

Spáchá Válek s Kubkem sebevraždu? Ústní vody jsou účinné proti koronaviru!

- CZ24 News | 8. října 2022

Vědecké zprávy: Cetylpyridiniumchlorid v ústní vodě zabíjí koronavirus. Vědci z Hokkaidské univerzity prokázali, že ústní vody mohou zabíjet viry SARS-CoV-2, čímž snižují virovou zátěž.

Uvádí to článek [publikovaný](#) v časopise Scientific Reports.

[Vědecké zprávy](#) **hlasitost 12** , Číslo článku: 14050 (2022)

Včera dezinformace, dnes informace

Pandemii zkrátka porazí spíš očkování a vytrvalá práce vědců než tipy a triky z internetu,“ upozorňuje Irena Storová, ředitelka Státního ústavu pro kontrolu léčiv. A další expert na vše: Kubka rozčílilo, když známý ortoped ústní vodu jako prevenci proti covidu. Vlastimil Voráček dostal otázku, zda stále vnímá kloktání ústní vody jako prevenci proti onemocnění COVID-19. „Ano, virová nálož se tím dá zredukovat. Nejde o to, že se tím vyhojíte, ale snížíte pravděpodobnost, že se ten virus tolik rozběhne,“ odvětil Voráček. A kdo potrestá Kubka za jeho zločiny, které se prokázaly?

Milan Kubek tvrdě ohradil: „Jsem rád, že je pan doktor ortoped, a věřím, že dobrý. Protože tohle jsou naprosté nesmysly a je smutné, když **takovým bizarním doporučením lidé podléhají. Pak to hlupáci šíří dál.** Radě lidí tyhle příšerné rady poškodily zdraví. Doporučuji lidem ignorovat to.“

Takže my jsme dle toho zločince Kubka hlupáci?

Scientific Reports is an online multidisciplinary, open access journal from the publishers of Nature. Přeloženo z angličtiny- Scientific Reports je online recenzovaný vědecký mega časopis s otevřeným přístupem vydávaný Nature Portfolio, pokrývající všechny oblasti přírodních věd. Časopis byl zahájen v roce 2011. Časopis oznámil, že jejich cílem je posuzovat pouze vědeckou validitu předložené práce. Dnes je největší na světě.

Abstraktní

Cetylpyridiniumchlorid (CPC), kvartérní amoniová sloučenina, která je přítomna v ústní vodě, je účinná proti bakteriím, plísním a obaleným virům. Tato studie byla provedena s cílem prozkoumat antivirový účinek CPC na SARS-CoV-2. Existuje několik zpráv o účinku CPC proti SARS-CoV-2 divokého typu při nízkých koncentracích, jako je 0,001 %-0,005 % (10–50 µg/ml). Je zajímavé, že

jsme zjistili, že nízké koncentrace CPC potlačily infekčnost lidských izolovaných kmenů SARS-CoV-2 (Wuhan, Alpha, Beta a Gamma) dokonce i ve slinách. Dále jsme pomocí analýzy hustoty sacharózy a elektronového mikroskopu prokázali, že CPC vykazuje anti-SARS-CoV-2 účinky bez narušení virového obalu. Závěrem lze říci, že tato studie poskytla experimentální důkaz, že CPC může inhibovat infekci SARS-CoV-2 i při nižších koncentracích.

Úvod

Podle nedávných informací z centra zdrojů pro koronaviry, Johns Hopkins University of Medicine <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>, je COVID-19 zodpovědný za více než 420 milionů případů a přibližně 6 milionů úmrtí po celém světě.

SARS-CoV-2 byl původně hlášen ve Wuhanu v Číně <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017> (2020). a byly hlášeny také některé zajímavé varianty a varianty vzbuzující obavy (VOC) <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>. Kromě toho se obává, že některé varianty jako Delta a Omicron by mohly mít schopnost vyhnout se imunitě vyvolané vakcínou <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2109072> (2021). [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)02758-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(21)02758-6) (2021). <https://doi.org/10.1056/nejmoea2108891> (2021).

Vědci se proto obávají, že pandemie SARS-CoV-2 může pokračovat i po zvýšení proočkovanosti. Bylo hlášeno, že SARS-CoV-2 infikuje epitelální buňky sliznice dutiny ústní a slinných žláz, které exprimují vstupní faktory viru, angiotensin-konvertující enzym 2 (ACE2) a členy transmembránové proteázy serin (TMPRSS) <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01296-8> (2021). Tímto způsobem tedy hraje dutina ústní zásadní roli při infekci a přenosu SARS-CoV-2. Přestože příznakem COVID-19 souvisejícím s ústní dutinou je dysgeuzie a stomatitida <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.05.003> (2020). <https://doi.org/10.1111/dth.14578> (2021). mnoho lidí infikovaných SARS-CoV-2 může být asymptomatických, což vede k jeho přenosu na další lidi.

SARS-CoV-2 se může replikovat v ústní dutině a uvolňovat se do slin <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01296-8> (2021). SARS-CoV-2 se navíc může replikovat v respiračním epitelu <https://doi.org/10.1128/JVI.00957-20> (2020). a může se přenášet do dutiny ústní kašlem. Přenos SARS-CoV-2 kapénkami a/nebo aerosolem způsobuje jeho infekci a replikaci v plicních alveolárních epitelálních buňkách, což vede k alveolárnímu poškození <https://doi.org/10.1038/s41379-020-0595-z> (2020). Dále se uvádí, že k přenosu SARS-CoV-2 dochází kapénkami z expiračních činností, jako je mluvení, kašlání a kýchání <https://doi.org/10.1038/s41591-020-1092-0> (2020). <https://doi.org/10.1126/science.abd9149> (2021). Je zajímavé, že lidé infikovaní SARS-CoV-2 se mohou stát zdrojem přenosu i během asymptomatické inkubační doby viru <https://doi.org/10.7326/M20-0504> (2020). Proto musíme prozkoumat strategii profylaxe proti COVID-19. Dále byl hlášen vztah mezi aspirací kapiček ze slin obsahujících SARS-CoV-2 a zhoršením COVID-19 <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2196-x> (2020). Proto je pro prevenci přenosu SARS-CoV-2 důležitá ústní péče.

Proto musíme prozkoumat strategii profylaxe proti COVID-19. Dále byl hlášen vztah mezi aspirací kapiček ze slin obsahujících SARS-CoV-2 a zhoršením COVID-19 <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2196-x> (2020). Proto je pro prevenci přenosu SARS-CoV-2 důležitá ústní péče.

