizační činidla obsahující různé heterocyklické skelety s odlišnými funkčními skupinami. Byly studovány jejich fyzikálně-chemické vlastnosti a byla zjištěna jejich reaktivita a afinita vůči námi vybrané základní směsi aminokyselin. Pro vybraná činidla byla optimalizována LC-MS metoda a výsledky byly poté porovnány s komerčně dostupným činidlem. Výsledky budou shrnuty v připravované publikaci a na jejich základě bude probíhat i další výzkum. Projekt dále přispěl studentům bakalářského studia k získání nových poznatků a studentům magisterského studia k rozšíření jejich odborných znalostí.

### **Splnění kontrolovatelných výsledků řešení.**

Uvedte jen výstupy, které vznikly na základě řešení tohoto projektu. Dále uveďte, zda byly publikace skutečně zadány do OBD s vazbou na RIV.

#### **Články odeslané do časopisu** (studenti zvýraznění):

Rudolf Andrýs, Charline Monnier, Evica Antonijević Miljaković, **Veronika Mickova**, Kamil Musilek, Lucie Zemanova. IMAC-immobilized enzymes as a cost-effective and sustainable approach in an early phase of drug development for neurological diseases. *Talanta*. Submitted 2023-06-24. IF<sub>2022</sub> = 6,080. Q1 13/86 (Analytical Chemistry)

Tab. 1 Sumář výstupů řešení projektu

U výstupů na WOS s nenulovým AIS a na SCOPUS s nenulovým SJR uveďte do závorky kvartil časopisu dle AIS, resp. SJR.

Typ výstupu	Plán	Skutečnost	Poznámka
Article, Review, Letter (databáze WoS dle AIS) *	1	0	Aktuálně ve stádiu revizí
Article, Review, Letter (databáze Scopus dle SJR) **			
B (recenzovaná odborná kniha) ***			
C (kapitola v recenzované odborné knize)***			
D (článek ve sborníku ve WoS, Scopus)			
P (patent)			
Počet obhájených dizertačních prací			
Počet obhájených diplomových prací	1	1	
<b>Počet výsledků</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	

Výsledek čerpání rozpočtu:

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)
Sada automatických pipet s nastavitelným objemem	Pipety pro přesné pipetování malých objemů	Sada automatických jednokanálových mechanických pipet s nastavitelným objemem, velmi lehkým ovládáním a ovládáním odhazovače špiček jako samostatným prvkem, odpružený dolní kónus pipety, možnost zablokování odpružení, kompletně autoklávovatelné bez nutnosti demontáže, UV rezistentní, snadno rozebíratelné pro údržbu bez nutnosti použití jiných nástrojů v rozsahu: 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl. K pipetám otočný pipetový karusel s držáky pro umístění 6 pipet.	21 441,00

\* Povinný výstup.

\*\* Týká se pouze časopisů z problematiky společenských a humanitních oborů.

\*\*\* Pouze renomovaná nakladatelství Elsevier, Springer, Bentham apod.

Vortex V-1	Přístroj pro optimální promíchání vzorku	Malý vortex s dotykovým nebo kontinuálním chodem pro mixování zkumavek o objemu 1,5 - 50 ml.	4 235,00
Multipette® E3	Pipeta pro pipetování malých objemů s možností vícekrokového dávkování	Elektronická krokovací pipeta pro opakované dávkování s digitálně nastavitelným objemem v rozsahu 1 µL - 50 mL, s prvkem odhazovače špiček a displejem.	22 264,00

Spotřební náklady (spotřební a kancelářské potřeby)	Stručné zdůvodnění nákupu	Cena včetně DPH (Kč)
Spotřební materiál	Spotřební materiál: nitrilové rukavice, špičky a další laboratorní plast a sklo;	141 099,70
	Chemikálie: rozpouštědla LC-MS kvality, výchozí látky a reagenty pro přípravu derivatizačních značek, standardy pro analýzu aminokyselin a další molekul	
	LC kolony: 2 různé druhy pro LC-MS	

b) **Cestovné** (položka dle IS Magion č. 512):  
cestovné zaměstnanců a jeho stručné zdůvodnění;

Titul, jméno a příjmení zaměstnance	Ubytování (cca Kč)	Cestovné (cca Kč)	Stravné (cca Kč)	Celkem (Kč)	(Název, místo a datum konání)
PharmDr. Rudolf Andrýs, Ph.D.	-	-	-	0	-
doc. RNDr. Lucie Zemanová, Ph.D.	-	-	-	0	-
PharmDr. Adam Skarka, Ph.D.	-	-	-	0	-
doc. Ing. Miroslav Lísa, Ph.D.	-	-	-	0	-

- c) **Ostatní služby** (položka dle IS Magion č. 518):  
náklady nebo výdaje na služby a jejich stručné zdůvodnění

Typ služby	Stručné zdůvodnění služby	Cena včetně DPH (Kč)
Poplatky konference	Účast PhD studentů na konferenci	11 000,02
Ubytování a strava tuzemsko na fakturu	Stravné a ubytování PhD studentů na konferencích	7 800,00

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

Titul, jméno a příjmení	Odměna (Kč)	Zdůvodnění	Celkem (Kč)
PharmDr. Rudolf Andrys, Ph.D.	0	-	0
doc. RNDr. Lucie Zemanová, Ph.D.	0	-	0
PharmDr. Adam Skarka, Ph.D.	0	-	0
doc. Ing. Miroslav Lísa, Ph.D.	0	-	0

