

## Smlouva o spolupráci

uzavřená v souladu s ustanovením § 1746 odst. 2 zákona č. 89/2012 Sb., občanského zákoníku,  
v účinném znění

Níže uvedeného dne, měsíce a roku uzavřely smluvní strany:

### 1. Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně

státní příspěvková organizace

se sídlem: Pekařská 664/53, 656 91 Brno

IČ: 00159816

zastoupená: Ing. Vlastimilem Vajdákem, ředitelem

Odpovědné pracoviště: Mezinárodní centrum klinického výzkumu

kontaktní osoba: [REDACTED]

tel. + [REDACTED]

/dále jen „FNUSA“/

### 2. Ústřední vojenská nemocnice/Vojenská fakultní nemocnice Praha

se sídlem: U Vojenské nemocnice 1200, 169 02 Praha 6

IČ: 61383082

zastoupená: prof. MUDr. Miroslavem Zavoralem, Ph.D., ředitelem

Odpovědné pracoviště: Neurochirurgická a neuroonkologická klinika 1. LF UK a ÚVN

kontaktní osoba: [REDACTED]

tel. + [REDACTED]

/dále jen „Partner“/

### 3. Univerzita Palackého v Olomouci

se sídlem: Křížkovského 511/8, 779 00 Olomouc

součást: Lékařská fakulta UP

se sídlem: Hněvotínská 976/3, 779 00 Olomouc

IČ: 61989592

zastoupená: prof. MUDr. Josefem Zadražilem, CSc., děkanem

Odpovědné pracoviště: Ústav molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty

kontaktní osoba: [REDACTED]

tel. [REDACTED]

/dále jen „IMTM“/

tuto

**Smlouvu o spolupráci**  
(dále jako „smlouva“)

## Preambule

Smluvní strany spolu uzavírají tuto smlouvu o spolupráci za účelem řešení projektu s názvem „Klonální hematopoéza neznámého významu u cévní mozkové příhody“ (dále jako „projekt“). Činnost smluvních stran na projektu je popsána dále, přičemž spolupráce mezi smluvními stranami bude financována v rámci projektu Molekulární, buněčný a klinický přístup ke zdravému stárnutí –

ENOCH, reg. č. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000868 (smlouva č. Tsm/2018/442/Kr) a spolupráce bude probíhat také v rámci Czech Stroke Research Network.

#### **Náplň práce za FNUSA:**

FNUSA uhradí náklady na přepravu odebraných vzorků a poskytne Partnerovi přístup do eCRF (ClinData). Dále pak bude FNUSA s Partnerem spolupracovat v rámci Czech Stroke Research Network za podmínek stanovených samostatnou smlouvou.

#### **Náplň práce za Partnera:**

Partner provede odběr vzorků krve u pacientů dle vstupních a vylučovacích kritérií protokolu (příloha č. 1 smlouvy). Pacient je o odběru vzorků předem informován a podepisuje informovaný souhlas dle návrhu FNUSA a schválení Etické komise Partnera. Odběr vzorků nebude mít žádný vliv na poskytovanou léčebně preventivní péči. Vzorek je pseudonymizován.

#### **Náplň práce IMTM:**

IMTM zajistí potřebné zkumavky pro odběr vzorků u Partnera. IMTM dále provede laboratorní část projektu, kdy budou odebrané vzorky laboratorně zpracovány pomocí specializovaných metod molekulární biologie.

