

S M L O U V A

Fakultní nemocnice Hradec Králové

se sídlem: Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové – Nový Hradec Králové

IČ: 00179906, DIČ: CZ00179906

zastoupená: prof. MUDr. Vladimírem Paličkou, CSc., dr.h.c., ředitelem

dále jen „Fakultní nemocnice“

na straně jedné

a

Univerzita Pardubice

veřejná vysoká škola zřízená zákonem

se sídlem Studentská 95, 532 10 Pardubice

IČ: 00216275, DIČ: CZ00216275,

zastoupená: prof. Ing. Jiřím Málkem, DrSc., rektorem,

dále jen „Spoluřešitel“

na straně druhé

uzavírají na základě ustanovení § 1746 odst. 2 zákona č. 89/2012 Sb., občanského zákoníku, v platném znění

smlouvu o spolupráci při řešení projektu výzkumu a vývoje:

Článek I

Účel smlouvy

Účelem této smlouvy je vytvoření podmínek pro spolupráci Fakultní nemocnice a Spoluřešitele při realizaci projektu s názvem: „Proteomická analýza obsahu exosomů v kontextu intra-amniotického zánětu u PPRM“ (dále jen „projekt“). Příhláška projektu tvoří Přílohu č. 1 této smlouvy.

Článek II

Předmět smlouvy

Předmětem této smlouvy je úprava závazků smluvních stran k zajištění spolupráce při realizaci projektu, jehož cílem bude zavedení metodiky pro izolaci exosomů z plodové vody, pokročilá charakterizace izolovaných exosomů, proteomická analýza exosomálního obsahu a pilotní komparativní analýzy exosomálních proteinů ve vztahu k intra-amniotickému zánětu u PPRM. Očekávané výsledky projektu budou publikovány v časopise s impact factorem a rovněž bude zváženo podání společného grantu.

Článek III

Doba realizace projektu

Projekt bude realizován v období od 1.2.2022 do 31.12.2022; v tomto období smluvní strany provedou výkony uvedené v čl. IV.

Článek IV

Plánované výkony smluvních stran

1. Fakultní nemocnice provede následující výkony:
 - a. Výběr základní metody pro izolaci exosomů z plodové vody.
 - b. Pilotní experimenty s cílem charakterizovat exosomy
 - c. Optimalizace protokolu pro izolaci exosomů z plodové vody
 - d. Přenos protokolu i pro další biologické matrice (lidská plazma, moč)
 - e. Pokročilá charakterizace exosomů pomocí TEM
 - f. Analýza proteinů pomocí LC-MS
 - g. Pilotní analýzy exosomálních proteinů v plodové vodě ve vztahu k intra-amniotickému zánětu u PPRM
 - h. pokročilá charakterizace exosomů u této skupiny pacientek
 - i. Dokončení proteomických analýz
 - j. Příprava publikace a podkladů pro návrh na navazující grant
2. Spoluřešitel provede následující výkony:
 - a. Optimalizace podmínek pro charakterizaci izolovaných exosomů metodou dynamického rozptylu světla (DLS)
 - b. Ověření účinnosti izolace a čistoty exosomů metodou DLS
 - i. Průběžná analýza a kontrola vybraných vzorků exosomů metodou DLS

Článek V

Náklady na realizaci projektu a jejich úhrada

1. Náklady na realizaci projektu podle této smlouvy si každá ze smluvních stran hradí z vlastních zdrojů či z poskytnutých dotací nebo grantů na základě vlastního uvážení a s důrazem na hospodárnost a účelovost vynaložených nákladů. O vynaložených nákladech si každá strana vede vlastní oddělenou evidenci vynaložených nákladů pro účely případného řešení výše majetkových podílů na společně vzniklých předmětech duševního vlastnictví. Schválený rozpočet projektu je Přílohou č. 2 této smlouvy.