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

Titul, jméno a příjmení	Odvody z odměn 34,42 % (Kč)	Celkem (Kč)
PharmDr. Rudolf Andrys, Ph.D.	-	0
doc. RNDr. Lucie Zemanová, Ph.D.	-	0
PharmDr. Adam Skarka, Ph.D.	-	0
doc. Ing. Miroslav Lísa, Ph.D.	-	0

- f) **Jiné ostatní náklady** (položka dle IS Magion č. 549):  
zejména **stipendia** a jejich stručné zdůvodnění

**Stipendium studentů za práci na řešení projektu**

Titul, jméno a příjmení studenta/ky	Číslo studenta/ky	Typ studia (Mgr./PhD.) / ročník studia	Obor studia	Bankovní spojení	Stipendium (Kč)
Mgr. Tereza Hofmanová		Ph.D./1.		250623745/0300	8 000
Mgr. Klára Faistauerová		Ph.D./1.		2770190073/0800	8 000
Bc. Michaela Dohnalová		NMgr./3.			0
Bc. Jan Hurdálek		NMgr./2.			0

### 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. Tereza Hofmanová	-	-	772,00	-	772,00	9. Česká chromatografická škola, Vinařství u Kapličky, Zaječí; 14.-17.5.2023
Mgr. Klára Faistauerová	-	-	772,00	-	772,00	9. Česká chromatografická škola, Vinařství u Kapličky, Zaječí; 14.-17.5.2023

**g) Další položky (uvedte čísla dle IS Magion):**  
další položky a jejich stručné zdůvodnění

Číslo IS dle Magion	Typ	Cena včetně DPH (Kč)
545	Kurzové ztráty v rámci zahraničních plateb	218,25

Výsledek čerpání finančních prostředků uveďte v jednotné přehledné tabulce 2.

Tab. 2 Čerpání finančních prostředků v Kč

Položka magionu	Položka	Plán Kč	Žádost o změnu	Skutečnost	Poznámka
	Počet členů řešitelského týmu čerpajících mzdové prostředky	0	-	0	
	Počet studentů čerpajících mzdové prostředky	2	-	2	
501	Spotřeba materiálu DHIM	182 550,00	+ 6 655,98	188 987,73	
512	Cestovné	0	-	0	
518	Ostatní služby	0	+ 18 800,02	18 800,02	Část cestovních výdajů studentů byla nesprávně účtovaná jako služba
521	Mzdové náklady	0	-	0	
524	Zákonné pojištění	0	-	0	
549	Jiné ostatní náklady (stipendia)	43 000,00	- 25 456,00	17 544,00	Část cestovních výdajů studentů byla nesprávně účtovaná jako služba
545	Kurzové ztráty	0	-	218,25	Kurzové ztráty z důvodu zahraničních plateb
*	Přeúčtování na zak. 1000/04450			51,97	
	<b>Celkové náklady</b>	<b>225 550,00</b>	<b>-</b>	<b>225 601,97</b>	

Ke zprávě přiložte:

- a) výpis z OBD – výstupy podpořené tímto projektem,
- b) výsledovku z ekonomického informačního systému Magion – vyúčtování dotace.

Datum: 8. 1. 2024

Podpis odpovědného řešitele:

## Výsledovka po účtech obrátová

Období: 01 - 12 / 2023

Pracoviště: \*\*\*\*\* Všechny vybrané analytiky  
 Činnost: \*\*\*\* Všechny vybrané analytiky  
 Fullcost: \*\*\*\*\* Všechny vybrané analytiky  
 Zakázka: 2106 SV Fyzikálně-chemická a biochemická anal  
 Podzakázka: \*\*\* Všechny podzakázky

Účet	Název účtu	Na poč. období	Má dáti	Dal	Zůstatek
501 008	Spotřeba materiálu DHIM DU	0,00	47 940,00	0,00	47 940,00
501 099	Spotřeba materiálu ostatní DU	0,00	141 099,70	0,00	141 099,70
501	Spotřeba materiálu	0,00	189 039,70	0,00	189 039,70
518 004	Poplatky konference, semináře, kurzy	0,00	11 000,02	0,00	11 000,02
518 067	Strav. a ubyt. tuzemsko na fakturu DL	0,00	7 800,00	0,00	7 800,00
518	Ostatní služby	0,00	18 800,02	0,00	18 800,02
545 001	Kurzové ztráty DU	0,00	218,25	0,00	218,25
545	Kurzové ztráty	0,00	218,25	0,00	218,25
549 006	Jiné ostatní náklady mimoř.stip. DU	0,00	17 544,00	0,00	17 544,00
549	Jiné ostatní náklady	0,00	17 544,00	0,00	17 544,00
	Náklady celkem	0,00	225 601,97	0,00	225 601,97
691 006	Provoz.dotace věda MŠMTspecifický	0,00	0,00	225 550,00	225 550,00
691	Přijaté přís. mezi zúčt.mezi org.slož.	0,00	0,00	225 550,00	225 550,00
	Výnosy celkem	0,00	0,00	225 550,00	225 550,00
<b>HOSPODÁŘSKÝ VÝSLEDEK:</b>					<b>-51,97</b>
	Celkem náklady za vybrané:	0,00	225 601,97	0,00	225 601,97
	Celkem výnosy za vybrané:	0,00	0,00	225 550,00	225 550,00
<b>Hospodářský výsledek za vybrané:</b>					<b>-51,97</b>

Výběrová kritéria (omezení sestavy se řídí právy uživatele rybakka1 (uvedena v závorce))

Pracoviště: ( 04\*\*|09927|09927 )  
 Činnost: ( \*\*\*|1560|\*\*\* )  
 Fullcost:  
 Zakázka: 2106 ( \*|5662|[4891|4892|4893|4897] )  
 Podzakázka: