

Príloha č. 2 Zmluvy o poskytnutí prostriedkov mechanizmu

OPIS PROJEKTU

Opis projektu pre účel výzvy s kódou 09I03-03-V04 „Štipendia pre excelentných výskumníkov a výskumníčky R2-R4“.

I. Všeobecné informácie o projekte	
Názov projektu:	Úloha imunitného systému pri progresii NAFLD a identifikácia potenciálnych imunologických biomarkerov
Akronym projektu:	FLIMB
Kód projektu:	09I03-03-V04-00463
Názov programu:	Plán obnovy a odolnosti SR
Komponent:	9. Efektívnejšie riadenie a posilnenie financovania výskumu, vývoja a inovácií Plánu obnovy a odolnosti Slovenskej republiky
Investícia:	3. Excelentná veda
Schéma pomoci	Neuplatňuje sa
Anotácia projektu	<i>Nealkoholové stukovatenie pečene (NAFLD) je celosvetovo najrozšírenejším chronickým ochorením pečene, ktoré je špecifické hromadením tuku a nesúvisí s konzumáciou alkoholu. Patologické stavy v NAFLD sú rôznorodé, ale úzko prepojené so zápalom. Jednou z hlavných prekážok v diagnostike a liečbe NAFLD je absencia adekvátnych diagnostických nástrojov a translačných predklinických modelových systémov odrážajúcich závažnosť ochorenia a schopnosti monitorovať účinnosť liečby relevantnej pre človeka. Z toho dôvodu, som si za hlavný cieľ predkladaného projektu zvolila: 1) vyvinúť nový in vitro model interakcie medzi pečeňovými (hepatocyty, pečeňové hviezdicové bunky) a imunitnými bunkami, ktorý bude zahŕňať ako prirodzenú (Kupfferove bunky) tak aj adaptívnu (mononukleárne bunky periférnej krvi) zložku imunity v lipotoxických podmienkach podobným NAFLD; 2) identifikovať potenciálne imunologické biomarkery v podmienkach in vitro (v modeli) a následne ich potvrdiť v krvi/plazme pacientov s NAFLD.</i>
II. Harmonogram projektu	
Začiatok realizácie Projektu (MM/RRRR)	08/2024
Ukončenie vecnej realizácie Projektu (MM/RRRR)	06/2026
III. Pracovné balíky projektu	
Poradové číslo a názov pracovného balíka (PB)	1. Vývoj nového modelu interakcie pečeňových a imunitných buniek „in vitro“.
Začiatok realizácie PB (mesiac projektu – Mx)	M1
Koniec realizácie PB (mesiac projektu – Mx)	M10
Poradové číslo a názov pracovného balíka (PB)	2. Hodnotenie vrodenej a adaptívnej imunitnej odpovede na modeli pečeňových imunitných buniek v podmienkach imitujúcich nutričné preťaženie
Začiatok realizácie PB (mesiac projektu – Mx)	M7
Koniec realizácie PB (mesiac projektu – Mx)	M18
Poradové číslo a názov pracovného balíka (PB)	3. Identifikácia potenciálnych imunologických biomarkerov pri progresii NAFLD
Začiatok realizácie PB (mesiac projektu – Mx)	M11
Koniec realizácie PB (mesiac projektu – Mx)	M23
IV. Cieľ projektu a výstupy projektu	

