



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

ANALÝZA KORONAVIRŮ METODOU QRT-PCR A MOŽNOSTI TERAPIE POMOCÍ NANOLIPOSOMÁLNÍCH NOSIČŮ REKOMBINANTNÍCH ANTIGENŮ

ANALYSIS OF CORONAVIRUS BY QRT-PCR AND POSSIBLE THERAPY BY NANOLIPOSOMAL CARRIERS OF
RECOMBINANT ANTIGENS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Lenka Krchová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Jaroslav Turánek, CSc.

BRNO 2022

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1641/2021 Akademický rok: 2021/22
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Lenka Krchová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Jaroslav Turánek, CSc.**

Název diplomové práce:

Analýza koronavirů metodou QRT–PCR a možnosti terapie pomocí nanoliposomálních nosičů rekombinantních antigenů

Zadání diplomové práce:

1. Zavedení a optimalizace metody stanovení SARS–CoV–2 pomocí QRT–PCR a diskriminační PCR.
2. Příprava nanoliposomů technikou mikrofluidizace a vysokotlaké extruze.
3. Charakterizace liposomálních nosičů pomocí moderních fyzikálně–chemických metod.
4. Navázání rekombinantních antigenů s HisTag kotvou na liposomy metalochelatační vazbou a srovnání komplexů s Ni⁺² a Zn⁺² pomocí ITC.
5. Inkorporace molekulárních adjuvans do proteoliposomů.
6. In vitro testování imunitní odezvy na buněčných liniích.

Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2022:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Lenka Krchová
studentka

prof. RNDr. Jaroslav Turánek,
CSc.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá studiem koronavirů, jejich diagnostikou a následně možnou konstrukcí rekombinantní vakcíny na bázi liposmálních nosičů rekombinantních antigenů. Experimentální část diplomové práce se dotýká dvou rovin. Nejdřív byla měřena a zkoumána diagnostika viru SARS-CoV-2 metodu real-time PCR. Bylo pracováno s biologickým materiálem velkého počtu pacientů. Společně se základním stanovením přítomnosti viru bylo zkoumáno, jak je virová částice stabilní v čase, jak odolává teplotním změnám, jaký vliv má naředění nosného media na hodnotu Ct a další dílčí experimenty. Ze všech metadat je v závěru vyhodnocena nejpřínosnější varianta pro diagnostiku patogenu. Experimentální část následně navazuje na možnou terapii pomocí rekombinantních vakcín. Tato problematika je velmi aktuální a hýbe celou odbornou veřejností. Byly připraveny liposomy, které v rekombinantních vakcínách slouží jako nosiče bioaktivních látek. Liposomy byly homogenizovány extruzí na požadovanou velikost a různě povrchově modifikovány. Bylo zkoumáno navázání antigenu, stálost v čase a případná degradace. Liposomy byl charakterizovány pomocí DLS, nanoflow cytometrie a elektronové mikroskopie.

ABSTRACT

This thesis deals with the study of coronaviruses, their diagnostics and subsequently the possible construction of a recombinant vaccine based on liposomal carriers of recombinant antigens. The experimental part of the thesis touches upon two levels. First, the diagnosis of SARS-CoV-2 virus was measured and investigated by real-time PCR. Biological material of a large number of patients was worked with. Together with the basic determination of the presence of the virus, the stability of the viral particle over time, its resistance to temperature changes, the effect of dilution of the carrier medium on the Ct value and other sub-experiments were investigated. From all the metadata, the most useful variant for pathogen diagnosis is finally evaluated. The experimental part is then followed by a possible therapy with recombinant vaccines. This issue is very topical and moves the whole professional community. Liposomes have been prepared which serve as carriers of bioactive substances in recombinant vaccines. The liposomes were homogenized by extrusion to the desired size and variously surface modified. Antigen binding, stability over time and possible degradation were investigated. Liposomes were characterized by DLS, nanoflow cytometry and electron microscopy.

KLÍČOVÁ SLOVA

QRT-PCR, SARS-CoV-2, alelická diskriminace, liposom, antigen, rekombinantní vakcína

KEYWORDS

QRT-PCR, SARS-CoV-2, allelic discrimination, liposome, antigen, recombinant vaccine

KRCHOVÁ, Lenka. *Analýza koronaviřů metodou QRT-PCR a možnosti terapie pomocí nanoliposomálních nosičů rekombinantních antigenů*. Brno, 2022. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/140792>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce prof. RNDr. Jaroslav Turánek CSc. DSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

Podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala prof. RNDr. Jaroslavu Turánkovi, CSc., DSc. za odborné vedení, pozitivní přístup a cenné rady, které mi při zpracování diplomové práce poskytl. Mé obrovské poděkování patří Ing. Elišce Bartheldyové PhD., které děkuji především za trpělivost, všestrannou pomoc a za čas, který mi věnovala. V neposlední řadě děkuji také rodině, partnerovi a blízkým přátelům, kteří mě po celou dobu studia podporovali.

OBSAH

OBSAH	5
1 ÚVOD	7
2 TEORIE.....	8
2.1 RT-PCR a PCR.....	8
2.1.1 Příprava analytu.....	8
2.1.2 Průběh reakce v termocycleru.....	9
2.1.3 Detekce fluorescenčního signálu.....	10
2.1.4 Alelická diskriminace.....	10
2.1.5 Princip metody	11
2.1.6 Vyhodnocení	12
2.1.7 Bezpečnost práce a kontaminace.....	13
2.2 Liposomy.....	14
2.2.1 Klasifikace liposomů.....	15
2.2.2 Příprava liposomů	16
2.2.3 Metody charakterizace	19
2.3 Modifikace liposomů.....	24
2.3.1 Rekombinantní receptor vázající doména (RBD – receptor binding domain)...	24
2.3.2 Polysacharid Manan	25
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	26
3.1 Použité chemikálie, přístroje a biologický materiál	26
3.1.1 Použité chemikálie	26
3.1.2 Biologický materiál	26
3.1.3 Použité přístroje.....	27
3.2 Použité metody	29
3.2.1 Izolace viru.....	29
3.2.2 Pipetovací stanice Myra – beziolační metoda	30
3.2.3 Příprava mastermixové směsi.....	31
3.2.4 PCR reakce	32
3.3 Příprava liposomů.....	33
3.3.1 Navázání antigenu + DLS	34
3.3.2 Analýza Nano FCM postup práce	36
3.3.3 Technika FT-IR postup práce.....	36
3.3.4 Fotografie na elektronovém mikroskopu SEM	37
4 VÝSLEDKY A DISKUZE	38