Článek VI

Povinnosti smluvních stran

1. Smluvní strany vzaly na vědomí, že za účelem naplnění spolupráce dle potřeby obdrží jedna smluvní strana od druhé smluvní strany informace, a to v ústní či písemné podobě, či ve formě zachycené jinými technickými prostředky, resp. ve formě výrobku či jeho návrhu (prototypu apod.).
2. Pokud budou tyto považovány za informace důvěrného charakteru, bude tato skutečnost stranami písemně vzájemně při jejich předání potvrzena. Tyto informace nemohou být bez písemného souhlasu smluvních stran předávány a využívány třetí stranou.
3. Smluvní strany se zavazují chránit tyto důvěrné informace (dále též „Informace“), zejména se zavazují zachovávat důvěrnost poskytnutých Informací a nezneužít tyto ve svůj prospěch nebo ve prospěch jiné osoby; použít tyto pouze pro účel, pro něž budou poskytnuty, nepřístupnit bez předchozího písemného souhlasu poskytující smluvní strany tyto Informace třetí osobě.
4. Závazek ochrany důvěrných Informací se nevztahuje na Informace, které smluvní strana získala z veřejně dostupného zdroje (nebo od třetí osoby), a při jejich získání nedošlo k protiprávnímu jednání smluvní strany (nebo této třetí osoby); nebo byly uveřejněny a staly se všeobecně přístupnými veřejnosti bez porušení této smlouvy smluvní stranou; nebo v době

zpřístupnění smluvní straně byly této smluvní straně známy bez omezení, což tato smluvní strana může doložit, a při jejich získání nedošlo k protiprávnímu jednání smluvní strany; nebo byly z takové ochrany vyloučeny s předchozím písemným souhlasem Informaci poskytující smluvní strany; nebo je nutné je zpřístupnit podle zákona, soudního či obdobného rozhodnutí.

5. Obě smluvní strany se zavazují při realizaci projektu postupovat co nejúčelněji, organizovat práce tak, aby bylo dosaženo cílů projektu, a to v plánované době, a na požádání informovat druhou smluvní stranu o stavu prací na projektu.

Článek VII

Práva k výsledkům projektu a jejich využití

1. Pokud bude výsledek vytvořený při plnění této smlouvy společnou tvůrčí prací zaměstnanců obou smluvních stran na úrovni vynálezu dle zákona č. 527/1990 Sb., o vynálezech a zlepšovacích návrzích, v platném znění, nebo technického řešení dle zákona č. 478/1992 Sb., o užitných vzorech, v platném znění, stanou se obě smluvní strany spoludávajícími práv k tomuto vynálezu nebo technickému řešení.
2. Vytvořil-li původce vynález nebo technické řešení ke splnění úkolu z pracovního poměru k zaměstnavateli, přechází právo na patent nebo užitný vzor na zaměstnavatele. Právo na původcovství tím není dotčeno.
3. Smluvní strany se zavazují zajistit, aby původci vynálezu nebo technického řešení, které vytvoří ke splnění úkolu z pracovního poměru k zaměstnavateli při plnění této smlouvy, písemně vyrozuměli svého zaměstnavatele o jeho vytvoření a zároveň zaměstnavateli předali podklady potřebné k jeho posouzení, a to bez zbytečného odkladu, tak aby byla zajištěna dostatečná ochrana duševního vlastnictví.
4. Jakákoli smluvní strana je v případě vytvoření vynálezu nebo technického řešení při plnění této smlouvy povinna tuto skutečnost písemně oznámit druhé smluvní straně, a to před podáním přihlášky vynálezu nebo užitného vzoru. Smluvní strany se zavazují zachovávat mlčenlivost o sděleném obsahu vynálezu nebo technického řešení.
5. Smluvní strany se zavazují po uplatnění práva na společný patent nebo užitný vzor uzavřít smlouvu o spoluvlastnictví práv k vynálezu nebo technickému řešení, v níž zejména upraví výši svých spoluvlastnických podílů k vynálezu nebo technickému řešení, dále postup při zpracování a podání přihlášky vynálezu nebo užitného vzoru a také výši podílů na úhradě nákladů a přínosech z využití vynálezu nebo technického řešení. Smluvní strany se dohodly, že při stanovení podílu k vynálezu nebo technickému řešení budou vycházet z podílu jejich zaměstnanců na tvůrčí práci při vytvoření vynálezu nebo technického řešení.
6. Pokud bude vynález nebo technické řešení vytvořené vlastní tvůrčí prací zaměstnanců pouze jedné ze smluvních stran, bude majitelem práv k tomuto vynálezu nebo technickému řešení pouze ta smluvní strana, jejíž zaměstnanci budou původci tohoto vynálezu nebo technického řešení.
7. Jednotlivé druhy výsledků budou vykazovány v souladu s vládou schválenou Metodikou hodnocení výzkumných organizací a programů účelové podpory výzkumu, vývoje a inovací („M17+“)
8. Případný hmotný majetek, který smluvní strana vytvoří či získá při společné spolupráci dle této smlouvy, resp. zejména následných dle ní uzavřených smluv. (zkušební zařízení, měřicí

přístroje, výrobní zařízení apod.), a který pořídí z vlastních finančních prostředků, bude ve vlastnictví příslušné smluvní strany. Pokud se na pořízení nebo vytvoření tohoto majetku budou finančně podílet smluvní strany společně, budou spoluvlastníky v poměru stanoveném v písemné dohodě.