Ústní voda se zaměřuje na prevenci mikrobiomové infekce <https://doi.org/10.1007/s40121-018-0200-7> (2018).“ data-track="click" data-track-action="reference anchor" data-track-label="link" data-test="citation-ref" aria-label="Odkaz 16">16 . Kromě toho bylo nedávno hlášeno, že několik složek ústní vody snižuje viriony SARS-CoV-2 v ústní dutině ^{17, 18} . Cetylpyridiniumchlorid (CPC) je široce používán jako jedna z baktericidních složek ústních vod, tablet, sprejů a kapek. CPC může narušit lipidovou membránu prostřednictvím fyzikálně-chemických interakcí. Již bylo hlášeno, že CPC má baktericidní účinky a také antivirové účinky proti viru chřipky <https://doi.org/10.20411/pai.v2i2.200> (2017).“ data-track="click" data-track-action="reference anchor" data-track-label="link" data-test="citation-ref" aria-label="Odkaz 19">19 a

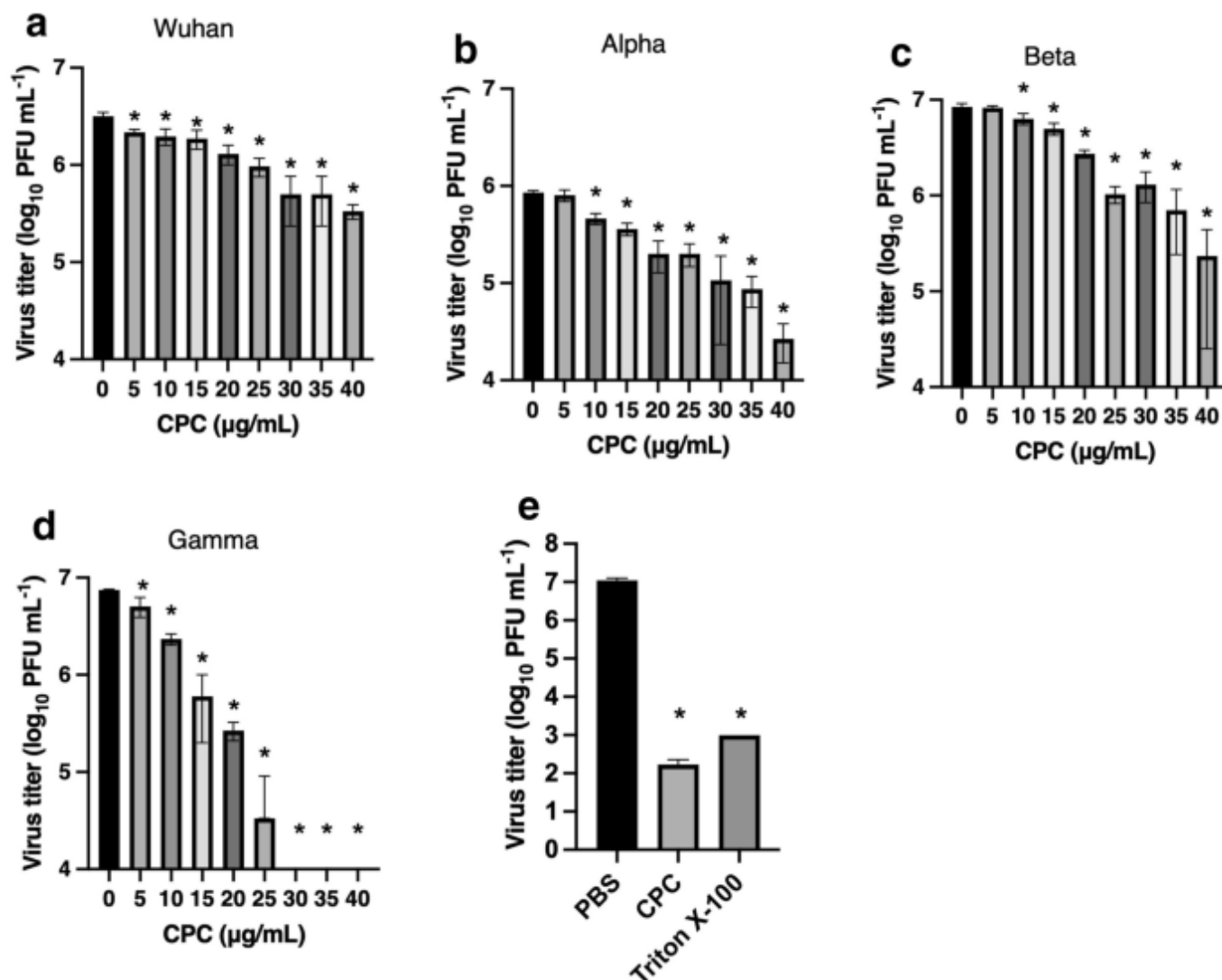
koronavirům <https://doi.org/10.1128/JVI.00023-19> (2019).“ data-track="click" data-track-action="reference anchor" data-track-label="link" data-test="citation-ref">20 , ²¹ , <https://doi.org/10.1080/20002297.2022.2030094> (2022).“ data-track="click" data-track-action="reference anchor" data-track-label="link" data-test="citation-ref" aria-label="Odkaz 22">22 . Ve srovnání s jinými složkami ústních vod, včetně povidonu, jodu a chlorhexidinu (CHX); CPC je bez chuti a zápachu, a proto je vhodný pro použití v přípravcích pro péči o ústní dutinu. K dnešnímu dni existuje jen málo zpráv popisujících virucidní aktivitu CPC proti SARS-CoV-2. Seneviratne a kol. uvedli, že CPC snížila virovou zátěž SARS-CoV-2 ve slinách čtyř pacientů s COVID-19 <https://doi.org/10.1007/s15010-020-01563-9> (2021).“ data-track="click" data-track-action="reference anchor" data-track-label="link" data-test="citation-ref" aria-label="Odkaz 23">23 ve srovnání s kontrolní vodou, ale virová infekčnost ve slinách nebyla popsána. Nedávná zpráva ukázala účinek CPC v mnohem nižší koncentraci než CPC v komerčně dostupných ústních vodách proti pseudoviru <https://doi.org/10.1177/00220345211029269> (2021).“ data-track="click" data-track-action="reference anchor" data-track-label="link" data-test="citation-ref" aria-label="Odkaz 24">24 . Neexistuje však žádná zpráva o účinku CPC při nízkých koncentracích, jako je 0,001 %-0,005 % (10-50 µg/ml) proti divokému typu SARS-CoV-2 ve slinách. V Japonsku je koncentrace CPC v komerčně dostupných ústních vodách téměř 30-50 µg/ml, což je mnohem méně než v ústních vodách používaných v předchozích zprávách <https://doi.org/10.1177/00220345211029269> (2021).“ data-track="click" data-track-action="reference anchor" data-track-label="link" data-test="citation-ref" aria-label="Odkaz 24">24 , <https://doi.org/10.1016/j.ajoms.2021.02.002> (2021).“ data-track="click" data-track-action="reference anchor" data-track-label="link" data-test="citation-ref" aria-label="Odkaz 25">25 . Proto jsme zkoumali antivirové účinky CPC na SARS-CoV-2 při nízkých koncentracích. Kromě toho jsme také zkoumali mechanismus anti-SARS-CoV-2 aktivity CPC analýzou hustoty sacharózy a pozorováním elektronovým mikroskopem.