### **Článek I.**

1. Pacienti, kteří budou odpovědným pracovištěm Partnera vyhodnoceni jako vhodní pro účast v projektu, budou informováni o cílech projektu ošetřujícím lékařem. V případě souhlasu těchto pacientů s účastí v projektu, zajistí u těchto pacientů ošetřující lékař [REDACTED] podepsání informovaného souhlasu.
2. Odebraný vzorek krve (dále jen „vzorek“) od pacientů, kteří souhlasili se zařazením do projektu, poskytne Partner v souladu s touto smlouvou FNUSA a IMTM k další realizaci projektu. Partner vystupuje v projektu pouze jako dodavatel vzorků k další analýze.
3. Dodání vzorků Partnera musí být v souladu s povolením Etické komise Partnera (dále jako „EK Partnera“), přičemž v době podpisu této smlouvy je k dispozici písemný souhlas EK Partnera s projektem a informovanými souhlasy pacientů.
4. Informované souhlasy pacientů budou uloženy v archivované zdravotnické dokumentaci Partnera. Partner, zejména prostřednictvím hlavního zkušejícího a výzkumné sestry, zajistí získání tohoto souhlasu od jednotlivých pacientů k odběru, uchování a použití krve jim odebrané (klinických vzorků) pro účely realizace projektu.
5. Vzorky budou bezprostředně po odebrání vloženy do sterilních přepravních nádob, nejčastěji zkumavek a neprodleně přepraveny do výzkumné laboratoře IMTM, kde bude probíhat laboratorní část projektu. Vzorky budou laboratorně zpracovány pomocí specializovaných metod molekulární biologie.
6. IMTM se zavazuje zajistit Partnerovi potřebný materiál pro odběr vzorků a jeho dodání na pracoviště Partnera.
7. Vzorky budou ze strany Partnera předávány přepravní společnosti a odeslány do laboratoří IMTM po předchozí domluvě smluvních stran. FNUSA není odpovědná za ztrátu nebo škodu na vzorcích takto dodaných. Náklady na přepravu uhradí FNUSA, která také zvolí způsob přepravy a přepravní společnost, tak aby byly dodrženy všechny podmínky protokolu (příloha č. 1 smlouvy).
8. Vzorky budou zpracovány pseudonymizovaně, pod číselným kódem. Partner nebude FNUSA ani IMTM předávat žádné osobní údaje pacientů, od nichž byly vzorky odebrány, podle kterých by pacienti mohli být přímo identifikováni.



9. Vzorky budou smluvními stranami použity výhradně k provedení tohoto projektu. Pro umožnění interní či externí kontroly získaných výsledků (včetně reprodukovatelnosti dat) bude IMTM vzorky či produkty (materiály) z nich odvozené archivovat po dobu 10 let a poté budou zlikvidovány jako biologický odpad.
10. Smluvní strany se dohodly, že do projektu bude zařazeno maximálně 200 pacientů. Smluvní strany se dohodly, že projekt bude probíhat v anticipované době od **1. 1. 2021 do 30. 6. 2023**.

## **Článek II.**

1. Smluvní strany jsou při realizaci projektu povinny dodržovat příslušné právní předpisy České republiky, zejména zákon č. 89/2012 Sb., občanský zákoník, ve znění pozdějších předpisů, a zákon č. 372/2011 Sb., o zdravotních službách a podmínkách jejich poskytování, ve znění pozdějších předpisů (dále jen „ZZS“).
2. Smluvní strany jsou dále povinny se vzájemně bez odkladu informovat o skutečnostech a změnách, které mají nebo mohou mít vliv na uskutečnění projektu či dosažení účelu a cílů projektu a na tuto smlouvu.

