

Průběžná výroční zpráva projektu specifického výzkumu v roce 2016, zakázka č. 2113

Název projektu: Studium vybraných expozičních zdrojů ochratoxinu A a prevalence ochratoxinu A, citrininu a aflatoxinu M1 v biologickém materiálu pacientů s diagnózou nádorů ledvin a vývodných močových cest

Specifikace řešitelského týmu

Odpovědný řešitel: RNDr. Jakub Toman

Studenti doktorského studia na UHK: -

Studenti magisterského studia na PřF UHK:

Bc. Kateřina Kotalová – 1. ročník NMgr. Systematická biologie a ekologie; S15BI005NP

Bc. Martin Šrámek - 2. ročník NMgr. Systematická biologie a ekologie; S14BI010NP

Další výzkumní pracovníci: doc. RNDr. František Malíř Ph.D.

doc. MVDr. Vladimír Ostrý, CSc.

Celková částka přidělené dotace: 225 527, - Kč

Datum zahájení řešení projektu: 1. 3. 2016

Předpokládané datum ukončení řešení projektu: 30. 11. 2017

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

a. Stanovení OTA ve vybraných farmaceutických bylinách a čajích a studium přechodu (transferu) OTA z vybraných farmaceutických bylin a čajů do nápojů, infuzí, nálevů, odvarů či tinktur

b. Komplexní analýza a studium prevalence nefrotoxických mykotoxinů (OTA, CIT, AM₁ a jejich metabolitů) v biologickém materiálu u pacientů s nádory ledvin a vývodných močových cest.

Odběr vzorků

a) Vzorky farmaceutických bylin byly odebrány v obchodní síti v ČR s využitím přístupu k odběru prováděném v tzv. „Total diet study“. Sběr vzorků *Astragalus mongholicus*, *Withania somnifera*, *Glycyrrhiza glabra*, *Curcuma longa*, *Zingiber officinale* a *Panax ginseng*. Výjimkou je *Lycium chinense*, probíhal v průběhu roku 2016, bylo vybráno několik sběrných míst a vzorky se odebíraly v různých gramážích a šaržích aby bylo docíleno různorodosti vzorků. Infuze, nálevy či odvary byly připraveny podle pokynů výrobce.

b) Nemocným jsou 48-24h před operací odebírány vzorky moče (24 h odběr) a dále krve; při operaci pak vzorky ledviny a nádorové tkáně. V rámci studie jsou vyšetřeny vzorky biologického materiálu od 50 pacientů obou pohlaví, nejlépe ve věku v rozsahu 40-65 let. Do studie jsou vybráni nemocní s nekomplikovaným průběhem operace, dále s nepřítomností metastáz a celkového metabolického rozvratu a konečně bez kardiovaskulárních komplikací. Na Etickou komisi FN HK byl předložen design studie a pro nemocné byly vypracovány následující dokumenty: informace pro nemocného, informovaný souhlas nemocného a konečně je zjišťována skladba (jídelníček) konzumovaných potravin během hospitalizace.

Sběr vzorků biologického materiálu není jednoduchý a stále na Urologické klinice FN v Hradci Králové probíhá.

Odběr a zpracování krve: 48-24 h před operací je pacientům odebráno celkem 25 ml krve (Pozn.: 1 x 15 ml celé krve bude zamrazeno. Ze zbylých 10 ml krve jsou získány cca 2 ml plazmy, zamrazeny na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následně odesílány do Německa). Odběr moče: 48-24 h před operací je pacientům odebrána moč. Diuréza u zdravého člověka činí cca 1,5 l moče/24h. Pozn.: Jednotlivé 24 h vzorky moče jsou dobře promíchány a rozdávkovány, následně zamrazeny a odeslány-a to dle schématu: 1 x 15 ml - Německo, 4 x 50 -60 ml moče - z toho: 1 x SZÚ Praha, pracoviště Brno, 1 x ZÚ Ústí n/L, pracoviště HK - NRL - vyšetření pH moče, kreatininu, objemu moče v ml a hmotností moče v g, 1 x zálohovaný vzorek (NRL HK- pro opakování separací). Odběr tkáně postižené ledviny tkáně nádoru: Při operaci jsou odebrány pacientům vzorky postižené ledviny a nádorové tkáně o hmotnosti (cca 1,5-3 g), uloženy v RIA laboratoři na OKB ve FN HK při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Stanovení OTA, ochratoxinů či metabolitů, CITa jeho metabolitu a aflatoxinu M1