Výsledek

CPC potlačila infekčnost SARS-CoV-2

Zkoumali jsme kmeny SARS-CoV-2, včetně Wuhan, Alpha, Beta a Gamma, které patří k VOC. Test plaků prokázal, že CPC významně potlačila infekčnost všech vyšetřovaných SARS-CoV-2 přímo v závislosti na dávce (obr. [1](#) a-d, [S1](#)). Léčba CPC (50 µg/ml) zcela inaktivovala kmen SARS-CoV-2 Wuhan podobně jako Triton X-100 (1 %) (obr. [1e](#)). Komerční ústní voda (SP-T lékařské kloktadlo: SP-T) obsahující stejnou koncentraci CPC vykazovala lepší antivirový účinek než roztok CPC bez rušivých složek. Titr viru SARS-CoV-2 léčeného SP-T byl pod hranicí detekce $2,0 \times 10^3$ PFU/ml (obr. [S2](#)). Tyto výsledky ukázaly, že nižší koncentrace CPC (10-40 µg/ml) než koncentrace komerčně dostupné ústní vody (50 µg/ml) vykazovaly anti-SARS-CoV-2 účinky u mnoha kmenů, včetně VOC.

Obrázek 1

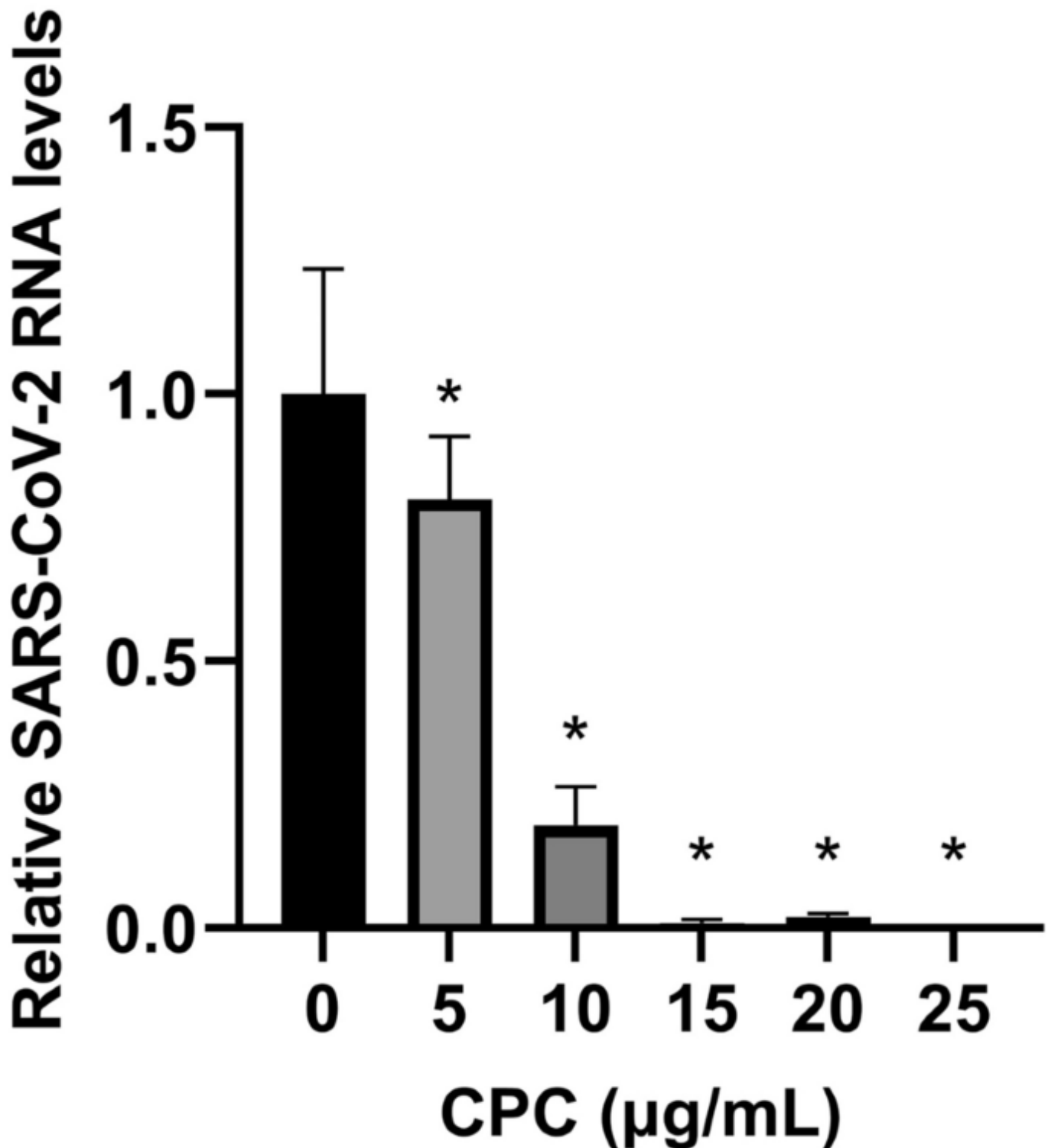


Antivirová účinnost CPC proti SARS-CoV-2 pomocí plakového testu s použitím buněk Vero E6 exprimujících gen TMPRSS2 (VeroE6/TMPRSS2). Byly spočítány titry viru a titr viru SARS-CoV-2 Wuhan (**a**), Alpha (**b**), Beta (**c**) a Gamma (**d**) kmenů ošetřených CPC (0-40 µg/ml) při pokojové teplotě po dobu 30 min byly kvantifikovány a reprezentovány jako PFU/ml. Test plaků byl také proveden v přítomnosti PBS, CPC (50 ug/ml) nebo Triton X-100 (1 %) po dobu 10 minut. Poté byly vzorky filtrovány na kolonách PD-10, aby se odstranila činidla (**e**). Statistická analýza byla provedena pomocí jednosměrné analýzy rozptylu. (* $p < 0,05$).