## **Článek III.**

### **Ochrana osobních údajů**

1. Smluvní strany se zavazují dodržovat všechny příslušné právní předpisy České republiky včetně předpisů Evropské unie ve vztahu k ochraně osobních údajů. V rámci projektu jsou smluvní strany správci osobních údajů.
2. Každá smluvní strana bude odpovědná za své vlastní zpracování osobních údajů a zajistí, aby osobní údaje týkající se pacientů byly shromažďovány, uchovávány a předávány v souladu se všemi platnými nadnárodními a národními předpisy o ochraně osobních údajů a touto smlouvou.
3. Smluvní strany se zavazují přijmout taková opatření, aby nemohlo dojít k neoprávněnému nebo nahodilému přístupu k osobním údajům, k jejich změně, zničení či ztrátě, neoprávněným přenosům, k jejich jinému neoprávněnému zpracování, jakož i k jinému zneužití osobních údajů.
4. Data pacientů, respektive subjektů projektu, budou Partnerem v pseudonymizované podobě poskytnuty FNUSA a IMTM v souladu s informovaným souhlasem pacienta.
5. Partner bude FNUSA a IMTM předávat v pseudonymizované podobě následující informace týkající se pacientů:
  - vzorek označený kódem pacienta a datem a časem odběru;
  - klinická data – váha, výška, BMI, rasa, neurologické skóre, forma terapie a další klinická data, která se týkají onemocnění cévní mozkovou příhodou.
6. Zpracování osobních údajů bude probíhat po dobu účinnosti smlouvy. Tím nejsou dotčeny povinnosti smluvních stran jakožto správců osobních údajů uchovávat zpracovávané osobní údaje podle příslušných právních předpisů, zejména zákona č. 372/2011 Sb., o zdravotních službách a podmínkách jejich poskytování, ve znění pozdějších předpisů.
7. Jakmile smluvní strany pozbydou právní důvody pro zpracování osobních údajů podle platných právních předpisů a této smlouvy, dojde k likvidaci osobních údajů, a to tak, že bude ze strany Partnera nenávratně zničen klíč k propojení pseudonymizovaných údajů, takže subjekt údajů přestane být identifikovatelným.



8. Vzhledem ke způsobu předávání dat subjektů údajů, tedy v pseudonymizované podobě a nemožnosti jejich identifikace ze strany FNUSA a IMTM, se budou subjekty údajů pro uplatňování svých práv spojenými s ochranou osobních údajů obracet výhradně na Partnera. V případě odvolání souhlasu se zpracováváním osobních údajů ze strany subjektu údajů je Partner povinen informovat o této skutečnosti FNUSA a IMTM bez zbytečného odkladu, respektive jim sdělit kódové označení příslušného vzorku, ke kterému se toto odvolání vztahuje.
9. Smluvní strany se zavazují si navzájem hlásit každé porušení zabezpečení osobních údajů, a to bez zbytečného odkladu potom, co se o takovém porušení dozví, nejpozději do 24 hodin, tak, aby incidentem dotčená strana měla možnost incident posoudit a splnit své povinnosti vůči dozorovému úřadu, případně vůči subjektům údajů.
10. Smluvní strany se zavazují k vzájemné součinnosti a pomoci při řešení všech podstatných problémů, které mohou v rámci plnění smlouvy vzniknout v souvislosti s ochranou osobních údajů. Tato součinnost zahrnuje i efektivní spolupráci v případě kontroly ze strany dozorového úřadu, vyřizování žádostí a případných stížností pacientů, a oznamování bezpečnostních incidentů, a případných správních či soudních řízení.

#### **Článek IV. Publikace**

1. Partner bude na publikaci výsledku projektu, který bude publikován IMTM spolu s FNUSA, uveden jako spoluautor. Konkrétní osobou uvedenou na publikaci bude XXXXXXXXXX