4.1	Diagnostika viru SARS-CoV-2	38
4.1.1	Diagnostika SARS-CoV-2 na různých komerčních kitech	42
4.1.2	Experimenty s biologickými stěry.....	44
4.1.3	Určení typu mutace	48
4.1.4	Výsledky měření metodou DLS	50
4.1.5	Nanoanalyzer Nano FCM.....	54
4.1.6	FT-IR.....	56
4.1.7	Fotografie elektronového mikroskopu SEM	58
5	ZÁVĚR.....	60
6	Seznam použité literatury	62
7	Seznam zkratk	69

1 ÚVOD

V současnosti zažívají moderní biotechnologické metody velký rozvoj. Jejich rozvoj a vývoj ještě urychlila světová pandemie COVID-19. Poptávka po diagnostických metodách byla několikanásobně větší a diagnostika jednoho patogenu se stala součástí každodenního fungování. Díky tomu bylo nezbytné přizpůsobit klinickou praxi obrovskému náporu a zároveň byl vyvíjen enormně velký tlak na odbornou veřejnost na vývoj rychlé a spolehlivé vakcíny.

PCR je jednou z nejdiskutovanějších analýz. Je to prakticky jediná spolehlivá možnost prokázání virové částice v organismu. Díky amplifikačním křivkám je možno stanovit přítomnost virové částice. Metodu PCR vynalezl v roce 1983 laureát Nobelovy ceny Kary Mullis, při bádání o sekvenaci nukleonových kyselin. Od té doby je PCR jednou ze základních chemických technik a její využití je velmi široké, a to především kvůli vysoké citlivosti, specifčnosti a rychlosti. V dnešní době existuje více typů polymerázové řetězové reakce – záleží na konkrétním uživateli a jeho potřebách. Pakliže je společnost schopna detekovat příslušný patogen, je žádoucí proti němu bojovat. Jedna z možností jsou rekombinantní vakcíny. Tyto vakcíny obsahují pouze fragment patogenu, proti kterému jsou cíleny. Tato částice následně vyvolá imunitní odpověď a díky obsahu pouhého fragmentu patogenu se výrazně snižují možné nežádoucí účinky. Nejznámější rekombinantní podjednotkovou vakcínou je v České republice vakcína proti žloutence typu B, která je součástí tzv. hexavakcíny.

V historii už bylo několik světových pandemií, které bez moderních diagnostických metod a následné správné terapie byly mnohem smrtelnější. Obecně platí, očkování je jeden z největších objevů lidstva a díky proočkovanosti populace se podařilo vymýtit některé infekční onemocnění, jako byly pravé neštovice

2 TEORIE

2.1 RT-PCR a PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je molekulární metoda, která je v současnosti velmi využívaná. Jedná se o analytickou metodu založenou na opakované denaturaci deoxyribonukleové kyseliny (DNA). Následně se uvolněné řetězce renaturují. Tyto řetězce obsahují specifické oligonukleotidy, které jsou v nadbytku. Následně slouží jako primery pro syntézu nového řetězce DNA. Celá metoda probíhá *in vitro* v termocycleru, který mění teplotu v požadovaných intervalech. Výsledkem je velké množství vytvořených kopií původní sekvence DNA. Výstupem je amplifikační křivka, která je nositelem informace o průběhu měření [1][2].

Pakliže je potřeba amplifikovat jednovláknovou RNA (*mRNA*) namísto DNA, lze využít PCR s reverzní transkripcí. Metoda se označuje RT-PCR a vyizolovaná *mRNA* je převedena enzymem reverzní transkriptázy na komplementární DNA (*cDNA*). Poté proběhne běžná PCR a výstupem je opět amplifikační křivka [1][2].

RT-PCR se využívá ve vědě a výzkumu ale také v běžné laboratorní praxi, a to především v diagnostických laboratořích pro stanovení vybraných dědičných a infekčních onemocnění [1][2].

2.1.1 Příprava analytu

Na PCR je nutné analyt připravit. Momentálně se užívají tzv. izolační a bezizolační metody.

Bezizolační metoda je rychlejší a levnější než izolační proces. Nosné medium, ve kterém má být prokázána přítomnost RNA viru, se zcentrifuguje a následně napipetuje do mastermixové směsi pro PCR reakci. Centrifugace musí být dostatečně dlouhá a počet otáček musí odpovídat složení nosného media.[1][3]

Přidání izolačního kroku je časově a finančně náročnější než u bezizolačních technik. Její přesnost a kvalita výsledků je ale mnohem vyšší. Nosné medium s biologickým materiálem se řádně protřepe na vortexu a napipetuje do připravené desky, kde jsou přítomny magnetické partikule. Procesem extrace se nukleonové kyseliny vyizolují a do termocykleru se v příslušných stripech dostane pouze izolát. Proces izolace se odvíjí od konkrétní techniky, nicméně řádově trvá do 30 min od začátku izolace. Izolace nemusí být založena pouze na magnetické separaci. Další možnosti, jak vyizolovat nukleonové kyseliny jsou například – organická extrace, extrakce pomocí silikátů, vysolení DNA z roztoku apod [1][3].

2.1.2 Průběh reakce v termocykleru

Amplifikace probíhá ve třech krocích, které na sebe navazují a v požadovaných intervalech se opakují. Doba trvání jednotlivých cyklů se mírně liší a je přednastavená od výrobce a dodavatele konkrétních reagensí. V případě použití *in-haus* metod, je nutné optimalizovat teplotní profily PCR.