[Obrázek v plné velikosti](#)

Dále jsme hodnotili účinek CPC na buněčný vstup SARS-CoV-2. Buňky VeroE6/TMPRSS2 byly infikovány kmenem SARS-CoV-2 Wuhan ošetřeným CPC při multiplicitě infekce (MOI) 0,01. Úroveň exprese virové RNA v buňkách byla významně snížena pomocí CPC způsobem závislým na dávce 24 hodin po infekci (obr. [2](#)). Počet kopií virové RNA byl snížen na přibližně jednu třicetinu pomocí CPC při koncentraci 15 µg/ml ve srovnání s kontrolou. Tato data ukázala, že množství infekčních virionů bylo sníženo CPC před vstupem do buněk. Všechny experimenty byly provedeny s použitím CPC v koncentraci, která nezpůsobila cytotoxicitu (obr. [S3](#)).

Obrázek 2



Antivirová účinnost CPC proti SARS-CoV-2 pomocí qRT-PCR. Buňky VeroE6/TMPRSS2 byly naočkovány kmenem SARS-CoV-2 Wuhan při multiplicitě infekce (MOI) 0,01 po smíchání stejného množství CPC. 24 hodin po infekci byly relativní hladiny virové N proteinové RNA vyhodnoceny kvantitativně pomocí qRT-PCR. (* $p < 0,05$).

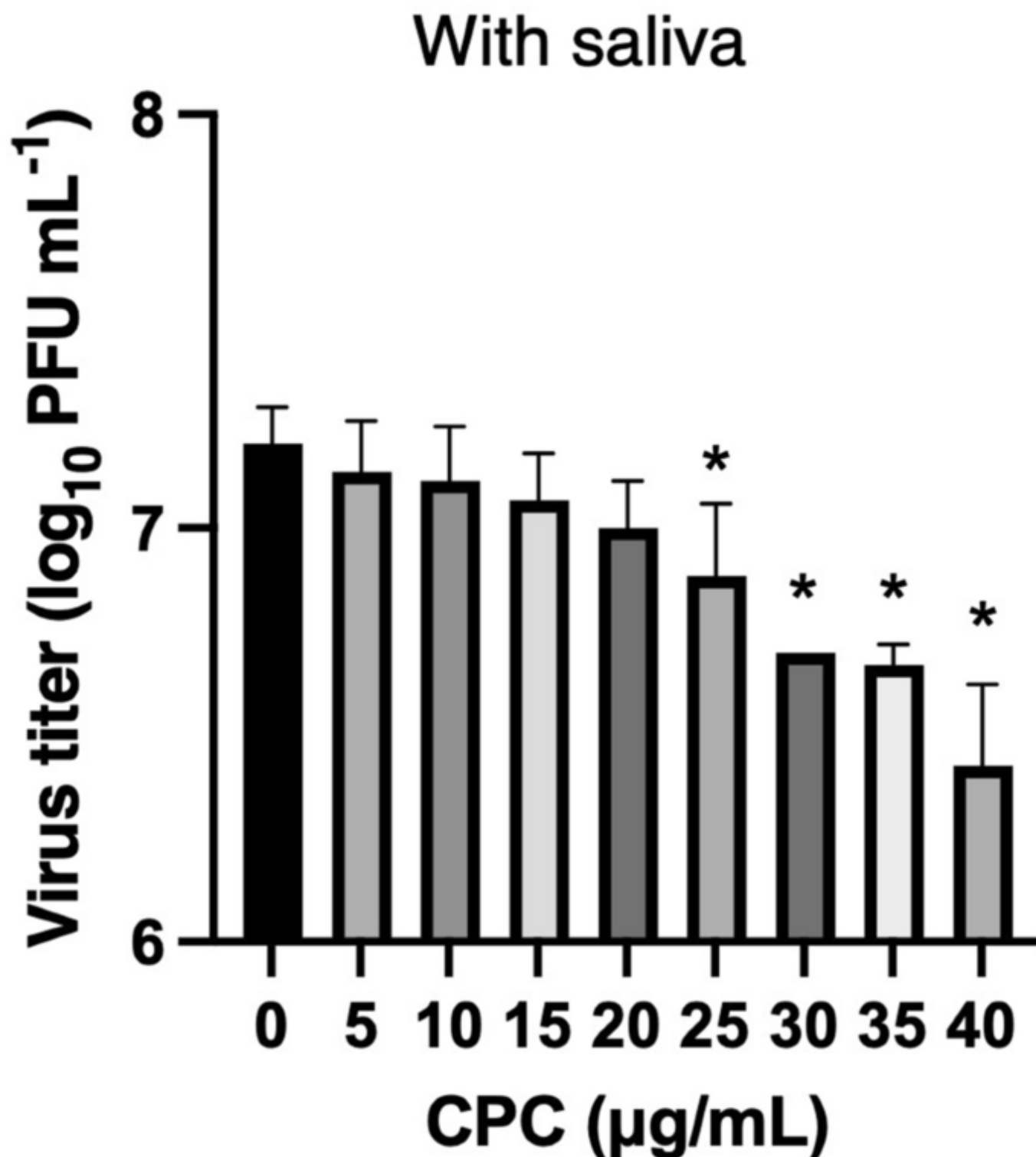
[Obrázek v plné velikosti](#)

CPC má antivirovou aktivitu proti SARS-CoV-2 i ve slinách

Abychom zjistili, zda je CPC účinná na SARS-CoV-2 ve slinách, které obsahují mnoho proteinů a jsou vysoce viskózní, měřili jsme infekčnost kmene SARS-CoV-2 Wuhan pomocí plakového testu po inkubaci s CPC ve slinách odebraných od zdravých dobrovolníků. Plaque test prokázal inhibiční

účinek CPC (25–40 $\mu\text{g/ml}$) proti SARS-CoV-2 ve slinách významně v závislosti na dávce (obr. 3).