a) Ve vzorcích farmaceutických bylin a čajů, dále nálevech, odvarech, infuzích či tinkturách z nich připravených byly stanoveny metodou HPLC-FLD po předchozím předčištění na fenylosilanových a následně imunoafinitních kolonkách (Zimmerlí & Dick, 1995; Entwisle et al., 2001).

b) Vyšetření OTA ve vzorcích moče nemocných metodou LC-MS/MS ve spolupráci se Státním zdravotním ústavem v Praze, Centrem zdraví, výživy a potravin v Brně, případně AFM1 v moči (ELISA) (doc. Ostrý), metodou HPLC-FLD vyšetření OTA a jeho metabolitů v krvi, tkáni postižené ledviny a nádoru ledvin, dále AFM1 v moči (Jager et al., 2014) - a to ve spolupráci s ZÚ Ústí nad Labem, pracoviště HK (ing. Roubal). V moči a krevní plazmě v Dortmundu budou stanoveny pomocí LC-MS/MS CIT a dihydrocitrinon (Leibniz Research Centre for Working Environment and Human Factors, Dortmund). Vzhledem ke zpracování biologického materiálu a mykotoxinů a zpracování AFM1 (dozorovaného ze Zákona 281/2002 Sb. SÚJB, Oddělení pro kontrolu zákazu chemických a biologických zbraní) budou separace a stanovení opět prováděny v NRL pro mykotoxiny při Zdravotním ústavu v HK či v NRC, SZÚ v Brně (ELISA). Tato pracoviště mají pro tuto práci vyhovující podmínky, oprávnění ze zákona, jsou dozorována SÚJB a navíc mají tyto metody akreditovány u ČIA, analyzují okružní mezilaboratorní vzorky, např. v rámci FAPAS z Velké Británie. Jejich výsledky jsou správné, přesné a validní.

Časový plán:

Stanovení OTA a jeho metabolitů v čajích a přechody byly dořešeny v r. 2016. V bylinách a přechody do bylinných nápojů byly řešeny částečně v roce 2016 a definitivně budou dořešeny až v tomto roce, tj. 2017. Stanovení OTA, dalších ochratoxinů a jejich metabolitů, dále citrininu, dihydrocitrinonu a aflatoxinu M1 budou řešeny hlavně v druhé části projektu (2017), jsou dlouhodobějšího charakteru a reálné výsledky budou prezentovány možná v tomto (2017), či spíše v dalším roce (2018) v rámci Ph.D. studia – v závislosti na odběru dostatečného počtu vhodných vzorků a získání relevantních naměřených dat.

Splnění cílů řešení a přínos projektu.

a) Stanovení OTA v čajích je ukončeno, a i nápoje z čaje připravené změřeny, transfer OTA zjištěn a výsledky jako článek poslány do impaktovaného časopisu (čekáme na vyjádření), zároveň výsledky prezentovány na zahraniční konferenci Mykotoxiny 2016 v Bratislavě. Stanovení OTA ve farmaceutických bylinách – vzorky sbírány a obsah OTA změřen, dále změřen i přechodový faktor do odvarů a tinktur z některých bylin, ve výzkumu a v další práci bude nutné ještě dále pokračovat. Dále byly dokoupeny další byliny (*Bacopa monnieri*) pro další stanovení OTA, screening již proběhl a odvary budou změřeny v rámci diplomové práce.