<p>Cieľ projektu</p>	<p>Celkovým cieľom navrhovaného projektu je poskytnúť nový pohľad na pochopenie kľúčových imunologických procesov, ktoré sa podieľajú na progresii NAFLD, lepšie pochopiť úlohu vrodeného a adaptívneho imunitného systému, ich vzájomné prepojenie v patogenéze NAFLD a v neposlednom rade ich využiť na identifikáciu potenciálnych imunologických biomarkerov pre ďalšiu diagnostiku a intervenciu NAFLD.</p> <p>Na základe stanoveného cieľa je FLIMB štruktúrovaný do týchto troch hlavných pracovných balíkov (WP): WP 1: Vývoj nového modelu interakcie pečenej a imunitných buniek „in vitro“. WP 2: Hodnotenie vrodenej a adaptívnej imunitnej odpovede v modeli pečenej a imunitných buniek v podmienkach imitujúcich nutričné preťaženie (NAFLD-like). WP 3: Identifikácia potenciálnych imunologických biomarkerov pri progresii NAFLD</p> <p>Po prvé, uskutoční sa vývoj nového systému bunkových kultúr „in vitro“ (systém spoločnej kultivácie hepatocytov, HSC a imunitných buniek), ktorý napodobňuje zjednodušenú verziu procesov interakcie buniek zapojených do progresie NAFLD a patogenézy NASH [WP1]. Na vyhodnotenie a pochopenie toho, ktoré procesy vrodenej a adaptívnej imunity sa spúšťajú, sa vyrobí prostredie bunkovej kultúry in vitro s podmienkami imitujúcimi nutričné preťaženie špecifické pre NAFL a patogenézu NASH. Následne sa budú analyzovať a odhaľovať špecifické podskupiny imunitných buniek aktivovaných v rámci oboch úrovní imunitnej odpovede (vrodenej a adaptívnej) prostredníctvom kvalitatívnych a kvantitatívnych metód vhodných na stanovenie heterogénnej bunkovej populácie (prietoková cytometria, triedenie buniek, konfokálna mikroskopia, ELISA, western blot, PCR v reálnom čase) [WP2]. Takto navrhnutý model interakcie pečenej a imunitných buniek sa napokon použije ako nástroj na identifikáciu potenciálnych imunologických biomarkerov v patogenéze NAFLD prostredníctvom povrchovej identifikácie prevažne aktivovaných imunitných buniek (metóda CSC, technológia HATRIC) a analýz nákladu EV (IAC, LC-MS/MS) v médiách bunkových kultúr. Relevantnosť identifikovaných imunologických biomarkerov zo systému bunkových kokultúr „in vitro“ sa nakoniec overí v krvi (biomarkery na PBMC) a plazme (biomarkery v náklade EVs) detských pacientov s NAFLD [WP3].</p>																														
<p>Výstupy projektu</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Číslo výstupu</th> <th>Výstup</th> <th>Číslo pracovného balíka</th> <th>Typ</th> <th>Prístup a šírenie</th> <th>Metóda overovania</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1.</td> <td>SOPs</td> <td>WP1</td> <td>Pracovný manuál</td> <td>N= neverejné, obmedzené len na výskumnú komunitu</td> <td>Audity; inšpekcie</td> </tr> <tr> <td>2.</td> <td>Model interakcie pečenej a imunitných buniek in vitro</td> <td>WP1</td> <td>výskumný nástroj</td> <td>P= verejný</td> <td>Získané údaje - testy metabolickej aktivity (test glukózy, cholesterolu a ATP), detekcia cytokínov (súprava na multiplexný test cytokínov), kvantifikácia ukladania kolagénu</td> </tr> <tr> <td>3.</td> <td>Perspektíva Imunologické biomarkery pri NAFLD</td> <td>WP2 WP3</td> <td>Biomarker</td> <td>P= verejný</td> <td>Získané údaje - dôkaz identifikovaných biomarkerov v krvi/plazme pacientov s NAFLD; absencia u zdravých osôb</td> </tr> </tbody> </table>							Číslo výstupu	Výstup	Číslo pracovného balíka	Typ	Prístup a šírenie	Metóda overovania	1.	SOPs	WP1	Pracovný manuál	N= neverejné, obmedzené len na výskumnú komunitu	Audity; inšpekcie	2.	Model interakcie pečenej a imunitných buniek in vitro	WP1	výskumný nástroj	P= verejný	Získané údaje - testy metabolickej aktivity (test glukózy, cholesterolu a ATP), detekcia cytokínov (súprava na multiplexný test cytokínov), kvantifikácia ukladania kolagénu	3.	Perspektíva Imunologické biomarkery pri NAFLD	WP2 WP3	Biomarker	P= verejný	Získané údaje - dôkaz identifikovaných biomarkerov v krvi/plazme pacientov s NAFLD; absencia u zdravých osôb
Číslo výstupu	Výstup	Číslo pracovného balíka	Typ	Prístup a šírenie	Metóda overovania																										
1.	SOPs	WP1	Pracovný manuál	N= neverejné, obmedzené len na výskumnú komunitu	Audity; inšpekcie																										
2.	Model interakcie pečenej a imunitných buniek in vitro	WP1	výskumný nástroj	P= verejný	Získané údaje - testy metabolickej aktivity (test glukózy, cholesterolu a ATP), detekcia cytokínov (súprava na multiplexný test cytokínov), kvantifikácia ukladania kolagénu																										
3.	Perspektíva Imunologické biomarkery pri NAFLD	WP2 WP3	Biomarker	P= verejný	Získané údaje - dôkaz identifikovaných biomarkerov v krvi/plazme pacientov s NAFLD; absencia u zdravých osôb																										