Obrázek 3



Antivirová účinnost CPC proti SARS-CoV-2 se slinami pomocí plakového testu s použitím buněk Vero E6 exprimujících gen TMPRSS2 (VeroE6/TMPRSS2). Kmen SARS-CoV-2 Wuhan byl přidán do slin a smíchán se stejným množstvím CPC. (* $p < 0,05$).

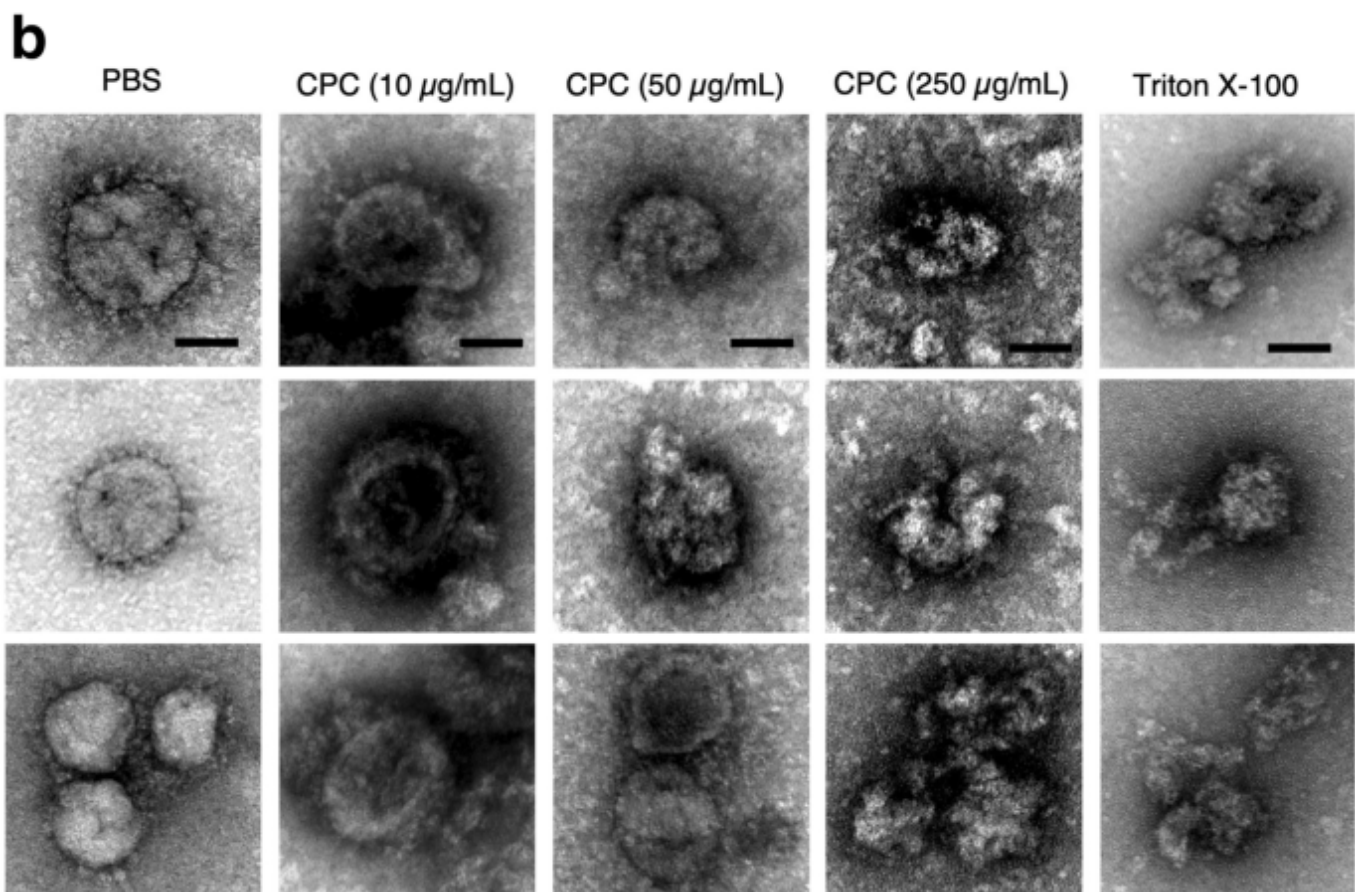
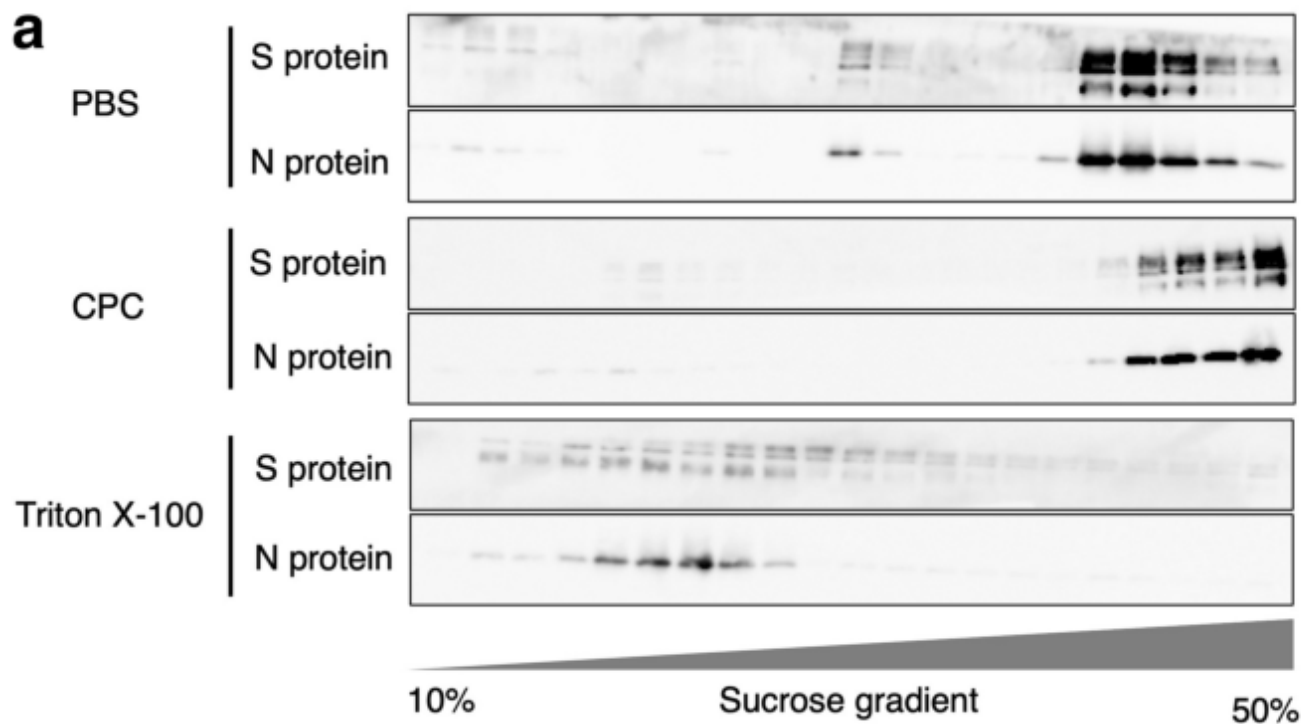
[Obrázek v plné velikosti](#)