1. Denaturace
2. Annealing
3. Elongace, extenze, syntetická fáze

V prvním kroku se DNA rozpadá (cca 90 °C) a zanikají vodíkové můstky mezi dusíkatými bázemi. V molekulární chemii se tomuto procesu říká, že z *dsDNA* (dvouvláknová DNA) vznikne *ssDNA* (jednovláknová DNA). Navazující krok hybridizace probíhá za nižší teploty (zpravidla 55 °C) a jednořetězcová DNA, která vznikla při denaturaci, začínají renaturovat. Většinou jsou přítomné oligonukleotidy v nadbytku a začínají hybridizovat se svou komplementární sekvencí. U oligonukleotidů je proces mnohem rychlejší než u jednořetězcové DNA. Teplota, za které proces annealingu probíhá je velmi důležitá. Pokud je nízká, primery nasedají i na ne zcela komplementární části a dochází k vytvoření nespecifického produktu. Při vysoké teplotě naopak primery hybridizují nedostatečně a výsledného produktu vznikne nedostatečné množství. V posledním kroku reakce probíhá syntéza nově vzniklých řetězců. Teplota v termocykleru je oproti hybridizaci trochu vyšší, nicméně nedosahuje hodnoty teploty denaturace. Oligonukleotidy, které se navázaly na jednořetězcovou DNA slouží jako primery pro DNA polymerázu, což je enzym zajišťující syntézu DNA [3][4].

Po prvním cyklu PCR je počet řetězců DNA dvojnásobný. Výhodou metody je, že je samo zásobovací. V každém dalším cyklu slouží jako templát pro polymerázu nově vytvořený řetězec z předchozího cyklu. Je tedy zřejmé, že počet nově vytvořených řetězců má exponenciální trend přírůdku [3][4].

Cyklů, které se opakují, je v klasické verzi PCR 42. Jednoduchou matematikou lze spočítat, že po 30 cyklech je ve stripu přítomno 10^9 x více specifického produktu. V praxi je to ale limitní hodnota, ke které se analýza pouze přibližuje. Tolik kopií DNA nevzniká, protože dochází k postupnému vyčerpávání reagensí v průběhu celé amplifikace.

2.1.3 Detekce fluorescenčního signálu

V procesu hybridizace dojde k odštěpení fluoroforu a fluorescenční signál je detekován uvolněním energie. Fluorofor je chemická sloučenina (často heterocyklický polyaromatický uhlovodík), která je navázána na amplikon, nebo je jím značena fluorescenční sonda. Výsledná fluorescence (emise) se odvíjí od schopnosti absorpce a emise fotonů. Jak moc fluorofor emituje fotony je silně závislé na teplotě, proto má každá PCR reakce odlišně nastavený teplotní profil. Detekce se skládá ze tří fází:

- Excitace
- Emise
- Vyhodnocení dat

Fluorofory po ozáření excitují do vyšší energetické hladiny (proces excitace), následně se zpět navrátí do své energetické hladiny a energie, která je nadbytečná je vyzářena ve formě fluorescenčního záření (proces emise) Následně jsou všechny naměřená data o fluorescenčním signálu převedena do PC, kde jsou křivky vyhodnoceny na přítomnost virové částice [1][3][11].

2.1.4 Alelická diskriminace

Jedná se jednu z metod k určení genotypu pomocí *real-time PCR*. Diskriminační PCR se provádí u vzorků, které již byly detekovány jako pozitivní. Jako pozitivní vzorek se označí analyt, který vykazuje přítomnost studovaného genu, nebo jeho fragmentu. Pomocí této specifické techniky je možno určit konkrétní typ virové částice, respektive změně její RNA (případně DNA). Předem musí být definováno, která konkrétní varianta mutace je hledaná a pro tu konkrétní mutaci je diskriminační test navržen. *Termocycler* vztáhne intenzitu fluorescence vzorku k intenzitě referenční v každé jamce stripu a specifické sondy je zobrazí v alelo diskriminačním plotu podle jejich umístění. Zároveň je přiřazen i konkrétní genotyp [5][6].

Mutování viru je v přírodě zcela běžná věc. Typů mutace je několik, nicméně vždy vedou ke změně genomu viru. Mohou např. zvyšovat virulenci, snižují přenositelnost viru, nebo vir snadněji bojuje s protilátkami očkovaní. Vybrané varianty se mohou v průběhu času

modifikovat, objevovat a zanikat. Změny se nejčastěji dějí na schopnosti vázat se na receptor, což znamená snadnější nalezení hostitele (vyšší transmisibilita). V této práci je pro správné a ucelené vysvětlení ukázáno, jak metoda funguje při detekci viru SARS-CoV-2. Tento vir byl vybrán díky globální aktuálnosti a velmi rychlé tvorbě nových mutačních variant. Jeho fylogenetický strom ještě není zcela probádán [5][6].

2.1.5 Princip metody

Diskriminační polymerázová reakce je schopna detekovat specifické sekvence volných genů **RdRp**, **E** a **N** v jedné reakci. Jednotlivé geny se detekují pomocí zvýšené fluorescence, díky přítomnosti fluoroforů – viz tabulka číslo 1. Tyto tři geny jsou použity jako cíle pro screening koronaviřů. Gen E má vysokou úroveň homogenity (98,7 %), N protein stabilizuje virovou mRNA a mutace na něm zvyšují virovou infekčnost a gen RdRp (RNA – dependentní RNA polymeráza) přímo řídí syntézu komplementárních molekul [12][13][14].

Jako kontrolní mechanismus celé metody slouží interní kontrola IC. Interní kontrola je tvořena z molekul nukleové kyseliny, které obsahují vazebná místa pro dané *primery*. IC slouží ke kontrole správné izolace, účinnosti kroku reverzní transkripce (přepis RNA do dDNA) a účinnosti PCR amplifikace (respektive inhibice PCR). Pozitivní amplifikace IC je detekována ve fluorescenčním kanálu pro fluorofor HEX [7][12][13][14].

Gen	Kanál
RdRp	FAM
N gen	Cy5
IC	HEX
E484K	ROX
ERC	Q705

Tabulka číslo 1: Uspořádání genů a přiřazených fluorescenčních kanálů

2.1.6 Vyhodnocení

Amplifikační křivky, které termocykler detekuje, je nutné správně interpretovat. Je nezbytná správná kombinační technika jednotlivých fluorescenčních kanálů. Pakliže není signál detekován ani v jednom kanálu, je nutné opakovat celé vyšetření příslušného biologického materiálu.