	4.	Vyučovacie aktivity	WP1-3	Vzdelávanie	P= verejný	Webová stránka Univerzity Komenského, Katedra fyziológie a etológie zvierat
	5.	Výskumné semináre oddelenia	WP1-3	Vzdelávanie	N= neverejný, obmedzené len na tím/hostiteľskú organizáciu	Výročná správa hostiteľskej inštitúcie
	6.	Aktívna účasť na kongresoch	WP1-3	Prezentácia	P= verejný	Certifikáty o účasti; zborník abstraktov; zborník z konferencie
	7.	Návrh rukopisu	WP2 WP3	Publikácia	P= verejný	Korešpondencia s redaktorom
	8.	Priebežná správa	WP1-3	Správa	N= non-public, limited to grant provider	Correspondence with stakeholder; audits; inspections
	9.	Záverečná správa	WP1-3	Správa	N= neverejný, obmedzené na poskytovateľa grantu	Korešpondencia so zainteresovanými stranami; audit; inšpekcie
Milníky projektu	Číslo milníka	Milník	Číslo pracovného balíka	Metóda overovania		
	1	Založenie kultúry zrelej ľudských hepatocytov (ľudské pečeneové 3D sféroidy)	WP1	Zavedené protokoly; testy metabolickej aktivity (glukóza, produkcia cholesterolu a test ATP); morfológické zmeny spojené so zrelým fenotypom pomocou imunofluorescenčnej mikroskopie (adipofilín, E-kadherín)		
	2	Vývoj in vitro modelu pečeneových imunitných buniek	WP1	Testy metabolickej aktivity (test glukózy, cholesterolu a ATP); detekcia cytokínov (multiplexná súprava na testovanie cytokínov); vylučovanie CTHRC1; kvantifikácia ukladania kolagénu; analýza FACS (ASGR1, alfa-1 antitrypsín, E-Cadherin); imunofluorescencia (GFAP, Desmin, α -SMA)		
	3	Vytvorenie podmienok napodobňujúcich nutričné preťaženie (NAFLD-like) v modeli pečeneových imunitných buniek	WP2	Hodnotenie akumulácie lipidov v hepatocytoch pomocou imunofluorescencie (farbenie Bodipy), analýza génovej expzie génov spracovania lipidov (ACC1, FASN, DGAT2 atď.); cytokínov (IL1 β , IL6, TNF α) a markerov apoptózy (CASP3, CASP9) pomocou PCR v reálnom čase; kvantifikácia ukladania kolagénu, expresia mRNA génov súvisiacich s fibrogenézou; vylučovanie CTHRC1; detekcia cytokínov		
	4	Správa za prvý rok	WP2, WP3	Korešpondencia so zainteresovanými stranami, audit; inšpekcie		

5	Šírenie predbežných výsledkov na konferenciách	WP2, WP3	Certifikáty o účasti; zborník abstraktov; zborník z konferencie
6	Immunophenotyping of KCs in NAFLD-like conditions	WP2	Identifikácia povrchových markerov aktivácie buniek (CD68, TIMP4, VSIG4, MARCO+), receptora CXCR2, TGF- β CCL1, 2, 5 chemokínov a cytokínov (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10, IL-12, IL-23)
7	Imunofenotypizácia PBMC v podmienkach podobných NAFLD	WP2, WP3	Viacfarebná a multiparametrická prietoková cytometria na základe celkového počtu buniek a úrovne expresie povrchových bunkových markerov (CD3, CD4, CD8; CD19, CD5, B220; CD123, CD141; CD1c; CD56, CD127; CD14, CD16 atď.)
8	Odvzdanie výskumnej práce	WP2	Korešpondencia s redaktorom; akceptácia vedeckých časopisov; výskumná databáza (PubMed Central, ResearchGate atď.)
9	Identifikácia potenciálneho imunologického biomarkera necielenou detekciou povrchových proteínov buniek (technológia CSC - Surfaceome) a jeho overenie v krvi detských pacientov s NAFLD	WP2, WP3	Technológia CSC - Surfaceome sa použije na identifikáciu krvných biomarkerov súvisiacich s PBMC u pacientov s NAFLD. Na overenie relevantnosti identifikovaného biomarkera, ktorý dokáže rozlíšiť chorých od kontrolných subjektov, sa použije výkonnosťná metrika plocha pod operačnou charakteristikou prijímača (AUROC)36.
10	Izolácia EV pečeňového pôvodu z plazmy pacientov s NAFLD	WP3	WB analýza špecifických protilátok proti EVs (Exosome Panel; Calnexin, CD9, CD63, CD81, Hsp70, TSG101), elektrónová mikroskopia a analýza sledovania nanočastíc.
11	Identifikácia potenciálneho imunologického biomarkera v náklade EV	WP3	Proteomické analýzy nákladu EV pomocou kvapalinovej chromatografie spojenej s tandemovou hmotnostnou spektrometriou (LC-MS/MS) u pacientov s NAFLD. AUROC sa použije na posúdenie diagnostickej schopnosti parametrov získaných z pečeňových EVs rozlišovať medzi chorými a kontrolnými subjektmi.
12	Správa za druhý rok	WP3	Korešpondencia so zainteresovanými stranami, audity; inšpekcie
13	Šírenie predbežných výsledkov na konferenciách	WP3	Certifikáty o účasti; zborník abstraktov; zborník z konferencie
14	Odvzdanie výskumnej práce	WP3	Korešpondencia s redaktorom; akceptácia vedeckých časopisov; výskumná databáza (PubMed Central, ResearchGate atď.)

V. Informácie o výskumníkovi/výskumníčke			
Identifikácia výskumníka/výskumníčky	Zuzana Vince Kážmárová		
Typ podpory/fáza kariéry	A) Štipendium výskumníka R2		
Vedná oblasť	Prírodné a lekárske vedy		
VI. Rozpočet projektu			
Celková výška oprávnených výdavkov	148 306,80 €		
Výška prostriedkov mechanizmu bez DPH	140 561,00 €		
Výška prostriedkov mechanizmu – na DPH	7 745,80 €		
Prostriedky mechanizmu na mzdové náklady výskumníka	Prostriedky mechanizmu na výskum bez DPH	Prostriedky mechanizmu na výskumný tím	Prostriedky mechanizmu na nepriame náklady bez DPH
101 832,00 €	26 000,00 €	0,00 €	12 729,00 €