Analýza hustoty sacharózy a analýza transmisní elektronové mikroskopie

SARS-CoV-2 ošetřeného CPC

Abychom analyzovali mechanismus CPC na infekčnost SARS-CoV-2, provedli jsme analýzu hustoty sacharózy virionů SARS-CoV-2 ošetřených buď 1 × fosfátem pufovaným fyziologickým roztokem (PBS), CPC (50 µg/ml) nebo Tritonem X- 100 (1 %) po dobu 10 minut při pokojové teplotě (obr. [4A](#)). SARS-CoV-2 S a N protein vykazoval specifickou distribuci v celém gradientu. Posun pásu byl pozorován u virionů ošetřených Tritonem X-100; nicméně frakce byly jiné než frakce ošetřené PBS nebo CPC. Jinými slovy, PBS a CPC nemusí mít žádný vliv na strukturu virionů SARS-CoV-2, zatímco Triton X-100 strukturu změnil. Dále byla morfologie virionů analyzována transmisní elektronovou mikroskopií (TEM). Elektronová mikroskopická analýza odhalila, že struktura sférických částic SARS-CoV-2 ošetřeného PBS zůstala nezměněna. Také jsme zjistili, že většina virových částic ošetřených 10 µg/ml CPC zůstala nezměněna, zatímco některé se rozpadly s 50 µg/ml CPC. Naproti tomu téměř všechny virové částice ošetřené 250 µg/ml CPC byly jasně rozrušeny (jako 1% Triton X-100). Množství 50 µg/ml bylo považováno za koncentraci, při které se všechny virové částice nerozbily. Tento výsledek je v souladu s daty analýzy hustoty sacharózy (obr. [4b](#)).

Obrázek 4



Analýza hustoty sacharózy a TEM analýza částic SARS-CoV-2. (**a**) Analýza hustoty sacharózy sestavy kapsidy v přítomnosti 1 x PBS, CPC (50 $\mu\text{g/mL}$) a Triton X-100 (1 %). Kmen SARS-CoV-2 Wuhan byl ošetřen popsány činností po dobu 10 minut a ošetřené viriony byly aplikovány na ultracentrifugaci s gradientem hustoty. Každá frakce byla aplikována na SDS-PAGE a analyzována Western blotem s protilátkami proti S proteinu a N proteinu. (**b**) Elektronové mikrofotografie virionů SARS-CoV-2 po ošetření činností. Kmen SARS-CoV-2 Wuhan byl ošetřen 1 x PBS, CPC (10, 50, 250 $\mu\text{g/mL}$) a Triton X-100 (1 %) po dobu 10 minut při teplotě místnosti. Každá stupnice představuje 50 nm.

Diskuse

V tomto výzkumu jsme prokázali, že CPC při nízké koncentraci 50 µg/ml nebo méně potlačuje infekčnost kmene SARS-CoV-2 Wuhan a VOC, včetně kmenů Alpha, Beta a Gamma. CPC prokázal virucidní účinky proti SARS-CoV-2 i ve slinách. Zjistili jsme tedy, že nízké koncentrace CPC vykazovaly dostatečnou antivirovou aktivitu proti SARS-CoV-2. Protože CPC narušuje lipidové dvojvrstvy, vysoké koncentrace CPC mohou vykazovat cytotoxické účinky. Proto lze CPC aplikovat ve formulaci, která může uplatňovat svůj účinek po dlouhou dobu při nízkých koncentracích. Protože prototypová formulace ústní vody může obsahovat další interferující složky, které potlačují nízké hladiny CPC použité v experimentech, testovali jsme komerční ústní vodu se stejnou koncentrací CPC ([S2](#)). Dále bychom mohli navrhnout, že antivirový účinek nemusí být způsoben destrukcí lipidové membrány, ale denaturací proteinu SARS-CoV-2.

Bylo hlášeno, že CPC je účinný proti SARS-CoV-2 Alfa variantu (<https://doi.org/10.1177/00220345211029269> (2021)).²⁴ Naše studie odhalila, že CPC zmírňuje infekčnost dalších dvou variant (kmeny Beta a Gamma) při nízkých koncentracích. Léčba CPC po dobu 1 hodiny neukázala cytotoxicitu vůči VeroE6/TMPRSS2 až do 40 µg/ml (obr. [S3](#)). Navíc v předchozích studiích byla použita ústní voda obsahující vyšší koncentraci CPC (500–750 µg/ml (<https://doi.org/10.1177/00220345211029269> (2021)).²⁵ Při těchto koncentracích se má za to, že lipidová membrána buněk může být poškozena.

Doba trvání antivirového účinku ústní vody obsahující CPC není dosud jasná; naše výsledky však naznačují, že k prokázání antivirového účinku stačí nižší koncentrace. Omezení tohoto experimentu spočívá v tom, že když se CPC použije jako ústní voda, předpokládá se, že trvání účinku je do minuty. Nicméně s ohledem na složitost experimentální techniky a možnost chyb v trvání účinku mezi vzorky byla minimální doba působení v naší studii stanovena na 10 minut. V tomto ohledu Anderson a kol. objasnili účinek CPC v době působení 30 s pomocí metody k neutralizaci CPC (<https://doi.org/10.1099/jmm.0.001508> (2022)).²⁶ Je tedy zaručeno vyvíjet nové produkty, jako jsou tablety, kapky a náplasti, které mohou uvolňovat CPC v bezpečné koncentraci a mohou být uchovány v ústní dutině co nejdéle.