#### **Článek V. Duševní vlastnictví a důvěrné informace**

1. Ačkoliv se nepředpokládá, že některá ze smluvních stran poskytne druhé smluvní straně jakékoliv duševní vlastnictví nebo práva k předmětu duševního vlastnictví, smluvní strany se dohodly, že pokud kterákoliv ze smluvních stran poskytne druhé straně pro spolupráci dle této smlouvy nehmotný majetek v podobě předmětů práv duševního vlastnictví v nejširším slova smyslu podle platné a účinné právní úpravy (vynález, užitečný vzor, know-how atd.), smluvní strany uzavřou smlouvu o poskytnutí práva k užívání předmětu duševního vlastnictví, která závazně pro smluvní strany určí práva a povinnosti k poskytnuté licenci, včetně licenční ceny (dále jen „licence“). Určená práva a povinnosti, podmínky a pravidla poskytnutí licence k předmětu duševního vlastnictví nesmí zakládat nedovolenou nepřímou státní podporu.
2. V případě ukončení spolupráce dle této smlouvy po dobu účinnosti licence smluvní strana přestane užívat duševní vlastnictví poskytnuté na základě licence druhou smluvní stranou a vrátí jí všechny hmotné nosiče, dokumenty a podklady poskytnuté druhou smluvní stranou za účelem užívání daného duševního vlastnictví, není-li výslovně v licenci ujednáno jinak. Smluvní strana zároveň zachová mlčenlivost o všech důvěrných skutečnostech a informacích týkajících se nebo souvisejících s duševním vlastnictvím poskytnutým druhou smluvní stranou za účelem spolupráce, které se dověděla v rámci realizace spolupráce dle této smlouvy nebo v souvislosti s ní, v souladu s podmínkami účinné licence.
3. Veškeré podklady, dokumentace, informace a výsledky výzkumu a vývoje, jež si smluvní strany mezi sebou za dobu trvání této smlouvy poskytnou, jsou obchodním tajemstvím či důvěrnou informací poskytovatele těchto podkladů a informací, ledaže by šlo o podklady, dokumentaci, informace a výsledky výzkumu a vývoje, (i) jež jsou nebo se stanou obecně známé, tj. běžné přístupné veřejnosti; nebo (ii) které smluvní strana získala od třetí osoby, a to nikoli v důsledku porušení této smlouvy, jiné smlouvy nebo obecně závazných právních předpisů smluvní stranou či třetí osobou. Smluvní strany se zavazují zacházet důvěrně s veškerým obchodním tajemstvím či důvěrnými informacemi druhé smluvní strany, ani je nepoužívat pro jiné účely, než stanovené v této smlouvě, ledaže k jejich poskytnutí je, nikoliv vlastním zaviněním, smluvní strana



zavázána na základě zákona nebo závazného pravomocného rozhodnutí soudu nebo orgánu veřejné správy. Povinnost dle tohoto odstavce bude pro strany závazná i po zániku této smlouvy, a to bez časového omezení, nepřestane-li být informace důvěrnou, nebo neuplyne-li doba ochrany předmětu práv.

4. Data získaná v rámci projektu jsou společným majetkem Partnera, FNUSA a IMTM.

#### **Článek VI. Financování**

1. Smluvní strany se dohodly, že spolupráce na základě této smlouvy bude probíhat mezi stranami bezplatně a každá smluvní strana si ponese své náklady. Materiál (zejm. nádoby a roztoky) nezbytný pro provedení odběrů vzorků za tímto účelem poskytne IMTM Partnerovi na své náklady, a to v množství potřebném pro spolupráci smluvních stran na základě této smlouvy a protokolu projektu, který je přílohou této smlouvy. Náklady na přepravu vzorků budou hrazeny FNUSA.