Tabulka číslo 2: Shrnutí vyhodnocení alelické diskriminační reakce

Q 705	ROX	FAM	Cy5	HEX	Výsledek	Interpretace	Kód mutace
ERC	E484 K	RdRp/ E	gen N	IC			
+/-	+	+	+	+/-	validní	SARS-Co-2 pozitivní	B 1.1.7
+/-	+	-	+	+/-	validní	SARS-Co-2 pozitivní	B 1.351
+/-	-	+	-	+/-	validní	SARS-Co-2 negativní	P.1
-	+	-	+	-	validní	SARS-Co-2 negativní	B 1.617.2/ B 1.617.3
-	-	-	-	-	nevalidní	X	-

Každá mutace má přiřazený kód, který je kombinací číslic a písmen. Tyto kódy byly vytvořeny a certifikovány vládní organizací *US CDC (Centres for Disease Control and Prevention, USA)* a jsou neustále aktualizovány. Detekce jednotlivých mutací jsou klasifikovány do dvou tříd – *Variant of Concern (VOCs)* a *Variant of Interest (VOI)*. Společnost *WHO* každé rozšířené variantě udělí název dle písmen řecké abecedy. Zpočátku se nové varianty viru pojmenovávaly dle státního celku, kde byly poprvé objeveny. Postupem času se toto značeníjevilo jako nešťastné, proto se od toho celosvětově upustilo a nahradilo právě řeckou abecedou. Pro tuto práci jsou vybrány mutace, které jsou v populaci nejrozšířenější a jejich záchyt je na denní bázi. Tabulka číslo 3 ukazuje, jaké kódy jsou přiřazené konkrétním pojmenováním [7][8].

Přehledně jsou v tabulce číslo 3 uvedeny nejvýznamnější mutace, které výrazně ovlivnily šíření viru.

Tabulka číslo 3: Shrnutí nejdůležitějších mutací viru SARS-CoV-2

Varianta	Státní identifikace	WHO označení
B 1.1.7	UK	Alfa
B 1.351	JAR	Beta
P.1	Brazílie/Japonsko	Gamma
B 1.617.2/B 1.6173	Indie	Delta/Kappa
B.1.1.529	Kolumbie	Omikron

2.1.7 Bezpečnost práce a kontaminace

Klinické laboratoře, kde se pracuje s biologickým materiálem mají několik úrovní ochrany a zabezpečení. Dle Státního úřadu pro jadernou bezpečnost (SUJB) jsou 4 základní kategorie, které jsou odstupňované dle výše rizika. Molekulární diagnostická laboratoř, kde se koronaviry detekují, spadá do úrovně BLS2. Je nutné dodržovat správnou laboratorní praxi, nosit ochranné oděvy, laboratorní prostory musí být správně označeny symbolem biologického nebezpečí, cesta vzorku musí být uzavřená. Pracovníci musí mít příslušné vzdělání a musí být důkladně proškoleni vnitřními směrnicemi [1][9][10].

Všechna výše zmíněná nařízení vedou k bezpečné práci s biologickými agens a mají předcházet vzniku kontaminace a vydání falešně pozitivního, respektive falešně negativního, výsledku diagnostického vyšetření. Kontaminace je jeden z nejvíce obávaných problémů v klinické laboratoři. Kontaminovaný run přijatých vzorků pacientů je nutné vyšetřit znovu ve všech krocích diagnostiky. Kontrolním mechanismem celého vyšetření je aditivní interní kontrola, která se přidává do každé jamky izolační desky a do všech pozic ve stripu v termocycleru. Kontaminace je časově i finančně zátěžová a je nezbytné konat všechny kroky tak, aby se jí snažilo maximálně předejít. V případě, že je v pozici negativní kontroly (většinou *RNA free* voda) zvýšená fluorescence, je patrné, že došlo ke kontaminaci vzorků už v izolátoru [1][9][10].

2.2 Liposomy

Liposomy jsou lipidní membránové struktury, které jsou mimo jiné využívány k přenosu bioaktivních látek přímo do nitra buněk. Jsou to uzavřené systémy tvořené lipidovými dvojvrstvami, které se svou velikostí často klasifikují jako nanostruktury. Právě díky podobné struktuře s biomembránami jsou v imunologii a farmakologii využívány jako cílené nosiče, transportní média a vektory [48][49][62].

Uspořádání lipidové struktury je závislé na teplotě a hydrataci. Struktura je také závislá na délce mastné kyseliny (respektive na jejím acylovém řetězci). Záleží také na tom, do jaké míry je saturován uhlovodíkový řetězec (přesněji na počtu a umístění dvojných vazeb) a na síle a množství Van der Waalsových mezimolekulárních interakcí. Fyzikálně-chemické vlastnosti se u liposomů odvíjí od jejich vlastního složení, pH, teploty, velikosti, metody přípravy a lamerality.

Stabilita liposomů je různá. Faktory, které stabilitu ovlivňují se dělí do čtyř skupin [48][49][62].

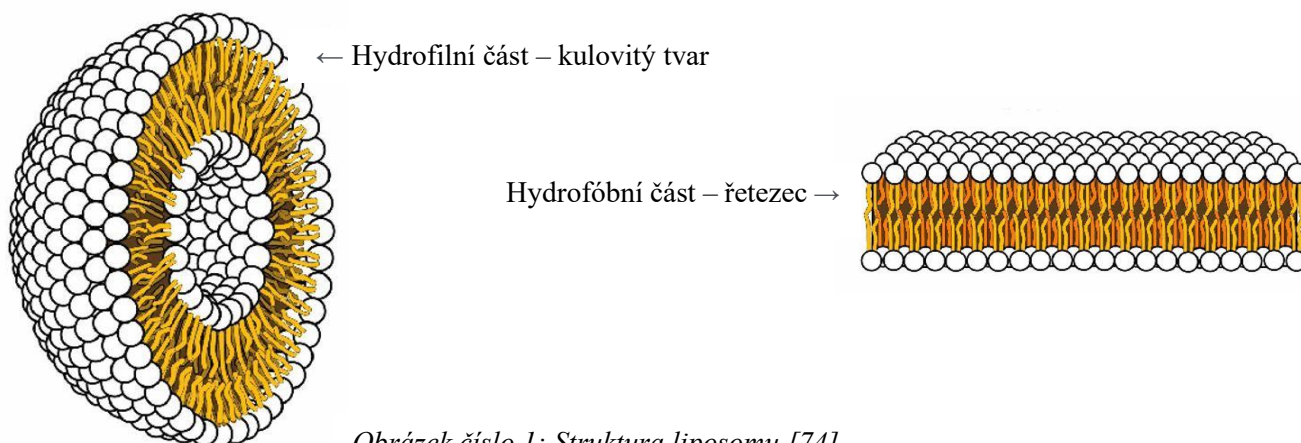
- Fyzikální stabilita
- Chemická stabilita
- Koloidní stabilita
- Biologická stabilita[50]

