

## Průběžná výroční zpráva projektu specifického výzkumu zakázka č. 2106 /2021

**Název projektu:** Vývoj metod pro analýzu a biochemické testování metabolitů, lipidů a xenobiotik

### Specifikace řešitelského týmu

Odpovědný řešitel: Mgr. Petra Lišková, doc. Ing. Miroslav Lísa, Ph.D.

Studenti doktorského studia na UHK: Mgr. Petra Lišková

Studenti magisterského studia na PřF UHK: Bc. Michaela Dohnalová, Bc. Eliška Hančová, Bc. Eliška Horáková, Bc. Tereza Langerová, Bc. Zdeňka Neuerová, Bc. Markéta Veselá

Další výzkumní pracovníci: PharmDr. Rudolf Andrys, Ph.D., Ing. Eva Cífková, Ph.D., RNDr. Oleksandr Kozlov, Ph.D., doc. Ing. Miroslav Lísa, Ph.D., Mgr. Helena Řehulková, Ph.D.

**Celková částka přidělené dotace: 197 630,00 Kč**

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

Podobně jako analytická část katedry chemie se specifický výzkum zabývá vývojem metod pro analýzu metabolitů, mezi které patří široké spektrum nízkomolekulárních látek různé chemické povahy. Některé práce navazují na již probíhající výzkum a některé naopak otevírají novou kapitolu s inovativním přístupem k přípravě nebo analýze metabolitů. Nedílnou součástí studia o metabolitech je také biochemické testování vlivu xenobiotik na buněčné enzymy.

Gangliosidy představují důležité polární lipidy, které se účastní různých signálních procesů v buňkách a narušení jejich metabolismu má spojitost s řadou závažných onemocnění centrálního nervového systému. Jejich detailní analýza umožňuje popis jejich vlivu na vznik a průběh takových onemocnění. V rámci diplomové práce byla provedena optimalizace metody přípravy vzorku a podmínek LC/MS analýzy gangliosidů v mozku experimentálních zvířat. Metoda bude validována a použita pro charakterizaci zastoupení gangliosidů ve vybraných vzorcích. Získaná data budou zpracována v diplomové práci Bc. Terezy Langerové s předpokládanou obhajobou v roce 2022.

Spojení analytických metod SFC a MS má velký potenciál pro metabolomickou analýzu především středně polárních až nepolárních látek, protože umožňuje rychlou a detailní analýzu velkého množství vzorků. V rámci práce byla provedena podrobná optimalizace podmínek SFC/MS analýzy s cílem separovat jednotlivé třídy lipidů z celkového lipidického extraktu mozku. Metoda byla validována a aplikována na charakterizaci vybraných biologických vzorků. Výsledky byly zpracovány v závěrečné práci Bc. Elišky Hančové a také publikovány v časopise *Journal of Chromatography A* (2021).

V další práci se Bc. Eliška Horáková zabývá syntézou a chirální SFC/MS analýzou izomerů monoacylglycerolů a diacylglycerolů, které jsou součástí metabolických drah zejména jako meziprodukty tvorby řady důležitých glycerolipidů. Informace o složení izomerů v biologické

tkáni je důležitá z hlediska jejich rozdílných vlastností. V rámci práce byla již provedena optimalizace podmínek syntézy izomerů diacylglycerolů na základě stereospecifické esterifikace glycerolu mastnou kyselinou. Připravené standardy budou použity pro optimalizaci chirální SFC/MS metody. Metoda bude validována a aplikována na charakterizaci vybraných biologických vzorků. Výsledky budou zpracovány v diplomové práci (2022).

Na rozdíl od předchozích prací se Bc. Markéta Veselá věnovala problematice imobilizace enzymů na povrch magnetických mikročástic. Nejprve potvrdila možnost imobilizace lidské rekombinantní acetylcholinesterasy v aktivní formě na His-Trap magnetické mikročástice a následně provedla i biochemické otestování takto imobilizovaného enzymu. Naměřená data se stala náplní její již úspěšně obhájené diplomové práce v roce 2021 a dále budou součástí vědecké publikace, která je momentálně ve fázi dokončování a bude publikována v první polovině roku 2022.

Bc. Michaela Dohnalová se ve své diplomové práci zabývá vlivem halogenových substituentů na fyzikálně-chemické a biochemické vlastnosti oximů. Úspěšně již potvrdila vliv na hodnotu pKa i stabilitu za fyziologických podmínek. V následujících měsících provede zbylé experimenty zejména v oblasti biochemických vlastností analyzovaných oximů. Dosažené výsledky budou náplní její diplomové práce (obhajoba 2022) a zároveň se stanou součástí připravované vědecké publikace.