9. V případě společných publikací bude podíl na výsledcích určen uvedením autorů jednotlivých publikací, případně vzájemnou dohodou všech spoluautorů u každého konkrétního výsledku.

Článek VIII Odborní řešitelé projektu

Na realizaci projektu se budou za smluvní strany podílet odborní řešitelé takto:

a) za Spoluřešitele -

b) za Fakultní nemocnici -

Článek IX Ostatní ujednání

1. Předmět řešení projektu podléhá obchodnímu tajemství.
2. Smluvní strany se zavazují, že budou postupovat v souladu s oprávněnými zájmy druhé smluvní strany, a že uskuteční veškeré právní úkony, které se ukáží být nezbytné pro naplnění této smlouvy. Závazek součinnosti smluvních stran se vztahuje pouze na takové úkony, které přispějí či mají přispět k dosažení účelu této smlouvy. Zároveň smluvní strany prohlašují, že jim na jejich straně není známa skutečnost bránící naplnění této smlouvy.
3. Jestliže se smluvní strany dostanou do sporu, zavazují se, že budou přístupné k dalšímu jednání a možnosti vyřešení sporu dohodou. Jestliže dohoda nebude možná, rozhodne na návrh kterékoliv smluvní strany příslušný soud.
4. V případě, že určité ustanovení smlouvy je neplatné, tato dílčí neplatnost nemá vliv na platnost ostatních ustanovení smlouvy a smlouva zůstává nadále platnou.
5. Pro komunikaci a doručování dokumentů, nejsou-li zákonem vyžadovány v listinné podobě anebo stanoví-li tak tato smlouva, je možno užívat i elektronickou poštu s potvrzením o doručení (e-mail s doručenkou) na tyto e-mailové kontakty:
 - a) e-mail Fakultní nemocnice
 - b) e-mail Spoluřešitele:
6. Tato smlouva se uzavírá na dobu určitou, a to dle čl. III.
7. Tato smlouva se vyhotovuje ve čtyřech stejnopisech, každý s platností originálu, přičemž každá smluvní strana obdrží po dvou z nich.
8. Veškeré změny a doplňky této smlouvy mohou být prováděny pouze formou písemných a očíslovaných dodatků, podepsaných oběma smluvními stranami.
9. Tato smlouva nabývá platnosti a účinnosti dnem jejího podpisu oběma smluvními stranami...

8. Smluvní strany prohlašují, že tuto smlouvu přečetly, že byla uzavřena po vzájemném projednání podle jejich pravé a svobodné vůle, určitě, vážně a srozumitelně, nikoliv v tísni za nápadně nevýhodných podmínek, a na důkaz svého souhlasu s jejím obsahem pod ní připojují své podpisy.

V Hradci Králové dne 04. 02. 2022

prof. MUDr. Vladimír Paněka, CSc., DrSc.
ředitel FN HK

Fakultní nemocnice Hradec Králové

ředitelství

Sokolská 581

500 05 Hradec Králové – Nový Hradec Králové

IČ 00179906, tel. 4905833380

V Pardubicích dne 26. 01. 2022

prof. Ing. Jiří Málek, DrSc.
rektor



Univerzita Pardubice
532 10 Pardubice, Studentská 95

INTERNÍ GRANTOVÁ SOUTĚŽ FN HK 2022**PŘIHLÁŠKA (textová část)**

o podporu na řešení projektů zdravotnického výzkumu a vývoje naplňujících vyhlášený Program na podporu zdravotnického aplikovaného výzkumu na léta 2020 – 2026.