Fyzikální stabilita má vliv na *in-vivo* aplikace liposomů. Primárně se jedná o interakci s buňkami a extracelulárními strukturami. Fyzikální typ stabilizace určuje Zeta potenciál a menší příspěvek tvoří morfologie a fosfolipidové složení. Zeta potenciál je veličina, která určuje elektrostatické interakce mezi jednotlivými částicemi. Naměřené hodnoty Zeta potenciálu podávají informace o disperzích, agregacích a flokulacích. Všeobecně platí, že pokud je naměřený Zeta potenciál větší než 30 mV (respektive menší než 30 mV) považuje se liposomální koloidní systém za stabilní [51][52][53].

Chemická stabilita vyplývá z náchylnosti k degradačním procesům v biomolekule. Zpravidla se jedná o proces oxidace (radikálová organická reakce), které se účastní nenasycené mastné kyseliny. Tyto kyseliny mají v uhlíkatém řetězci násobné vazby, respektive delokalizované elektrony. Na tyto elektrony cílí kyslíkaté radikály a vazby štěpí. V závěru reakce dojde k odštěpení mastných kyselin z fosfolipidové molekuly. V dalších stupních hydrolyzace dojde k vytvoření glycerfosfátu. Zmíněné procesy jsou v zásadě nežádoucí. Oxidaci lze předejít použitím čistých chemikálií a zabráněním přístup

světla, nebo přidáním antioxidantů. Hydrolyza fosfolipidů je závislá na teplotě a pH. Při vhodně zvolených podmínkách, se lze hydrolyze znatelně vyvarovat [51][52][53].

Koloidní stabilita je velmi důležitý parametr, který byl v minulosti hluboce zkoumán. Stabilita liposomové disperze je dána přitažlivými a odpuzivými silami. Platí přímá úměra – čím větší odpuzivé síly, tím vyšší stabilita struktury. Moderní přípravy liposomů pracují s elektrostatickou stabilizací a sterickou stabilizací. Elektrostatická stabilita je založena na tom, že hustota povrchového náboje je natolik velká, že převáží příspěvek odpuzivé elektrostatické síly nad přitažlivými van der Waalsovými silami, což má souvislost se Zeta potenciálem. Sterická stabilita je založena na adsorpci polymeru na povrch liposomu. Především jde o znemožnění adsorpce plasmatickým proteinům. Na každý hydrofilní konec polymeru působí přitažlivé a odpuzivé síly (při dostatečném přiblížení). To zabraňuje nežádoucí agregaci. Tuto skutečnost využívají především *in-vivo* aplikace. Díky tomu se snižuje možnost rozpoznání liposomu imunitním systémem organismu [50][54][63][64].



Obrázek číslo 1: Struktura liposomu [74]

2.2.1 Klasifikace liposomů

Liposomy se v praxi dělí dle velikosti, povrchového náboje, podle počtu lamel, specializace, cirkulace atd. Nejvýznamnější faktory jsou – klasifikace dle velikosti, dle náboje a podle počtu lamel [55].

Velikost liposomů se pohybuje 20nm–10 μ m. Liposomy lze třídit na malé, střední, velké, oligomelární a multilamelární (viz tabulka číslo 4).

Dělení podle náboje je důležité pro řízený transport do buněk. Celkový náboj molekuly je určen polárními částmi molekuly. Celkový náboj též ovlivňuje stabilitu celého systému. Anionické liposomy jsou díky zápornému náboji snadněji rozpoznány cílovými buňkami a transportovaný „materiál“ snadno uvolní. Kationické liposomy se používají častěji (především v genové

terapii). Princip je založen na užití kvartérní amoniové skupiny, která je při pH 7 samovolně protonována. Nutno doplnit, že neutrální liposomy se k přenosu nevyužívají. Jejich nedostatkem je samovolná agregace a následná sedimentace těžké částice [54][55][56].

třídění dle počtu lamel je morfologicky velmi významné. V závislosti na způsobu syntézy a užitých stavebních jednotkách lze připravit liposomy, které se odlišují v počtu lamel. V základu lze konstatovat, že liposomy dělíme na unilamerální a multilamerální. Tyto dvě hlavní skupiny lze klasifikovat do menších podskupin (viz tabulka č.4). Malé unilamerální struktury jsou často využívány jako vektory farmak. Díky malé velikosti snadno proniknou do extravaskulárních prostorů [54][55][56].

Tabulka číslo 4: Shrnutí klasifikace liposomů, upraveno [56]

Typ	Unilamelární	Malé	Střední	Velké	Obrovské	Oligolamelární	Multilamerální
Velikost	20-1000 nm	20-100 nm	>100 nm	>100 nm	>1µm	0,1-1,0 µm	>0,5 µm
Lamely	1	1	1	1	1	5	0,25
Zkratka	UV	SUV	MUV	LUV	GUV	OLV	MLV

2.2.2 Příprava liposomů

Díky současným poznatkům vědy je více způsobů, jak připravit liposom. Podle typu přípravy se metody dělí do tří základních skupin:

- Mechanické disperzní metody
- Dvoufázové disperzní metody
- Detergentové disperzní metody [57]

Mechanické disperzní metody

Jedná se o původní a dosud stále využívané metody k přípravě liposomů. Metoda je založena na hydrataci lipidového filmu. K tomu se využívá rozpuštění lipidů v rozpouštědle (organického typu – často používaný chloroform nebo směs chloroformu s metanolem). Následně se rozpouštědlo ze směsi odstraní evaporací a produktem je tenký lipidový film. Zbytkové rozpouštědlo se ze směsi odstraní pomocí proudu suchého dusíku, příležitostně pak argonu. U větších objemů je vhodné užít vakuovou rotační odparku. Následný krok je hydratace (vodným roztokem) získaného lipidního filmu. Pro zajištění správné hydratace

by vodný roztok měl být přidáván za teploty, která odpovídá T_c lipidu. T_c je teplota, při níž se lipidy z pevné fáze dostávají do fáze tekuté, respektive s gelové do fluidní. Jedná se tudíž o teplotu fázového přechodu. V praxi se často využívá fyziologický roztok, nebo biokompatibilní pufr. Produktem hydratace lipidního filmu jsou MLV liposomy. Výslednou směs je možno upravit pomocí sekundárních procesních metod – extruze přes membránové filtry, vysokotlaká homogenizace, mikrofluidní homogenizace, zmrazování nebo sonifikace. Vybrané metody jsou v práci popsány detailněji. V závěrečném kroku může být využita chemická modifikace – navázání potřebných ligandů [28][29].