#### **Článek VII. Závěrečná ustanovení**

1. Tato smlouva nabývá platnosti dnem podpisu poslední smluvní strany a uzavírá se na dobu určitou, a to do 30. 6. 2023.
2. Smluvní strany berou na vědomí, že tato smlouva podléhá povinnému uveřejnění podle zákona č. 340/2015 Sb., o zvláštních podmínkách účinnosti některých smluv, uveřejňování těchto smluv a o registru smluv (zákon o registru smluv), ve znění pozdějších předpisů. Smlouva nabývá účinnosti dnem jejího uveřejnění v registru smluv. Uveřejnění zajistí IMTM a informuje o něm ostatní smluvní strany.
3. Každá ze smluvních stran je oprávněna kdykoliv ukončit tuto smlouvu i bez uvedení důvodu písemnou výpovědí doručenou druhé smluvní straně s výpovědní lhůtou, která činí 30 dnů po doručení výpovědi ostatním smluvním stranám. Tuto smlouvu lze také ukončit písemnou dohodou smluvních stran.
4. Změny, jakož i doplňky této smlouvy mohou být činěny pouze písemně a musí být podepsány smluvními stranami.
5. Nebude-li případně některá ze stran trvat na splnění povinnosti druhé smluvní strany ze smlouvy, nebude se to vykládat jako vzdání se jakéhokoliv práva touto smluvní stranou či práva žádat splnění této povinnosti. Žádné vzdání se práv vzniklých v důsledku porušení smlouvy nebude platné a účinné, pokud nebude sepsáno písemně a podepsáno smluvní stranou, jež se práv vzdává, a žádné vzdání se práv se nebude vztahovat na práva vzniklá v důsledku následného nebo jakéhokoliv jiného porušení smlouvy.
6. Tato smlouva je vyhotovena ve třech stejnopisech s platností originálu, z nichž každá smluvní strana obdrží po jednom vyhotovení.
7. Pokud se jakékoli ustanovení této smlouvy stane nebo ukáže, obecně či relativně, neplatným nebo neúčinným, nebude tím žádným způsobem dotčena platnost nebo účinnost ostatních ustanovení této smlouvy nebo dotčeného ustanovení nad rámec relativní neplatnosti nebo neúčinnosti.
8. Tato smlouva se řídí právními předpisy České republiky. Všechny spory, které vzniknou z této smlouvy nebo v souvislosti s ní, a které se nepodaří vyřešit přednostně smírnou cestou, budou rozhodovány obecnými soudy České republiky.

9. Smluvní strany shodně prohlašují, že tato smlouva byla uzavřena na základě jejich pravé, svobodné a vážné vůle, nikoliv v tísní nebo za jinak jednostranně nevýhodných podmínek a podpisem této smlouvy potvrzují, že se dobře seznámily s textem této smlouvy a že se cítí být jejím obsahem plně vázány. Na důkaz souhlasu s obsahem této smlouvy připojují smluvní strany své vlastnoruční podpisy.

10. Nedílnou součástí této smlouvy je také její příloha č. 1 – Protokol Studie s názvem Klonální hematopoéza neurčeného potenciálu při ischemické mozkové příhodě.

V Brně dne 02. 08. 2021

Za FNUSA:

Ing. Vlastimil Vajdák  
ředitel

V Praze dne 23 -07- 2021

Za Partnera:

Prof. MUDr. Miroslav Zavoral,  
Ph.D.  
ředitel

V Olomouci dne - 5 -08- 2021

Za IMTM:

prof. MUDr. Josef Zadražil,  
CSc.  
Děkan

*Clonal hematopoiesis of indeterminate potential in ischemic stroke*

---

**Protocol outline**

**Last version: March, 2021**

**Authors:**

ICRC/FNUSA, Brno: [REDACTED]

IMTM, Olomouc: [REDACTED]  
[REDACTED]

**Background**

Recently, it was demonstrated that clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP) is associated with the risk of coronary heart disease or early-onset myocardial infarction. Further, causality between CHIP and atherosclerosis was established in atherosclerosis-prone mice that were transplanted with bone marrow from Tet2 knockout and from control mice. As compared with mice that had received control bone marrow, mice that had received bone marrow from the Tet2 knockout mice had a median lesion size in the aortic root that was twice as large after 5 weeks (NEJM 2017).

Hence, the data imply that somatic mutations in hematopoietic cells may contribute to the development of human atherosclerosis. Of note, hematopoietic cell clones are rare in persons younger than 40 years, but they occur in more than 10% in the population above 70 years (NEJM 2014).

The relationship between CHIP and risk of ischemic stroke has not been explored in details but is highly clinically relevant for several reasons. First, many patients with stroke do not have clear cause of the stroke or traditional risk factors present. Also, many patients with carotid atherosclerosis never have stroke implying that atherosclerosis itself may not be enough to produce atherothrombosis and vascular event.

**Hypothesis**

For this project we propose to study such relationship and explore one or several of the following hypotheses:

Hypothesis 1: Clonal hematopoiesis is associated with carotid atherosclerosis generally.



Hypothesis 2: Clonal hematopoiesis is associated with *symptomatic* carotid atherosclerosis in the Czech population.