Studiem farmakokinetiky oximů v organismu se zabývala v rámci své diplomové práce Aneta Klusoňová. Věnovala se tématu enkapsulace oximů do kavity kukurbit[7]urilu (CB[7]) za účelem zlepšení biodostupnosti oximů v mozkové tkáni. Úspěšně zavedla extrakční protokol oximů a CB[7] z biologických matric a následně vytvořila LC-MS/MS metodu, díky čemuž mohlo být stanoveno ovlivnění farmakokinetiky vybraných oximů po enkapsulaci s CB[7] na myším modelu. Získaná data se stala náplní její úspěšně obhájené závěrečné práce a dále hlavní součástí vědecké publikace v impaktovaném časopise *Molecular Pharmaceutics* (2021).

Zcela nový přístup v přípravě vzorku přináší práce zabývající se purifikací celkového metabolického extraktu mozku. Metabolický extrakt obsahuje velké množství látek různé velikosti, struktury i chemické povahy, proto by bylo výhodné takový vzorek před samotnou analýzou zbavit balastů, které jsou ve vzorku nežádoucí a mohou způsobovat i znečištění přístroje nebo chromatografické kolony. Bc. Zdeňka Neuerová připravuje svépomocí minikolony s různými typy stacionárních fází. Pomocí těchto kolonek je metabolický extrakt mozku purifikován a sebrané frakce jsou následně analyzovány metodou LC/MS. Optimalizovaná metoda přípravy kolonek se sorbentem bude validována a výsledky zpracovány do diplomové práce (obhajoba 2022).

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

Cíle projektu byly splněny. Úspěšně byly optimalizovány nové postupy přípravy vzorků i metody pro jejich analýzu. Pomocí validace byla ověřena spolehlivost těchto metod a jejich možné použití pro další biologické experimenty. Byla vyvinuta i zcela nová metoda purifikace metabolického extraktu, která by mohla být v budoucnu využita pro rychlou úpravu vzorků před LC/MS nebo SFC/MS analýzou.

Projekt celkově přispěl studentům magisterského studia k rozšíření odborných znalostí a k získání nových poznatků. Všechny nedokončené práce jsou na dobré cestě k úspěšnému dokončení i k možnému pokračování v doktorském studiu na Katedře chemie.



### Publikované články v časopisech typu Jimp (studenti zvýraznění):

1. Lísa, M.; Řehulková, H.; **Hančová, E.**; Řehulka, P. Lipidomic analysis using hydrophilic interaction liquid chromatography microgradient fractionation of total lipid extracts. *Journal of Chromatography A*. **2021**, vol. 1653, no. 462380.  
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462380>  
IF<sub>2021</sub> = 4,759, Q1 13/78 (Biochemical Research Methods)
2. Andrýs, R.; **Klusoňová, A.**; Lísa, M.; Kassa, J.; Žďárová Karasová, J. Effect of Oxime Encapsulation on Acetylcholinesterase Reactivation: Pharmacokinetic Study of the Asoxime-Cucurbit[7]uril Complex in Mice Using Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Molecular Pharmaceutics*. **2021**, vol. 18(6), p. 2416-2427.  
<https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.1c00257>  
IF<sub>2021</sub> = 4,939, Q1 69/276 (PHARMACOLOGY & PHARMACY)

### Splnění kontrolovatelných výsledků řešení.

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

U výstupů Jimp a Jsc uveďte do závorky plánovaný a skutečný kvartil časopisu.

**Tab. 1** Sumář výstupů řešení projektu

Typ výstupu	Plán	Skutečnost	Poznámka
Jimp (databáze WoS)	1	2	2xQ1
Jsc (databáze Scopus)			
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	6	1	
<b>Počet výsledků</b>	<b>7</b>	<b>3</b>	

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

**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)
Vortex V-32	Přístroj pro optimální promíchání skupiny vzorků při extrakci	Vortex s dotykovým nebo kontinuálním chodem. Včetně nástavce PV-32 na 32 zkumavek (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml) a nástavce PL-1 na 1 zkumavku (max. 50 ml). Možnost výběru dalších nástavců. CPV: 38436000-0 (Třepačky a příslušenství)	5 905,00
Sada automatických pipet s nastavitelným objemem	Pipety pro přesné pipetování malých objemů	Sada automatických jednokanálových mechanických pipet s nastavitelným objemem, velmi lehkým ovládním a ovládním 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, požadujeme celkem 3 pipety s variabilními objemy v rozsahu: 0,5-10 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl. K pipetám požadujeme otočný pipetový karusel s držáky pro umístění 6 pipet; CPV: 38437000-7 (Laboratorní pipety a příslušenství)	22 320,86