Poskytovatel podpory	Fakultní nemocnice Hradec Králové				
Název projektu	Proteomická analýza obsahu exosomů v kontextu intra-amniotického zánětu u PPRM				
Prioritní oblast výzkumu	S věkem spojená onemocnění – garant [REDACTED]				
Řešitelský tým	jméno	pracoviště	telefon	email	Pracovní kapacita pro projekt/%
Hl. řešitel (PI)	[REDACTED]	Centrum biomedicínského výzkumu	Kl.2017	rudolf.kupcik@fnhk.cz	30%
Odborní spolupracovníci ve FN HK (max. 5)	[REDACTED]	Porodnická a gynekologická klinika	x	x	15%
	[REDACTED]	I. interní kardiologická klinika	x	x	15%
	[REDACTED]	Centrum biomedicínského výzkumu	x	x	15%
	[REDACTED]	Centrum biomedicínského výzkumu	x	x	10%
	[REDACTED]		x	x	
Spolupracující instituce					
Spoluřešitel (Co-PI)					
Publikační aktivity řešitelského týmu (uveďte maximálně 5 nejlepších publikovaných výsledků řešitele za poslední 3 roky, minimálně 2 s IF)					
č.	Název v souladu s normou ČNS ISO 690 A ČNS ISO 690-2			IF	
1	KURZAWA-AKANBI, Marzena, Seshu TAMMIREDDY, Ivo FABRIK, et al., 2021. Altered ceramide metabolism is a feature in the extracellular vesicle-mediated spread of alpha-synuclein in Lewy body disorders. <i>Acta Neuropathologica</i> . ISSN 0001-6322.			17.088	
2	ONDREJ, Martin, Pavel REHULKA, Helena REHULKOVA, Rudolf KUPCIK a Ales TICHY, 2020. Fractionation of Enriched Phosphopeptides Using pH/Acetonitrile-Gradient-Reversed-Phase Microcolumn Separation in Combination with LC-MS/MS Analysis. <i>International Journal of Molecular Sciences</i> . 21(11), 3971. ISSN 1422-0067.			5.923	
3	VAJRYCHOVÁ, Marie, Jaroslav STRÁNÍK, Kristýna PIMKOVÁ, et al. 2020. Comprehensive proteomic investigation of infectious and inflammatory changes in late preterm prelabour rupture of membranes. <i>Scientific Reports</i> . 10(1), 17696. ISSN 2045-2322.			4.379	
4	VAJRYCHOVÁ, Marie, Barbora SALOVSKA, Kristýna PIMKOVA, Ivo FABRIK, Vojtech TAMBOR, Alexandra KONDELOVA, Jiri BARTEK a Zdenek			9.986	

	HODNY, 2019. Quantification of cellular protein and redox imbalance using SILAC-iodoTMT methodology. <i>Redox Biology</i> . 24 , 101227. ISSN 2213-2317.	
5	KUPCIK, Rudolf, Jan M. MACAK, Helena REHULKOVA, et al. 2019. Amorphous TiO ₂ Nanotubes as a Platform for Highly Selective Phosphopeptide Enrichment. <i>ACS Omega</i> . 4 (7), 12156–12166. ISSN 2470-1343.	2.870
Popis projektu		
Klíčová slova (anglicky)	Exosome, amniotic fluid, intra-amniotic inflammation, PPRM, LC-MS, proteomics	
Abstrakt	<i>Exosomy jsou extracelulární vezikuly endosomálního původu o průměrné velikosti 100 nm, které jsou tvořeny uvnitř buňky a následně sekretovány do extracelulárního prostoru. Jsou biologicky aktivními prostředníky mezibuněčné komunikace nesoucí signalizační molekuly v podobě proteinů, lipidů a nukleových kyselin (DNA, mRNA, microRNA, lncRNA aj.). Exosomy jsou sekretovány všemi typy buněk a jsou přítomné v biologických tekutinách, jako je moč, periferní krev, plodová voda, mozkomíšní mok a sliny (1). V posledních letech byla zdůrazněna role exosomů v rozvoji intra-amniotického zánětu u předčasného porodu v souvislosti s transportem proteinů sekretovaných senescentními buňkami plodových membrán, které setrvávají v G1, případně G2 fázi buněčného cyklu a již se dále nedělí. Jedná se o tzv. sekreční fenotyp spojený se senescencí (SASP). Mezi SASP proteiny patří, mimo jiné, také mediátory neinfekční prozánětlivé odpovědi, tzv. alarminy (2,3). Díky enkapsulaci v exosomech jsou alarminy chráněny před degradací proteolytickými enzymy, post-translačními modifikacemi, které snižují jejich stabilitu, a zároveň jsou transportovány do decidua, myometria a cervixu. Zde exosomy fúzí s buňkami cílových tkání, zvyšují potenciál prozánětlivé odpovědi a stimulují děložní dutinu k zahájení porodní aktivity (2).</i> <i>Předčasný porod je celosvětově nejčastější příčinou úmrtí dětí mladších pěti let. Podstatná část předčasných porodů je klasifikována jako předčasný odtok plodové vody (PPROM), který je ve třetině případů komplikován přítomností bakteriálních patogenů v amniotické dutině a/nebo rozvojem subklinického intra-amniotického zánětu. Intra-amniotický zánět je vysoce rizikovým faktorem z hlediska rozvoje systémové fetální zánětlivé reakce a neonatální novorozenecké sepse. Diagnostika intra-amniotické infekce a zánětu je v současné době založena na průkazu bakteriálních agens metodami kultivace a PCR a stanovení koncentrace IL-6 v plodové vodě. Avšak dosud nebyly u PPRM získány hlubší poznatky o roli exosomů sekretovaných do amniotické dutiny (a plodové vody) z hlediska porovnání infekčního zánětu a zánětu bez prokázané přítomnosti bakteriálních patogenů. Navíc bylo prokázáno, že exosomy fetálního a placentálního původu se vyskytují i v mateřské krvi a moči (2, 4). Pokud by bylo možné analyzovat proteiny z těchto „intra-uterinních“ exosomů přímo z mateřské krve, resp. plazmy, nebo dokonce moči, získali bychom unikátní informace o skrytém zánětlivém procesu v amniotické dutině i bez invazivního odběru plodové vody.</i> <i>Literatura:</i> 1) Kalluri R, LeBleu VS, <i>Science</i>. 2020; 367(6478): eaau6977. 2) Menon R, Richardson LS, et al., <i>Placenta</i>. 2019, 79:40-45. 3) Menon R, Mesiano S, et al., <i>Front Endocrinol (Lausanne)</i>. 2017, 8:196. 4) Herrera-Van Oostdam AS, et al., <i>Int J Mol Med</i>. 2020;46(2):546-560.	