Hypothesis 3: Clonal hematopoiesis is associated with ischemic stroke.

Hypothesis 4: Clonal hematopoiesis is more frequent in leucocytes fixed to endothelium affected by carotid atherosclerosis as compared to circulating leucocytes or unaffected endothelium.

Hypothesis 5: Clonal macrophages/monocytes as leucocyte subtype have a major role in atherosclerosis build-up. They are more frequently present in the atherosclerotic plaque compared to the peripheral blood.

Hypothesis 6: Occurrence of clonal hematopoiesis leads to stroke in patients with pre-existing carotid atherosclerosis.

### **Objectives and purpose of the study**

- To examine the association between clonal hematopoiesis of CHIP type and carotid atherosclerosis.
- To identify new risk factors of ischemic stroke.
- To clarify in more detail to what extent clonal hematopoiesis affects etiopathogenesis of atherosclerosis.

### **Methods**

There are several important considerations for the study design:

1) Even if CHIP is associated with stroke or is causing stroke, it is not clear how exactly and to what extent. Therefore, several hypotheses are possible that would require different design especially in terms of definition of patient population.

2) Limit of detection for gene panel sequencing of leucocyte subsets and FACS performance are not established and must be tested.

3) Sample size to detect a difference of CHIP between two patients' populations will depend on CHIP frequency in these two groups. Such frequency is unknown and could be only extrapolated from very limited data - see table 1 below. Therefore, before conducting properly powered study, more information on expected CHIP frequency in different groups of ischemic stroke patients is needed.

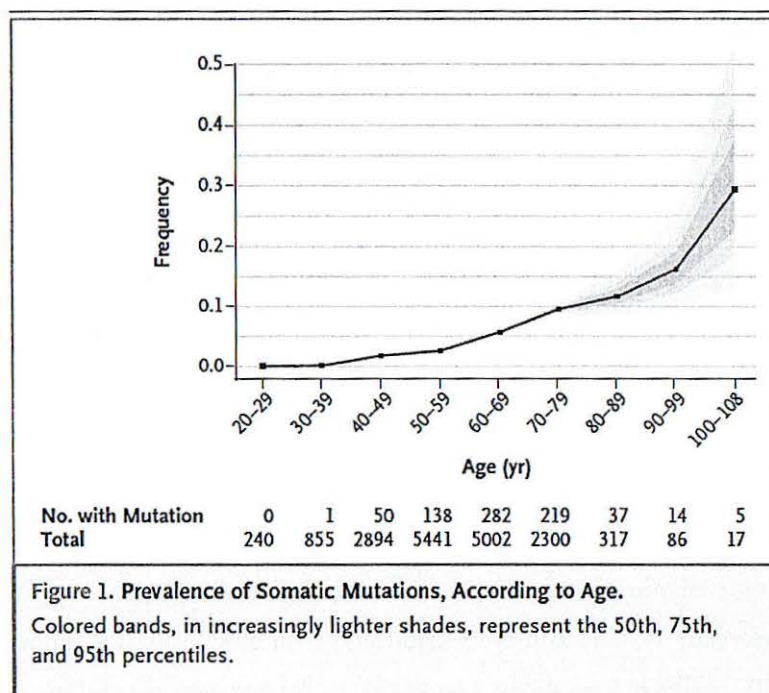


4) It is expected that for properly powered study, sample size of around 1000 patients will be needed. Therefore, project must be co-funded with finances from other grant and patient enrollment rate must be sufficient.

**Table 1** documents frequency of CHIPS in patients with atherosclerosis and controls. Also, it calculates sample size that would be needed to detect such a difference.

Study	Outcome	CHIP positivity Atherosclerosis present	CHIP positivity Atherosclerosis absent	Sample size of one group needed to detect the difference with Alfa 5% and power 80%
Bioimage	CAD	17%	10%	371
MDC	CAD	7%	4%	903
AVTB	MI early onset	2%	1%	2316
PROMIS	MI early onset	2%	1%	2316

5) Prevalence of CHIP is low in patients below 70 (see figure 1 below). Therefore, studying CHIP in patients below 70 would require increase of sample size. Excluding patients below 70 will, as a tradeoff, decrease patients' enrolment.