Dvoufázové disperzní metody

Postup vychází z rozpuštění lipidů v etherové směsi. Hojně využívaná je směs – methanolu a diethyletheru. Poté je struktura převedena do vodného roztoku. V něm se začnou tvořit liposomy a současně dochází k enkapsulaci látek (vhodná teplota je 55–65 °C). Pakliže je v roztoku nadbytek organického rozpouštědla, nejspíše se ho lze zbavit mírným snížením tlaku v celé soustavě. Uvedený postup lze v literatuře najít pod názvem *etherová injekce*. V praktickém užívání metody je za hlavní nedostatek považována vysoká teplota a vznik heterogenní populace liposomů. Liposomy obvykle narůstají od 70 do 200 nm. Druhým typem přípravy je tzv. *Ethanolová injekce*. Lipidy jsou rozpuštěny v ethanolu a vstříkují se do vodného roztoku. Následným produktem jsou liposomy typu MLV. Stejně jako u etherové injekční metody vznikne populace heterogenních liposomů. Odstranění ethanolu je obtížnější. Často se proto využívá proces lyofilizace. Posledním typem přípravy je reverzní fázová evaporace. Produktem jsou inverzní micely. K jejich přípravě je nutný pufr (vodní fáze). Výhodou metody je vznik liposomů s velkým vnitřním objemem a díky tomu i vyšší enkapsulační účinností (zejména pro hydrofilní látky). Tato metoda dosud není realizovatelná v průmyslové výrobě [30].

Detergentové disperzní metody

Lipidy se rozpustí ve vodném roztoku detergentu. Produktem reakce jsou směsné micely. Požadované liposomy se utvoří při snížení koncentrace detergentu pod hranici kritické micelární koncentrace (CMC). Soustavu lze zředit, využít proces dialýzy, nebo roztok podrobit gelové permeační chromatografii. Při dialyzačním procesu, který je často používán, vznikne homogenní liposomová populace. Nespornou výhodou je i možná reprodukovatelnost přípravy liposomů. Díky nedestrukční a jemné technice je zachována funkce takřka všech proteinů. To lze využít při rekonstrukci lipidové dvojvrstvy liposomů u membránově vázaných proteinů [31].

V širším pojetí, lze postup jednotlivých způsobů přípravy liposomů shrnout do čtyř navazujících úseků.

1. Vznik emulze (disperze)
2. Odstranění organického rozpouštědla – vznik liposomálních vezikul
3. Přizpůsobení liposomů (velikost, stabilita, tvar)
4. Navázání ligandů [31]

2.2.2.1 Mikrofluidizace

Mikrofluidizace, nebo též mikrofluidní směšování, je příprava liposomů, která je současně využívaná v laboratorní i průmyslové praxi. Jedná se o analytickou aplikaci, která shrnuje celý proces – od přípravy vzorku po enkapsulaci léčiva. Důležitou výhodou je malá spotřeba energie, relativně velký výkon a mizivé výrobní náklady. Metoda je založena na směšování kapalin v mikrokanálku. Tekutiny jsou směšovány podle potřeb výsledných produktů. Připravené liposomy mají zpravidla vyšší stabilitu a menší velikost částic. Metoda je zároveň výhodná pro větší produkci nosičových systémů, má solidní reprodukovatelnost. Liposomy připravené touto technikou optimálně zapouzdřují komponenty za nízké spotřeby rozpouštědel.

Úprava velikosti liposomů mikrofluidní homogenizací je energeticky náročný proces. Příprava je podpořena vysokým tlakem (až $68,94 \cdot 10^4$ Pa). Důležitá je dynamika ve speciálních mikrokanálcích. Díky velmi vysoké turbulenci (výsledné hybnosti) je emulze schopna dostat se za hranici své energetické bariéry (ΔG). Základem úspěšné přípravy je dostatečně výkonné čerpadlo. Proud kapaliny s liposomy se následně rozdělí na dva fluidní toky. Mezi nimi dochází k interakci v ultravysokých rychlostech ve speciální cele z odolného keramického materiálu. Interakce probíhají právě ve speciálních mikrokanálcích a produktem jsou nanoliposomové systémy o definované velikosti částic [16] [32][58].

V praxi se lze setkat s dvěma typy mikrofluidizace:

- dvoukroková jednokanálová
- jednokroková dvoukanálová

Nelze s jistotou konstatovat, který typ přípravy je lepší. Obecně lze říci, že díky svým vlastnostem má širší využití ve farmaceutickém sektoru metoda jednokroková dvoukanálová [17] [60].

V porovnání s ostatními možnostmi příprav liposomů, má mikrofluidizace následující benefity:

- Příprava velkého objemu nanoliposomů
- Reprodukovatelnost
- Možná úprava velikosti připravených liposomů
- Solidní účinnost záchytu (enkapsulace až 75 %)
- Aktivní látky nejsou vystaveny nežádoucím účinkům UTZ, detergentů a organických rozpouštědel
- Liposomy jsou stabilní, nepodléhají fúzi
- Malá míra poškození enkapsulovaných látek [59][61]

2.2.2.2 Vysokotlaká extruze

Touto metodou se připravují liposomy o konkrétní velikosti. Jedná se o poměrně jednoduchou metodu, kde se využívá extrudér s polykarbonátovými membránovými filtry. Liposomy několikrát za sebou prochází filtry s různou velikostí pórů. Po protlačení dochází ke vzniku částic, které mají rozměry obdobné velikosti pórů filtru, kterým byly protlačeny. Dojde k vytvoření homogenní struktury. Vezikuly lze extrudovat přes 0,2 μm veliké póry a následně sterilně filtrovat, čímž dosáhneme přípravy sterilního produktu. vhodného pro užití *in-vivo* (zpravidla injekční aplikace).