Cíle projektu	Přesný postup pro izolaci exosomů z plodové vody a jejich charakterizaci nebyl dosud ve FN zaveden, proto cílem podávaného projektu bude zejména zavedení této metodiky, pokročilá charakterizace izolovaných exosomů a proteomická analýza exosomálního obsahu. Získané poznatky budou poté v rámci projektu přeneseny na lépe dostupné biologické matrice (plazma a moč). V závěrečné fázi projektu budou realizovány pilotní komparativní analýzy exosomálních proteinů ve vztahu k intra-amniotickému zánětu u PPRM s cílem získat pilotní data pro podání návrhu na navazující projekt u externí grantové agentury.
Výzkumná hypotéza	Exosomy sekretované epiteliálními buňkami amnionu jsou mimo jiné unikátními nositeli proteinů spojených s rozvojem intra-amniotického zánětu i při absenci bakteriálních či virových patogenů. Exosomální enkapsulací jsou tyto proteiny chráněny před činností proteolytických enzymů a před degradací v proteasomu. Zároveň mohou tímto způsobem prostupovat do cílových tkání dělohy, děložního čípku a přes materno-fetální rozhraní do mateřské krve. Zavedený postup pro izolaci exosomů z plodové vody, pro charakterizaci jejich velikosti, počtu, tvaru a povrchových znaků a konečně pro extrakci a analýzu exosomálních proteinů by výrazně rozšířil možnosti studia molekulárních mechanismů směrem k infekčnímu a sterilnímu intra-amniotickému zánětu. Rovněž by tento přístup mohl výrazně přispět k prohloubení znalostí o iniciačních mechanismech vzniku sterilního intra-amniotického zánětu v porovnání s infekčním zánětem. Rozšíření metodiky pro izolaci exosomů i na další biologické matrice (lidská plazma, moč) a možnost korelace výsledků napříč různými biologickými matricemi má velký potenciál směrem k charakterizaci „intra-uterinních“ exosomů v mateřské krvi a moči a možnosti studovat intra-amniotický zánět bez invazivního a komplikovaného odběru plodové vody. Takto by bylo možné zahrnout do výzkumu PPRM např. skupinu zdravých těhotných žen, popř. sledovat kohortu pacientek v delším časovém horizontu (odběry v různém gestačním stádiu).
Metodika a způsob získávání dat	Pro izolaci exosomů budou testovány tři základní postupy; ultracentrifugace plodové vody v hustotním gradientu, chromatografie stérické výluky a afinitní chromatografie dle povrchových znaků. Bude také zakoupena a otestována komerční souprava na izolaci exosomů. Velikost a distribuce získaných exosomů bude hodnocena pomocí dynamického rozptylu světla (DLS). Počet exosomů a jejich tvar bude posouzen na základě snímků z transmisní elektronové mikroskopie (TEM). Imunoblotovacími technikami bude potvrzena přítomnost typických povrchových znaků (CD63, CD9, flotillin-1, TSG101, aj.) a specifických markerů původů exosomů (např. HSC70, PLAP). Proteiny extrahované z izolovaných exosomů budou identifikovány a kvantifikovány moderními proteomickými metodami založenými na hmotnostní spektrometrii (LC-MS). Získaná proteomická data budou interpretována v programu MaxQuant, Perseus a R. V případě statistické analýzy dat bude využito také programu GraphPad Prism. Kvantifikace proteinů imunoblotovacími technikami bude provedena v programu AzureSpot. Budou použity vzorky plodové vody pacientek, které byly přijaty na Porodnickou a gynekologickou kliniku FNHK s diagnózou PPRM mezi 24. (24+0) a 37. týdnem těhotenství (36+6). U vzorků bude stanovena koncentrace IL-6 a přítomnost bakteriální kolonizace pro stratifikaci kohorty dle přítomnosti sterilního a infekčního intra-amniotického zánětu, nebo pouze bakteriální kolonizace, případně absence jak infekčních, tak zánětlivých změn. Na základě této klasifikace budou definované skupiny (sterilní zánět, infekční zánět, bakteriální kolonizace, absence bakteriální kolonizace i zánětu) porovnány z hlediska morfologie exosomů (tvar a velikost, povrchové znaky), jejich počtu a relativních hladin exosomálních proteinů. Vzorky plodové vody od pacientek s PPRM byly sbírány se souhlasem Etické komise FNHK (EK), č.j. 202007 S05P. Informovaný souhlas pacienta byl získán od každé těhotné. V rámci projektu budou charakterizovány také exosomy mateřské plazmy a moči s cílem nalézt exosomy placentálního a fetálního původu v těchto biologických matricích. Pro optimalizaci metody izolace exosomů v lidské plazmě a moči bude nejprve využito vzorků získaných od zdravých dobrovolných dárců, souhlas EK