**Given the considerations above, we propose to proceed in at least two stages. The first stage** will be a set of exploratory studies, underpowered, with pragmatic sample size (25-50 patients per group), and with the main goal to optimize DNA extraction, sequencing method, and FACS method and to detect signal for difference between two patients groups.

Total number of patients enrolled in the first phase would be 100-200. Up to 25 tissue samples will be also analyzed.

**In the second stage**, we will run properly powered single center study with aim to detect statistical difference between two patients' groups. Previous exploratory study will help us to focus on patients' groups that will most likely prove the hypothesis. It is estimated based on previous data that around 1000 of patients will be needed.

### **Design of the first exploratory study**

One purpose of the exploratory study will be to obtain knowledge on the biology mechanisms of CHIP and atherosclerosis. Therefore, tissue samples obtained during vascular surgeries will be tested for presence of CHIP positive macrophages/monocytes within atherosclerotic plaques.

In line with the second goal, data from four groups of patients will be collected, 25-50 patients per group. Goal is to prioritize hypothesis testing, increase precision of sample size calculation, and estimate/optimize rate of patients' recruitment.

We will enroll patients older than 70 years. Only patients with ischemic strokes in anterior circulation will be included (no transitory ischemic attacks). The patients will be divided into 4 groups and in each group will be enrolled 25-50 patients:

- Patients with a carotid stenosis (symptomatic carotid stenosis  $\geq 50\%$  according to NASCET criteria) who suffered an ischemic stroke. Etiology - TOAST 1.
- Patients with asymptomatic carotid stenosis  $\geq 50\%$  according to NASCET criteria.
- Patients with no carotid atherosclerosis or carotid stenosis  $\leq 30\%$  who suffered an ischemic stroke. Etiology - TOAST 2 and 3.
- Patients without ischemic stroke in their medical history and with no carotid atherosclerosis or carotid stenosis  $\leq 30\%$ .

In addition, in the first group we will obtain tissue samples of atherosclerotic plaque and the surrounding tissue from carotid endarterectomy. The aim is to determine if in atherosclerotic plaque there is increased presence of CHIP positive leucocytes compared to leucocytes circulating in



peripheral blood. Subsequently, we will test if there is a difference in CHIP in endothelial cells presented in AS plaque compared to the endothelium unaffected by the atherosclerosis.

### **Obtaining the biological samples and pre-analytical phase**

For DNA sequence analysis from whole blood samples, 10 ml of peripheral blood will be drawn into Cell-Free DNA BCT CE tube (Streck). Before posting, Streck tubes will be stored at a room temperature and send to Olomouc within a week of blood drawing.

To obtain defined cell population (macrophages/monocytes and/or circulating endothelial cells, and endothelial progenitor cells), we will use FACS flow cytometry approach (BD/Beckman Coulter). 5 ml of peripheral blood will be drawn into Cyto-Chex BCT tubes (Streck) for immune cells. When rare populations of endothelial cells will be analyzed 10 ml of peripheral blood will be drawn. Streck tubes will be stored at a room temperature and send to Olomouc within a week of blood drawing.

For plaque analysis : 5\*5\*5 mm of endothelial/plaque tissue will be stabilized by placing into 1000 µl of stabilization solution (RNA later or Allprotect Tissue Reagent) at a room temperature and send to lab for processing within week. The rest of the tissue will be placed to buffered 4% formaldehyde solution and send for processing to Olomouc.

To detect CHIP related mutations, we will use MPS approach using a panel of frequently mutated genes, defined in literature (Jaiswal 2014, 2017). Illumina MPS platform will be using amplicon based enrichment library preparation with unique molecular indices.