Spotřební náklady (spotřební a kancelářské potřeby)	Stručné zdůvodnění nákupu	Cena včetně DPH (Kč)
Spotřební materiál	LC kolony, rozpouštědla LC-MS kvality, standardy metabolitů a lipidů, aditiva, nitrilové rukavice, špičky a další laboratorní plast, laboratorní sklo, homogenizační zkumavky, kuličky pro homogenizaci, magnetické částice pro imobilizaci enzymů, skleněné LC-MS vialky, inserty, septa	145 507,86

**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)
				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)
		0,-

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

Titul, jméno a příjmení	Odměna (Kč)	Zdůvodnění	Celkem (Kč)
			0,-

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

Titul, jméno a příjmení	Odvody z odměn 34,52 % (Kč)	Celkem (Kč)
		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)
Bc. Michaela Dohnalová	S20CH007NP	NMgr./1.	N0531A13CZTX		2 000,00
Bc. Eliška Hančová	S20CH008NP	NMgr./1.	N0531A13CZTX		2 000,00
Bc. Eliška Horáková	S20CH010NP	NMgr./1.	N0531A13CZTX		2 000,00
Bc. Zdeňka Neuerová	S20CH015NP	NMgr./1.	N0531A13CZTX		2 000,00
Bc. Tereza Langerová	S20CH013NP	NMgr./1.	N0531A13CZTX		2 000,00
Bc. Markéta Veselá	S19CH010NP	NMgr./2.	7504TO75		2 000,00

#### Cestovní stipendia studentů

Titul, jméno a příjmení studenta/ky	Konferenční poplatek (cca Kč)	Ubytování (cca Kč)	Cestovné (cca Kč)	Stravné (cca Kč)	Celkem (Kč)	Plánovaná konference (název, místo a datum konání)
Mgr. Petra Lišková	5 000,-	5 000,-	1 000,-	1 000,-	12 000,-	22. Škola hmotnostní spektrometrie, Srní

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

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	6		6	
501	Spotřeba materiálu DHIM	172 930,00	+700,00	173 733,72	
512	Cestovné	0		0	
518	Ostatní služby	700,00	-700,00	0	
521	Mzdové náklady	0		0	
524	Zákonné pojištění	0		0	
549	Jiné ostatní náklady (stipendia)	24 000,00		23 913,00	
*					
	<b>Celkové náklady</b>	<b>197 630,00</b>		<b>197 646,72</b>	

**Ke zprávě přiložte:**

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

Datum: 6. 1. 2022

Podpis odpovědného řešitele:



\* V případě potřeby přidejte další řádky s položkami dle IS Magion.



**Závěrečná zpráva grantového projektu zakázka č.2106**  
(specifický výzkum v roce 2021)

**Název projektu:** Vývoj metod pro analýzu a biochemické testování metabolitů, lipidů a xenobiotik

**Výpis z OBD**

[1] **Lísa, M., Řehulková, H., Hančová, E., Řehulka, P.** Lipidomic analysis using hydrophilic interaction liquid chromatography microgradient fractionation of total lipid extracts. *Journal of Chromatography A*. Elsevier, 2021. 7s.

ISSN: 0021-9673. Kód UT ISI: 000685249900001.

Granty: GA20-12289S.

Spec. výzkum: S.

Forma: J\_ČLÁNEK V ODBORNÉM PERIODIKU  
(ID: 43877947) (RIV ID: 50018337)

---

[2] **Andrýs, R., Klusoňová, A., Lísa, M., Kassa, J., Karasova, Žďárová, J.** Effect of Oxime Encapsulation on Acetylcholinesterase Reactivation: Pharmacokinetic Study of the Asoxime-Cucurbit[7]uril Complex in Mice Using Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Molecular Pharmaceutics*. Washington: Amer Chemical Soc., 2021. 12s.

ISSN: 1543-8384. Kód UT ISI: 000661309800026.

Granty: GA18-08937S.

Spec. výzkum: S.