Hlavní přednosti metody přípravy jsou:

- reprodukovatelnost
- redukce velikosti liposomů
- produkce velmi malých liposomů
- možnost ovlivnění polydisperzity a středního průměru (díky parametrům procesu)

[15][16][17][20].

2.2.3 Metody charakterizace

Reakce a chování nanoliposomů vyplývá z jejich struktury. Podíl na tom má jejich tvar, velikost, polydisperzita a velikost povrchu. Liposomy lze charakterizovat několika způsoby. Záleží vždy na tom, jaká technika je pro daný experiment nejvhodnější a který parametr je nejdůležitější [55] [28].

2.2.3.1 Dynamický rozptyl světla

Dynamický rozptyl světla je fyzikálně analytická metoda, která zkoumá vlastnosti jednotlivých částic v systému (roztoku). V současnosti se využívá pro získání informace o velikosti a distribuci velikosti částic. U nanočástic je metoda ještě využívána k určení koloidní stability se sférickou nebo anizotropní strukturou. Obvykle se pohybuje v submikronových rozměrech (stovky nanometrů). Princip metody je založen na měření intenzity světla, které molekuly analytu rozptýlily v průběhu známého, předem definovaného času. Molekuly v roztoku difundují Brownovým pohybem. Dle pohybu částic se frekvence rozptýleného záření zvyšuje, respektive snižuje. Díky tomu dochází ke vzniku rozdílu mezi rozptýlenými vlnami, které mezi sebou interferují. Z toho vyplývá, že čím pomaleji se molekuly pohybují, tím pomaleji se mění intenzita rozptýleného světla. Velikost měřitelných částic se pohybuje v intervalu 0,5 nm – 3 μm. Větší částice nepodléhají Brownově pohybu. K měření velikosti částic na principu dynamického rozptylu světla se využívají přístroje Zetasizer Nano (viz obrázek číslo 11). [18][19][25][26][27].

2.2.3.2 Mikroelektroforéza

Elektroforéza je metoda, která je založena na pohybu nabitých částic v kapalině či gelu v elektrickém poli. Díky tomu, je možno stanovit stabilitu částic pomocí Zeta potenciálu. Potenciál vznikne prouděním kapaliny kolem stacionárně nabitého povrchu. V okolí částic dojde k vytvoření elektrické dvojvrstvy a proudící kapalina se diferencuje na vnitřní a vnější difúzní oblast. V literatuře se vnitřní oblast označuje jako Sternova vrstva. Díky tomu dochází k oddělení iontů částic, které se pohybují a těch, které setrvávají na místě. Zeta potenciál, který se odečítá právě na hranici, lze stanovit za využití Henryho rovnice. Velikost zeta-potenciálu je parametrem pro určení stability koloidního systému [33].

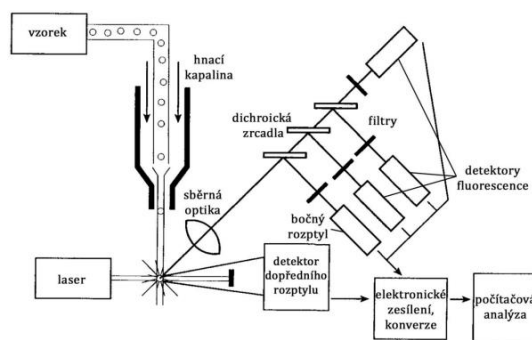
2.2.3.3 Fluorescenční spektroskopie

Jedná se analytickou bezkontaktní a nedestruktivní metodu, která je založena na působení elektromagnetického záření vůči předmětnému analytu. Dochází zde k výměně energie. Fluorescence je přírodní jev, kdy se excitovaná částice vrací do svého základního stavu a tím vyzáří určité množství energie. Tato vyzářená energie se zachytí v podobě fotonu. Jedná se tudíž o emisní energii. Excitační i emisní energie shrnuje Jablonského diagram. Fluorescenci

vykazují jen určité molekuly. Označují se jako fluorescenční sondy a zpravidla se jedná o organické látky s konjugovaným systémem π vazeb nebo fluorescenční proteiny. Naměření výsledné emisní energie poskytuje informace o polaritě, koncentraci, potenciálu nebo viskozitě. Využití je velmi široké. Pro účely této diplomové práce bude zmíněna ještě metoda *Fluorescenční korelační spektroskopie*. Pro liposomy je přínosná zejména pro získání podrobnějších informací o velikosti, pohyblivosti a koncentraci fluorescenční látky ve zvoleném analytu. Ve své podstatě se jedná o aplikaci konfokální skenovací mikroskopie. Uspořádání je totožné až na zafixování laserového paprsku. Ke snímání dochází v průběhu času daného experimentu a výsledná data poskytnou informaci o vývoji intenzity fluorescenčního signálu, který prochází molekulami. Když se fluorescenční molekula setká s analytem, na který působí laserový paprsek, fluorescenční signál se zintenzivní. Při opuštění fluorescenční oblasti dojde k viditelnému poklesu signálu. Vyhodnocením lze dostat informaci o době pobytu molekuly v oblasti ozářené laserovým paprskem (informace o pohyblivosti a velikosti částice) a kvantitativní informaci o počtu molekul [34] [35] [36].

2.2.3.4 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je biologická metoda, která je využitelná zejména na molekulární úrovni. Hlavní část aparatury tvoří kapilára, která unáší jednotlivé částice (v nosném médiu) k laserovému paprsku. Díky zprostředkování interakce paprsek-částice dochází k lomu a rozptylu světla. Z toho lze získat informace o velikosti a granularitě (pakliže analytem jsou buňky). Průtokový cytometr se skládá ze tří částí – fluidní systém pro hydrodynamickou fokusaci, optický a elektronický systém. Optický systém obsahuje laserový paprsek, soustavu zrcadel a emisní filtr. Elektronický systém se využívá pro detekci a digitalizaci signálu. Průtoková cytometrie umožňuje odečíst fyzikální i chemické vlastnosti, analýzu buněčného cyklu, stanovení obsahu DNA, třídění jednotlivých částic a díky univerzálnosti použití ji velmi často využívají klinické laboratoře i výzkumná centra. Pro analýzu nanočástic byla zavedena průtoková nanocytometrie, která umožňuje analýzu nanočástic v rozsahu 6-1000 nm podle jejich indexu lomu [37][38][39][40][41].