All needed instruments are readily available in IMTM. Stabilization reagents, solution and tubes for blood will be provided by UMTM

### **Outcome measures**

FACS – fraction of blood elements.

MPS – presence of known variants with association to atherosclerosis, or known causal variants in a defined (sub)set of cells.

### **Ethical considerations:**

Patient samples, after consenting to the processing of biological material, will be handled in accordance with Regulation 2016/679 of the European Parliament and of the Council (EU) of 27 April 2016 on the protection of individuals with regard to the processing of personal data and on the free movement of such data and cancelling the Directive 95/46 / EC (General Data Protection Regulation; hereinafter referred to as 'GDPR') and in accordance with the relevant national rules on personal data

protection. The medical facility will keep the medical documentation according to the legal regulations (Act No. 372/2011 Coll., On health services and conditions of their provision, Regulation No. 98/2012 Coll., On medical documentation, etc.), and the processing of personal data in health services. For the purpose of processing personal data in the field of science and research, it is governed by the relevant legal regulations (Act No. 378/2007 Coll., On Pharmaceuticals and on Amendments to Certain Related Acts, Regulation No. 226/2008 Coll., On Good Clinical Practice and Closer Conditions of Clinical evaluation of medicinal products). Informed consent by the trial subject, either a patient or a volunteer involved in a particular research study will be obtained and the processing of personal data associated with this research will primarily be based on his consent. Informed consent is signed by the subject (its legal representative) during enrolling the patient into study. The informed consent includes, in addition to personal data, the intended purpose of the research and its possible risks and the impact on the health of the person. Further treatment of biological material after its use in the study is described as well.

#### **Data analysis**

Percentual distribution of particular blood elements using FACS.

Primary and secondary analysis of MPS data, with list of frequencies of detected variants associated with CHIP.

#### **Study financing**

Research project is funded from grant resources - ENOCH

#### **Attachments:**

Informed consent

#### **References**

1. Gibson CJ, Steensma DP: New Insights from Studies of Clonal Hematopoiesis. *Clin Cancer Res* 2018, 24:4633–4642.
2. Li F, Wu X, Zhou Q, Zhu DW: Clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP): A potential contributor to atherosclerotic cardio/cerebro-vascular diseases? *Genes & Diseases* 2018, 5:75–76.
3. Jaiswal S, Natarajan P, Silver AJ, Gibson CJ, Bick AG, Shvartz E, McConkey M, Gupta N, Gabriel S, Ardissino D, Baber U, Mehran R, Fuster V, Danesh J, Frossard P, Saleheen D, Melander O, Sukhova GK, Neuberg D, Libby P, Kathiresan S, Ebert BL: Clonal Hematopoiesis and Risk of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *New England Journal of Medicine* 2017, 377:111–121.



4. Fuster JJ, MacLauchlan S, Zuriaga MA, Polackal MN, Ostriker AC, Chakraborty R, Wu C-L, Sano S, Muralidharan S, Rius C, Vuong J, Jacob S, Muralidhar V, Robertson AAB, Cooper MA, Andrés V, Hirschi KK, Martin KA, Walsh K: Clonal hematopoiesis associated with TET2 deficiency accelerates atherosclerosis development in mice. *Science* 2017, 355:842–847.
5. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, Lindsley RC, Mermel CH, Burt N, Chavez A, Higgins JM, Moltchanov V, Kuo FC, Kluk MJ, Henderson B, Kinnunen L, Koistinen HA, Ladenvall C, Getz G, Correa A, Banahan BF, Gabriel S, Kathiresan S, Stringham HM, McCarthy MI, Boehnke M, Tuomilehto J, Haiman C, Groop L, Atzmon G, et al.: Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes. *New England Journal of Medicine* 2014, 371:2488–2498.
6. Khot UN, Khot MB, Bajzer CT, Sapp SK, Ohman EM, Brener SJ, Ellis SG, Lincoff AM, Topol EJ: Prevalence of conventional risk factors in patients with coronary heart disease. *Jama* 2003, 290:898–904.