	bude získán v průběhu října 2021. Informovaný souhlas bude získán od každého dárce. Vzorky periferní krve od pacientek s PPRM budou sbírány se souhlasem EK, č.j. 201902 S16P. Vzorky moči budou sbírány se souhlasem EK, který bude získán v průběhu října 2021. Informovaný souhlas pacienta bude získán od každé těhotné.
Klinické hodnocení léčiv	uvedte, zda se jedná o KH či nikoliv pomocí odpovědi na tyto otázky: 1. Je v návrhu projektu podáván/studován léčivý přípravek? NE 2. Je v návrhu projektu pro jeho účely prováděna intervence? ANO 3. Je návrh projekt prováděn na lidských subjektech? ANO
Spolupráce	Podáváný projekt navazuje na dlouholetou spolupráci proteomické skupiny Centra biomedicínského výzkumu (CBV) a Porodnické a gynekologické kliniky (PGK) v oblasti předčasných porodů, zejména PPRM. V rámci společného výzkumu bude navázána spolupráce s Fakultou vojenského zdravotnictví UO, díky které bude mít řešitel možnost izolovat exosomy ultracentrifugací vzorků v hustotním gradientu. DLS a TEM nezbytné pro charakterizaci tvaru, velikosti a počtu izolovaných exosomů budou realizovány jako externí služba na Katedře biologických biochemických věd, UPCE (DLS) a Servisní laboratoři elektronové mikroskopie, Ústav molekulární genetiky AV ČR (TEM).
Připravenost pracoviště	Centrum biomedicínského výzkumu FN HK je adekvátně vybaveno a personálně zajištěno, aby mohl být projekt úspěšně řešen a dokončen. TEM a DLS izolovaných exosomů budou zajištěny externě (Servisní laboratoř elektronové mikroskopie, AV ČR; Katedra biologických biochemických věd, UPCE). Ultracentrifugace plodové vody bude provedena na Katedře molekulární patologie a biologie (Fakulta vojenského zdravotnictví UO) ve spolupráci s Dr. Klimentovou (členka řešitelského týmu), která tuto metodu dlouhodobě využívá v rámci základního výzkumu. Řešitelský tým má dlouholeté zkušenosti s analýzou proteinů v plodové vodě a dalších biologických materiálech včetně komplexní analýzy získaných dat, která zahrnuje interpretaci MS a MS/MS spekter a komparativní analýzu hladin identifikovaných proteinů. V rámci projektu využije řešitelský tým primárně již existující biobanku vzorků plodových vod (PPRM). Podáváný projekt bude řešen v úzké spolupráci s MUDr. J. Stráníkem (PGK, člen řešitelského týmu), který se problematice intra-amniotického zánětu u PPRM věnuje dlouhodobě v rámci své klinické praxe a postgraduálního studia.
Navazující projekt	Exosomy jsou důležitým nástrojem buněčné signalizace a sehrávají významnou roli v prozánětlivé odpovědi. V posledních letech je vliv exosomů diskutován také v souvislosti se senescencí plodových obalů a rozvojem zánětu. Spolehlivý postup pro izolaci exosomů z plodové vody, který je hlavním cílem tohoto projektu, poskytne možnost hlubší analýzy exosomálních proteinů, jejich vztahu k rozvoji intra-amniotické zánětlivé odpovědi u PPRM a stane se podkladem pro návrh navazujícího projektu u externí grantové agentury (AZV, GAČR). Tématem navazujícího projektu bude mimo jiné i výzkum „intra-uterinních“ exosomů v dostupnějších biologických matricích (lidská plazma, moč).