Ukázali jsme, že CPC potlačila infekčnost SARS-CoV-2 ve viskózních slinách, které obsahují různé proteiny. Zdá se však, že účinek je ve slinách ve srovnání s PBS oslaben. To může být způsobeno přítomností negativně nabitých proteinů slin, sníženou účinností difúze v důsledku viskozity a tvorbou micel (<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.01.007> (2015)).²⁷ Nicméně i nízké koncentrace CPC prokázaly dostatečné potlačení infekčnosti SARS-CoV-2. Supresivní účinky nízkých koncentrací CPC na infekčnost SARS-CoV-2 ve slinách skutečných pacientů s COVID-19 zbývá objasnit.

Předpokládá se, že mechanismus účinku, který potlačuje infekčnost SARS-CoV-2, je způsoben destrukcí virového obalu. Tato studie ukázala, že CPC inaktivuje SARS-CoV-2 bez narušení virové částice při koncentraci a trvání experimentů. Bylo hlášeno, že vysoká koncentrace (250–500 µg/ml) CPC narušuje obal SARS-CoV-2 (<https://doi.org/10.1080/20002297.2022.2030094> (2022)).²⁸ Stupeň morfologického rozpadu závislý na koncentraci CPC se tedy liší. Jinými slovy, částice jsou zmačkané, ale ne rozbité, v koncentraci, která je stále dostatečná k deaktivaci viru. Tyto výsledky jsou v souladu s výsledky analýzy gradientu hustoty

sacharózy. Navíc, z výše uvedených důvodů, antivirový mechanismus CPC ukázaný naší studií podporuje zjištění, že CPC interferuje hlavně s lipidovou <https://doi.org/10.1128/AAC.00576-20> (2020).²⁹ Obrázek 4b ukazuje virové částice různých velikostí. V předchozích zprávách se průměr SARS-CoV-2 měnil od přibližně 60 do 140 nm, což je v souladu se současnými výsledky <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017> (2020).⁵ [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)02758-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(21)02758-6) (2021).⁵ [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31185-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31185-5) (2020).³⁰ Podrobný mechanismus inaktivace SARS-CoV-2 nižší koncentrací CPC je však stále nejasný. Naše výsledky naznačují, že na vstupu se může podílet denaturační účinek proteinu S a zdá se, že hraje klíčovou roli.

Předpokládá se, že vstup virů do organismu probíhá přes dutinu ústní a nosní <https://doi.org/10.1183/13993003.01948-2020> (2020).³¹ Aplikací nosních sprejů obsahujících CPC a snížením množství viru v nosní dutině může vést ke kontrole infekce COVID-19. K dnešnímu dni však neexistuje žádná zpráva ukazující použití nosních sprejů CPC a jejich preventivní účinek je stále neznámý.

V současné době provádíme klinickou studii zkoumající účinek CPC u pacientů s COVID-19, která se zabývá vlivem CPC na virovou zátěž SARS-CoV-2 ve slinách pacientů. Nízká virová zátěž ve slinách může mít za následek nízkou rychlost přenosu a menší progresi stavu onemocnění.

Použití produktů obsahujících CPC může vést ke snížení počtu nově infikovaných pacientů s covidem. Navíc může být prostředkem preventivních opatření ve špatně proočkovaných zemích. Předpokládáme, že CPC bude používán jako jeden z nástrojů k prevenci vzniku a infekce SARS-CoV-2.

Materiály a metody

Buněčná kultura

Buňky Vero E6 (ATCC, Manassas, VA, USA) byly udržovány v Dulbeccově modifikovaném Eagleově médiu (DMEM) doplněném 10% fetálním bovinním sérem (FBS) (v/v) a inkubovány při 37 °C s 5% CO₂. Pro tuto studii byly také použity buňky Vero E6 stabilně exprimující lidské TMPRSS2 (VeroE6/TMPRSS2) <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009233> (2021).³²

Viry

Kmen SARS-CoV-2 Wuhan (WK-521; EPI_ISL_408667), Alpha (QK002; EPI_ISL_768526), Beta (TY8-612; EPI_ISL_1123289) a Gamma (TY7-501; EPI_ISL_8) byly poskytnuty společností EPI_ISL_8 Ústav infekčních nemocí, Tokio, Japonsko). Tyto viry byly připraveny pomocí buněk VeroE6/TMPRSS2. Všechny experimenty s použitím SARS-CoV-2 byly provedeny v zařízení Biosafety Level-3 (BSL-3) Mezinárodního institutu pro kontrolu zoonóz (schválené číslo: 19(19), #21002-3), Hokkaido University a dodržovaly standard provozní postupy BSL-3. Všechny experimentální návrhy využívající patogeny byly navíc schváleny Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University (schválené číslo: R-2-4-1).

Reagencie

CPC (TCI, Tokio, Japonsko) byl rozpuštěn v deionizované destilované vodě (DDW) a sterilizován

filtrem (0,45 µm v průměru), (Sartorius, Göttingen, Německo). Kromě toho byl jako pozitivní kontrola použit povrchově aktivní činidlo Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). PBS byl použit jako negativní kontrola.

Sliny od zdravých dobrovolníků

Sliny byly poskytnuty od pěti zdravých neočkovaných dobrovolníků. Všechny vzorky slin byly před experimenty stanoveny jako negativní na SARS-CoV-2 pomocí kvantitativní reverzní transkripční polymerázové řetězové reakce (qRT-PCR) a smíchány v jedné zkumavce. Tento experiment byl schválen Institucionálním etickým výborem Hokkaidské univerzity k použití materiálů pocházejících z člověka. Před odběrem slin byl od každého dobrovolníka získán informovaný souhlas (schválené číslo: 2021-2).

Test přežití buněk

Buněčná životaschopnost VeroE6/TMPRSS2 byla měřena testem MTS [3-(4,5-dimethylthylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium] za použití CellTiter 96 AQueous One Solution (Promega, Madison, WI, USA) v přítomnosti různé koncentrace CPC (0–50 µg/ml) po dobu 1 hodiny při 37 °C. Absorbance byla měřena pomocí GloMax Multiplus Plate Reader/Luminometer (Promega). Tři nezávislé experimenty byly provedeny trojmo.