Ihned potom budou výsledky zpracovány do podoby impaktovaného článku. Dílčí výsledky byly již ale publikovány jako poster na 38th Mycotoxin Workshop v Berlíně.

b) Odběry vzorků jsou v současné době dokončovány, OTA v moči a krvi změřen a výsledky vyhodnoceny, stejně tak AM₁, CIT a HO-CIT. Dílčí předběžné výsledky budou publikovány jako poster na 39th Mycotoxin Workshop v Bydgoszci. Další měření vybraných metabolitů ochratoxinů proběhnou v rámci odborné stáže v Gottingenu na LC-MS-MS high resolution.

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. Uveďte, které další výstupy plánujete do konce řešení projektu.

Tab. 1 Sumář výstupů řešení projektu¹

Typ výstupu	Plán v žádosti o projekt	Splněno	Plán do konce projektu	Poznámka (např. vyšlo, přijato, v redakčním řízení apod.)
Počet obhájených dizertačních prací	1	-	-	v průběhu
Počet obhájených diplomových prací	2	-	2	oba studenti prodlužují
Počet Jimp (databáze WoS)	4(5)	2	4	2 vyšly, z toho 1 zatím pouze elektronicky, vyjde v 1. čísle roku 2017, 1 v řízení, 1 připravován k odeslání
Počet Jsc (databáze SCOPUS)				
Počet Jneimp (databáze ERIH PLUS)				
Počet Jrec (seznam českých rec. čas.)				
Počet B (odborná kniha)				
Počet C (kapitola v odborné knize)				
Počet D (článek ve sborníku)	2	2	2	
Poster na zahraniční konferenci	1	2	2	
Počet výsledků celkem	10(11)	6	10	

Podrobné zdůvodnění výdajů a doložení dodatečných žádostí o změnu rozpočtu:

¹ V případě, že vznikly typy výsledků neuvedené v tabulce, přidejte si do ní řádky. Přesná definice Definice jednotlivých typů výsledků viz Metodika hodnocení VaVaI

- a) **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,
- b) **stipendia** a jejich stručné zdůvodnění,
- c) **spotřební materiál** (výdaje na pořízení kancelářských potřeb a ostatního spotřebního materiálu) a jejich stručné zdůvodnění
- d) **drobný hmotný majetek** a jejich stručné zdůvodnění,
- e) **další náklady** a jejich stručné zdůvodnění,
- f) **náklady nebo výdaje na služby** a jejich stručné zdůvodnění,
- g) **doplňkové (režijní) náklady** nebo výdaje v souladu s příslušným řídicím aktem UHK,
- h) **cestovné** a jeho stručné zdůvodnění.

Podrobný rozpočet očekávaných výdajů:

	Položka	Částka
1) osobní náklady	Odměna vedoucímu doktorského studia	3 350,- Kč
2) stipendium	Stipendium 10 000,- navýšené o cestovné na konferenci 38th Mycotoxin Workshop – Berlín 2 900,- ; cestovné – odvoz vzorků do Brna 500,- ; ID - S14BI001DP, bankovní spojení: 107-3405850277/0100	13 400,- Kč
3) materiálové náklady	Kolona Inertsil ODS-3V, 150x4,6 mm, <i>po ukončení projektu zůstane v majetku KBiol a bude dlouhodobě využita k dalšímu výzkumu- provádění analýz.</i>	17 550,- Kč
a) hmotný majetek		
	Kolona ProntoSIL 120 C18 H, 3 µm, 250 x 4,0 mm, <i>po ukončení projektu zůstane v majetku KBiol a bude dlouhodobě využita k dalšímu výzkumu- provádění analýz.</i>	15 350,- Kč
	Držák předkolony (Phenomenex): Security Guard Guard Cartridge Kit Ea: 10ks, <i>po ukončení projektu zůstane v majetku KBiol a bude dlouhodobě využita k dalšímu výzkumu- provádění analýz.</i>	5 200,- Kč
	Předkolona (Phenomenex): Security Guard Cartridges C18, ID 4x3 mm, <i>po ukončení projektu zůstane v majetku KBiol a bude dlouhodobě využita k dalšímu výzkumu- provádění analýz.</i>	10 191,- Kč
	Třepačka Heidolph Reax Multi (pro centrifugační nádoby), <i>po ukončení projektu zůstane v majetku KBiol a bude dlouhodobě využita k dalšímu výzkumu- provádění analýz.</i>	39 204,- Kč
3) materiálové náklady	Suchý led – na přepravu biol. vzorků do zahraničí	500,- Kč
b) spotřební materiál		
	dusík, tř.č.5, 20 l tlaková lahev,	3 900,- Kč
	metanol 4 x 2,5 l; VWR, HPLC Gradient Grade	1 000,- Kč