Harmonogram projektu			
Doba řešení	1. února 2022 – 31. prosince 2022		
Harmonogram projektu (popište harmonogram plánovaných prací formou časových etap v rámci doby řešení projektu včetně rozdělení mezi jednotlivé členy)	Etap (od - do)	Popis prací včetně rozdělení mezi členy týmu	Očekávané výstupy
	1.Q 2022	Výběr základní metody pro izolaci exosomů z plodové vody. Pilotní experimenty s cílem charakterizovat exosomy	Protokol pro izolaci exosomů z plodové vody. Základní charakteristika exosomů potvrzující správnost postupu.
	2.Q	Optimalizace protokolu pro izolaci exosomů z plodové vody a	Optimalizovaný postup izolace exosomů z plodové vody, lidské

řešitelského týmu)	2022	přenos protokolu i pro další biologické matrice (lidská plazma, moč). Pokročilá charakterizace exosomů pomocí TEM. Analýza proteinů pomocí LC-MS (R. [redacted])	plazmy a moči. Detailní charakterizace exosomů ve všech jmenovaných biologických matricích.
	3.Q 2022	Pilotní analýzy exosomálních proteinů v plodové vodě ve vztahu k intra-amniotickému zánětu u PPRM, pokročilá charakterizace exosomů u této skupiny pacientek [redacted]	Pilotní proteomická data, která budou sloužit jako podklad pro navazující projekt u externí grantové agentury.
	4.Q 2022	Dokončení proteomických analýz. Příprava publikace a podkladů pro návrh na navazující grant (AZV/GAČR) [redacted]	Podklady pro návrh na navazující projekt, který bude podán v roce 2023. Návrh manuskriptu metodické publikace, která bude v roce 2023 publikována v časopise s IF.

Výsledky, výstupy a přínosy projektu

Očekávané výsledky

Výstupem interního projektu bude zavedení metodiky pro izolaci a charakterizaci exosomů z plodové vody, mateřské plazmy a moči. V rámci projektu budou také získána pilotní data ve vztahu k intra-amniotickému zánětu u PPRM, která budou podkladem pro návrh na navazující grant (AZV/GAČR). Získané výsledky budou shrnuty v metodické publikaci, jejíž ústředním tématem bude charakterizace exosomů amniotického a placentálního původu v plodové vodě a v lépe dostupných biologických matricích (lidská plazma, moč).

Očekávaný přínos

Očekávaným přínosem bude vůbec zavedení metodiky pro izolaci a charakterizaci exosomů z plodové vody, mateřské plazmy a moči ve FN, která umožní další studium exosomálních proteinů ve vztahu k rozvoji intra-amniotické zánětlivé odpovědi u PPRM. Zároveň ale bude možné zavedený postup využít v rámci dalších projektů zaměřených na studium exosomálních proteinů či jiných molekul (lipidy, nukleové kyseliny) v celé řadě dalších onemocnění (nádorová, kardiovaskulární či metabolická onemocnění), kde exosomy suspektně hrají důležitou roli. Jednoznačným přínosem je tedy univerzálnost celého přístupu a jeho využitelnost v budoucích projektech.