Plakový test

Kmeny SARS-CoV-2 byly smíchány se stejným množstvím roztoku CPC (konečná koncentrace: 0–50 µg/ml s DMEM obsahujícím 2 % FBS) nebo lékařského kloktadla SP-T (Lion Corporation, Tokio, Japonsko), které bylo naředěno v PBS na koncentraci 50 µg/ml, podobnou CPC. Směs byla inkubována po dobu 30 minut při teplotě místnosti a zředěna na 1/10 2% FBS DMEM, aby se snížil CPC ve směsi. Zředěná směs byla naočkována do buněk VeroE6/TMPRSS2 a inkubována při 37 °C po dobu 1 hodiny s rotací. Po inkubaci byly buňky dvakrát promyty 1 x PBS, aby se odstranil CPC, a poté byly překryty 2% FBS DMEM obsahujícím 1,2% Bacto Agar (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Po 48 hodinách inkubace při 37 °C byly buňky přes noc fixovány 3,7% pufrovaným formaldehydem. Fixované buňky byly obarveny 1% krystalovou violetí.

Test vstupu viru

Buňky VeroE6/TMPRSS2 byly nasazeny na 24jamkové destičky v hustotě $1,0 \times 10^5$ buněk/jamku. Kmen SARS-CoV-2 Wuhan byl smíchán se stejným množstvím CPC (konečná koncentrace: 0–25 µg/ml). Při každé koncentraci léčiva byly jamky infikovány $1,0 \times 10^3$ PFU (MOI = 0,01) viru. Směsi byly inkubovány po dobu 30 minut při teplotě místnosti. Po inkubaci byly směsi naočkovány do buněk VeroE6/TMPRSS2 a inkubovány při 37 °C po dobu 1 hodiny s rotací. Po 1 hodině absorpce byly buňky dvakrát promyty 1 x PBS k odstranění CPC a kultivovány v udržovacím médiu. 24 hodin po infekci (hpi) byly celkové RNA extrahovány z naočkovaných buněk pomocí TRIzol™ Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a celková RNA byla extrahována pomocí RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Německo). Extrahované RNA byly podrobeny analýze qRT-PCR pomocí soupravy THUNDERBIRD Probe One-step qRT-PCR Kit (TOYOBO, Osaka, Japonsko). Genom SARS-CoV-2 byl kvantifikován pomocí sad primerových sond pro N2 (Takara, Shiga, Japonsko). Jako endogenní kontrola byl použit β-aktin primátů jiného než lidského původu. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2005.07.002> (2005). " data-track="click" data-track-action="reference anchor" data-track-label="link" data-test="citation-ref" aria-label="Odkaz 33">33

. Hladiny N genu SARS-CoV-2 byly normalizovány s hladinami mRNA p-[aktinu34](#). Kromě toho byly hladiny virové RNA při 24 hpi normalizovány s hladinami virové RNA při 0 hpi. Všechny testy RT-PCR byly provedeny pomocí systému CFX96 Real-Time PCR System (BioRad, Hercules, CA,

USA). Tři nezávislé experimenty byly provedeny trojmo.

Analýza virucidní aktivity CPC proti SARS-CoV-2 ve slinách

Kmen SARS-CoV-2 Wuhan byl přidán do slin odebraných od zdravého dobrovolníka a smíchán se stejným množstvím CPC (konečná koncentrace: 0–40 µg/ml). Směsi slin byly zředěny na 1/100 pro snížení viskozity a přefiltrovány přes 0,45 µm filtry (Sartorius) k odstranění bakterií a plísní. Plakový test byl proveden tak, jak bylo popsáno dříve (část „[Plakový test](#)“). Tři nezávislé experimenty byly provedeny trojmo.

Analýza gradientu hustoty sacharózy

Kmen SARS-CoV-2 Wuhan byl ošetřen CPC (50 µg/ml) nebo Triton X-100 (1 %) při pokojové teplotě po dobu 10 minut. Po inkubaci byly směsi nanесeny na 10%–50% gradienty hustoty sacharózy. Po ultracentrifugaci s Optima XE-90 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) po dobu 6 hodin při 250 000 × *g*, každých 100 µl gradientů bylo frakcionováno do 22 frakcí a smícháno se 100 µl vzorkového pufru SDS-PAGE a vařeno při 95 °C po dobu 5 minut. Po uvaření byly analyzovány pomocí 10% SDS-PAGE s následnou imunoblotovou analýzou s použitím myší monoklonální protilátky proti SARS-CoV-2 S proteinu (GTX632604) nebo králíčího polyklonálního N proteinu (GTX135357) (GeneTex, Irvine, CA, USA). Membrány byly po přenosu naříznuty při 100 kDa a hybridizovány s protilátkou proti S proteinu, respektive s protilátkou proti N proteinu a podrobeny vizualizaci. Pro zobrazování byl použit ImageQuant LAS 4000 mini (FUJIFILM Corporation, Tokio, Japonsko) (obr. [S4](#)).

Transmisní elektronová mikroskopie

Kmen SARS-CoV-2 Wuhan byl ošetřen 1 x PBS, CPC (10, 50 a 250 µg/ml) a Triton X-100 (1 %) po dobu 10 minut při teplotě místnosti. Směsi byly fixovány 2,5% glutaraldehydem při 4 °C po dobu 24 hodin. Fixovaný vzorek (5 µl) byl umístěn na list Parafilmu. Formvar Film (#10-1009, Okenshoji, Tokio, Japonsko) byl umístěn na každou kapku, aby adsorboval virus po dobu 5 minut. Mřížky byly promyty DDW a umístěny na kapku filtrovaného 2,0% roztoku octanu uranylu na další 1 minutu, vysušeny na vzduchu a vyšetřeny pomocí JEM-1400 TEM (JEOL, Tokyo, Japonsko) při 80 kV.

Statistika

Statistické analýzy byly provedeny pomocí Graphpad Prism v9 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Data jsou prezentována jako průměrné hodnoty ± SD biologických triplicátů. Statistická analýza byla provedena pomocí jednosměrné analýzy rozptylu. Pro všechny soubory dat byla za významnou považována hodnota *p* menší než 0,05.

Institucionální revizní komise

Studie byla provedena v souladu s Helsinskou deklarací a schválena Institucionálním etickým výborem Univerzity Hokkaido (schválené číslo: 2021–2).

Informovaný souhlas

Informovaný souhlas byl získán od všech subjektů zapojených do studie.

Dostupnost dat

Soubory dat vytvořené během a/nebo analyzované během aktuální studie jsou k dispozici od odpovídajícího autora na přiměřenou žádost.

[ZDROJ](#)