	plastové nádoby sterilní PP pro objemy vzorků 50 x 15 ml a 50 x 50 ml	1 000,- Kč
	Ochraprep kolonky 1 balení - 50 ks	25 000,- Kč
	2x balení Citritest kolonky	20 000,- Kč
	2x Standart ochratoxinu B	12 500,- Kč
	Standart ochratoxinu α	6 250,- Kč
4) výdaje (náklady) na služby	Konferenční poplatek - 38th Mycotoxin Workshop – Berlín – odpovědný řešitel	2 800,- Kč
	Konferenční poplatek - 38th Mycotoxin Workshop – Berlín – vedoucí doktoranda	5 272,- Kč
	Ubytování v rámci konference 38th Mycotoxin Workshop – Berlín + městská daň – odpovědný řešitel	3 260,- Kč
	Poplatky za publikace	20 000,- Kč
	Transport biologických vzorků prostřednictvím společnosti DHL Express (zásilka se suchým ledem doručení do 12 hod následující pracovní den po odeslání) do Německa (Dortmund)	5 000,- Kč
	Tisk posteru pro 38th Mycotoxin Workshop	900,- Kč
5) cestovné	cestovné na konferenci 38th Mycotoxin Workshop – Berlín – vedoucí doktoranda	2 900,- Kč
	ubytování v rámci konference 38th Mycotoxin Workshop – Berlín + městská daň	3 900,- Kč
	diety během konference 38th Mycotoxin Workshop – Berlín - vedoucí doktoranda	4 200,- Kč
	ubytování v rámci konference Mykotoxíny 2016 – Bratislava - vedoucí doktoranda	1 700,-Kč
	cestovné na konferenci Mykotoxíny 2016 – Bratislava - vedoucí doktoranda	1 200,- Kč
		Celkem 225 527, - Kč

Výsledek čerpání finančních prostředků uveďte v jednotné přehledné tabulce 2.

Tab. 2 Čerpání finančních prostředků v Kč

Položka	Plán	Žádost o změnu rozpočtu	Skutečnost
Počet členů řešitelského týmu čerpajících mzdové prostředky	0	0	0
Počet studentů čerpajících mzdové prostředky	0	0	0
Stipendia	13 400,-	18 517,-	18 517,-
DPP, DPČ - studenti	0,-	0,-	0,-
Odměny, DPP, DPČ - ostatní	3 350,-	2 500,-	2 500,-
Zákonné zdravotní a sociální pojištění	0,-	850,-	860,50,-
Celkem osobní náklady	16 750,-	21 867,-	21 877,50,-
Spotřební materiál	87 495,-	109 150,57,-	110 857,53,-
Drobný hmotný majetek	70 150,-	35 905,-	36 550,-
Materiálové náklady celkem		145 055,57,-	147 407,53
Služby celkem	37 532,-	42 152,-	42 152,34
Cestovné celkem	13 600,-	13 990,-	13 990,-
Ostatní	0,-	2462,43,-	2 744,14,-
Celkové náklady	225 527,-	225 527,-	228 171,51,-

* V této sekci jsou shrnuty finance za bankovní poplatky, haléřové vyrovnání, kurzové ztráty apod.

Ke zprávě přiložte:

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

Datum: 3. 1. 2017

Podpis odpovědného řešitele