Přílohy k přihlášce

	Doloženo (ano/ne)
Rozpočet projektu	ano
CV hlavního řešitele	ano
Stanovisko etické komise (je-li relevantní)	ano (+2 žádosti – stanovisko bude doloženo po schválení EK)
Informovaný souhlas pacienta + informace pro pacienta (je-li relevantní)	ano
Oprávnění k používání pokusných zvířat (je-li relevantní)	ne
Čestné prohlášení vylučující realizaci klinického hodnocení	ano
Prohlášení dalšího subjektu o zájmu podílet se na financování projektu, včetně vyčíslení podílu	ne
Návrh smlouvy o spolupráci, smlouva musí být podepsaná před zahájením řešení projektu (tj. do 31. ledna 2022)	ne
Projekty IGS řešené navrhovatelem v předchozích letech (v roli hl. řešitele)	ne

Souhlasy zapojených pracovišť, včetně externích	ano
Ostatní přílohy (grafy, tabulky, doplňující texty apod.)	ne

Příloha č. 2 ROZPOČET PROJEKTU
Rozpočet FN HK

ROZPOČET PROJEKTU - INTERNÍ GRANTOVÁ SOUTĚŽ FN HK 2022		
Název projektu	Proteomická analýza obsahu exosomů v kontextu intra-amniotického zánětu u PPRM	
Hlavní řešitel	Mgr. Rudolf Kupčík, Ph.D.	
Druh nákladů	částka (Kč)	popis a zdůvodnění (popis požadované položky včetně kalkulace celkové částky a zdůvodnění potřebnosti)
Materiálové náklady		
SZM, léky, chemikálie	115,000.00	Cca 20% - chemikálie pro izolaci exosomů (např. pufrý, Optiprep); cca 20% - chemikálie a enzymy pro přípravu vzorků na LC-MS (např. TCEP redukční činidlo, MMTS blokující činidlo, štěpící pufr TEAB pH 8.5, enzymy trypsin a rLys-C pro sekvenování, deoxycholát sodný pro solubilizaci); cca 20% - LC-MS rozpouštědla (voda, acetonitril, methanol); cca 40% - charakterizace exosomů (např. protilátky proti povrchovým znakům, pufrý, barviva)
další spotřební materiál	125,000.00	Cca 20% - plastový spotřební materiál (ultracentrifugační zkumavky, jednorázové pipetovací špičky, mikrozukavky, centrifugační filtry, SPE kolony); cca 25% - chromatografický a MS spotřební materiál (např. kolony, fáze, kapiláry); cca 35% - kity pro izolaci exosomů; cca 20% - potřeby pro analýzu exosomů (např. membrány a gely pro western-blot, kit pro stanovení koncentrace proteinů)
kancelářské potřeby (maximálně 2 000 Kč)	1,000.00	Kancelářské potřeby pro řešitelský tým
nutný drobný hmotný majetek (pořizovací cena do 1 000 - 40 000 Kč)*	0.00	Není požadováno
nutný drobný nehmotný majetek (pořizovací cena do 1 000 - 60 000 Kč)*	0.00	Není požadováno
Celkem materiál	241,000.00	
Služby		
externí služby	85,000.00	Transmisní elektronová mikroskopie (UMG AV ČR, Praha)
interní služby, vyžádaná vyšetření	0.00	Není požadováno
servis přístrojů	50,000.00	Servis LC-MS přístrojů nad rámec servisní smlouvy o preventivní údržbě
celkem služby	135,000.00	
Cestovné		
Cestovné nezbytné pro spolupráci s dalším subjektem	10,000.00	Cestovní náklady spojené s přepravou vzorků na TEM (UMG AV ČR, Praha)
celkem cestovné	10,000.00	
CELKOVÉ NÁKLADY PROJEKTU	386,000.00	
publikační náklady, překlady, korekce	10,000.00	Náklady na korekce a poplatky spojené s publikací článku v časopise s IF
FINANCOVÁNÍ PROJEKTU	396,000.00	
zdroj financování FN HK (Interní soutěž FN HK 2022)	396,000.00	
zdroj financování JINE (spolupracující subjekt)		

* v případě možnosti sdílení požadovaného drobného hmotného majetku bude rozpočet projektu optimalizován