Forma: J\_ČLÁNEK V ODBORNÉM PERIODIKU  
(ID: 43877835) (RIV ID: 50018225)

---

Výsledovka s očekávanými náklady  
Pohyby za období 01 - 12 / 2021

Pracoviště:	*****	Všechny vybrané analytiky		
Činnost:	****	Všechny vybrané analytiky		
Fullcost:	*****	Všechny vybrané analytiky		
Zakázka:	2106	SV Biochemické testování metabolitů ...		
Podzakázka:	***	Všechny podzakázky		
Účet	Název účtu	Má dáti	Dal	Zůstatek
501 008	Spotřeba materiálu DHIM DU			
	Počáteční stav	0,00		
	MAJ/0407/00039/21	04.10.2021	5 905,00	0,00 Majetek 03- odpisy jednorázový 10 - DH-P 00022072
501 008	Spotřeba materiálu DHIM DU	5 905,00	0,00	5 905,00
501 099	Spotřeba materiálu ostatní DU			
	Počáteční stav	0,00		
	ZAV/0411/00183/21	08.04.2021	11 476,61	0,00 materiál
	ZAV/0411/00263/21	13.05.2021	2 541,00	0,00 chemikálie
	ZAV/0411/00292/21	27.05.2021	2 940,30	0,00 chemikálie
	ZAV/0411/00324/21	07.06.2021	24 851,46	0,00 spotřební materiál - míchátko, kit, frit only
	ZAV/0411/00333/21	08.06.2021	12 342,00	0,00 chemikálie
	ZAV/0411/00388/21	12.07.2021	5 360,30	0,00 chemikálie
	ZAV/0411/00393/21	12.07.2021	8 445,80	0,00 chemikálie
	ZAV/0411/00412/21	16.07.2021	5 082,00	0,00 materiál - septa, vial
	ZAV/0411/00415/21	20.07.2021	20 600,25	0,00 chemikálie
	ZAV/0411/00417/21	21.07.2021	9 158,49	0,00 chemikálie
	ZAV/0411/00444/21	09.08.2021	653,40	0,00 chemikálie - filtry 100 ks
	ZAV/0411/00474/21	23.08.2021	5 360,30	0,00 chemikálie - methanol
	ZAV/0411/00493/21	01.09.2021	1 923,90	0,00 chemikálie - kyselina octová
	ZAV/0411/00514/21	06.09.2021	22 320,86	0,00 pipetty
	ZAV/0411/00609/21	12.10.2021	30 173,53	0,00 materiál - tube, filter, ferrule, ...
	ZAV/0411/00637/21	20.10.2021	5 379,66	0,00 materiál
	ZAV/0411/00789/21	30.11.2021	727,00	0,00 materiál - samolepící PP
	ZAV/0424/00010/21	12.10.2021	-1 508,14	0,00 materiál
501 099	Spotřeba materiálu ostatní DU	167 828,72	0,00	167 828,72
501	Spotřeba materiálu	173 733,72	0,00	173 733,72
549 006	Jiné ostatní náklady mimoř.stip. DU			
	Počáteční stav	0,00		
	BAN/0802/24414/21	22.09.2021	11 913,00	0,00 2 mimořádné stipendium
	BAN/0971/00424/21	14.10.2021	12 000,00	0,00 1 mimořádná stipendia
549 006	Jiné ostatní náklady mimoř.stip. D	23 913,00	0,00	23 913,00
549	Jiné ostatní náklady	23 913,00	0,00	23 913,00
Náklady celkem		197 646,72	0,00	197 646,72



Výsledovka s očekávanými náklady  
Pohyby za období 01 - 12 / 2021

Pracoviště:	*****	Všechny vybrané analytiky
Činnost:	****	Všechny vybrané analytiky
Fullcost:	*****	Všechny vybrané analytiky
Zakázka:	2106	SV Biochemické testování metabolitů ...
Podzakázka:	***	Všechny podzakázky

Účet	Název účtu	Má dáti	Dal	Zůstatek
691 006	Provoz.dotace věda MŠMTspecifický výzkum			
	Počáteční stav		0,00	
MAN/0910/00007/21	15.02.2021	0,00	197 630,00	dotace MŠMT SVV
691 006	Provoz.dotace věda MŠMTspecif	0,00	197 630,00	197 630,00
691	Přijaté přís. mezi zúčt.mezi org.slc	0,00	197 630,00	197 630,00
	Výnosy celkem	0,00	197 630,00	197 630,00
	Účetní hospodářský výsledek:			-16,72
	Hospodářský výsledek včetně očekávaných nákladů:			-16,72

Účetní hospodářský výsledek za vybrané: -16,72

Hospodářský výsledek včetně očekávaných nákladů za vybrané: -16,72

Výběrová kritéria (omezení sestavy se řídí právy uživatele herrmma1 (uvedena v závorce))

Pracoviště: ( 04[45]90]\*|0447\* )

Činnost: ( \*\*\*|1210)

Fullcost:

Zakázka: 2106 ( \*|\* )

Podzakázka:

Zahrnuty všechny předpokládané náklady