Obrázek číslo 2: Princip průtokové cytometrie, převzato upraveno podle [75]

2.2.3.5 Gelová chromatografie (GPC)

Jedná se o chromatografickou techniku, jejímž principem je dělení molekul zpravidla podle velikosti. Stejně jako u klasické chromatografie systém pracuje s dvěma fázemi. Jako stacionární fáze jsou často používány korpuskulární gelové sorbenty s předem známou velikostí pórů. Gel je možno pomocí síťovacích činidel upravit tak, aby poloměr pórů byl co nejvhodnějším k danému experimentu. Analyt postupuje stacionární fází za třídění částic dle velikosti. Velké molekuly jsou eluovány rychleji a opouštějí kolonu jako první. Naopak malé částice vstupují do pórů gelu a jsou na koloně zadržovány. Metoda je často využívána k purifikaci populací liposomů a její úspěšnost závisí na vhodně zvolených podmínkách. V praxi se setkáváme s omezováním efektů difuzního rozšiřování elučnicích zón během separace a vhodnou selektivitou dělení. Hlavním parametrem téměř vždy zůstává užití vhodné chromatografické matrice – stacionární fáze [42] [43].

2.2.3.6 Isotermální titrační kalorimetrie ITC

Isotermální titrační kalorimetrie je technika, která vychází z teplotních změn. Z názvu vyplývá, že analýza probíhá pomocí malých, pravidelně se opakujících přídavek ligandu za konstantní teploty. Teplo, které se během reakce uvolní, respektive spotřebuje, je základem pro výsledná data. Aparatura sestává z dvou cel – cela se vzorkem a referenční cela. Obě cely jsou spojeny termočlánkem a umístěny v adiabatickém obalu. Udržení konstantní teploty se docílí pomocí přídatných topných těles, nebo Peltierovými články. Tyto články se využívají v případě, že je nutné precizní dorovnání teplot. Alikvotní podíly ligandu se do přístroje ITC dávkuje injektorem, který volně přechází do míchadla, které je umístěno v cele se vzorkem [44].

2.2.3.7 FTIR

Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací je analytická metoda pro identifikaci a strukturní charakterizaci anorganických i organických látek. Principem této techniky je absorpce infračerveného záření (0,8-1000 nm) studovaným analytem. Při zmíněné absorpci dochází ke změně rotačně vibračního stavu molekuly – dojde ke změně energie v závislosti na změnách dipólového momentu. Výstupem analýzy je infračervené spektrum, které je závislost energie na vlnové délce dopadeného záření. Energie je zpravidla vyjádřena v procentech transmitance. Lze se setkat i s infračerveným spektrem, kde je energie vyjádřena jako absorbance (což je dekadický logaritmus 1/transmitance). Je možné analyzovat pevné a kapalné vzorky. Pevné vzorky jsou rozpuštěny v běžných rozpouštědlech (CHCl_3) nebo jsou nanášeny na sklíčko v podobě tenkého filmu (rozpouštědlo se předem odpaří). Kapalné vzorky se pipetou převedou do kyvety [65][66].

2.2.3.8 Elektronová mikroskopie

Elektronová mikroskopie je metoda, která se hojně využívá téměř v každém materiálovém a biomedicínském bádání. Pracuje se ve vakuu a zkoumaný analyt je podroben elektronovému svazku elektronů. Ten vzniká emisí elektronů z katody a je urychlen směrem k anodě. Pro dostatečné zvětšení objektu je svazek elektronů fokusován elektrickým, magnetickým nebo elektromagnetickým polem. Výsledkem je obraz interakcí svazku elektronů a studovaného objektu. Dle tvorby obrazu se elektronová mikroskopie dělí na dva typy – transmisní elektronová mikroskopie a skenovací elektronová mikroskopie [21].

2.2.3.9 Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)

V transmisní elektronové mikroskopii pronikají elektrony studovaným analytem. Preparát pozměňuje trajektorii letících elektronů od původního svazku. Odchýlené elektrony jsou clonou pohlceny a ze svazku vyňaty. Výsledný 2D obraz je tvořen neodchýlenými elektrony pomocí zobrazovacího systému (např. stínítka). Dostává se informace o vnitřní struktuře, velikosti a tvaru částic. Podmínkou pro úspěšnou analýzu TEM je, že vzorky musí mít správnou velikost, respektive musí být dostatečně malé (průměr max 3 mm). Zároveň musí být dodržena tenkost vrstvy vzorku (do 0,5 μm). Širší vrstvou elektrony prochází obtížně. Nutno neopomenout na správnou manipulaci se vzorkem – v praxi se využívá podložní síťka. Tyto síťky jsou

vyrobeny procesem elektrogalvanického leptání a jsou například ze zlata, nebo mědi. Měď je patrně nejčastěji využívaný materiál. Často je měděná síťka doplněna uhlíkatou vrstvou pro zmenšení mezírek (zabraňuje nežádoucímu propadávání vzorku) [21] [22] [23].

2.2.3.10 Skenovací elektronová mikroskopie

Skenovací elektronová mikroskopie je ideální pro sledování povrchu zkoumaného objektu. V literatuře se setkáme se zkratkou REM – rastrovací elektronový mikroskop. Je to z toho důvodu, že paprsek elektronů skenuje část plochy na povrchu vzorku. Díky interakci primárních elektronů, které jsou uvolněny z elektronové trysky, a hmoty preparátu dochází k vyražení sekundárních elektronů ze struktury analytu. Sekundární elektrony mají mnohem menší energii oproti primárním elektronům. Tyto elektrony jsou vtahovány na detektor. Detektor je doplněn o zobrazovací systém a tvoří výsledný obraz. Na rastrovém obrazu se zpravidla nachází světlé a tmavší oblasti. To se odvíjí podle toho, jaké elektrony jsou detekovány. Detekují-li se elektrony s velmi malou energií, k detektoru z vyvýšených oblastí se jich dostane více než z oblastí, kde se nachází prohlubeň. Výsledný obraz podává informaci i o změně složení. [24]

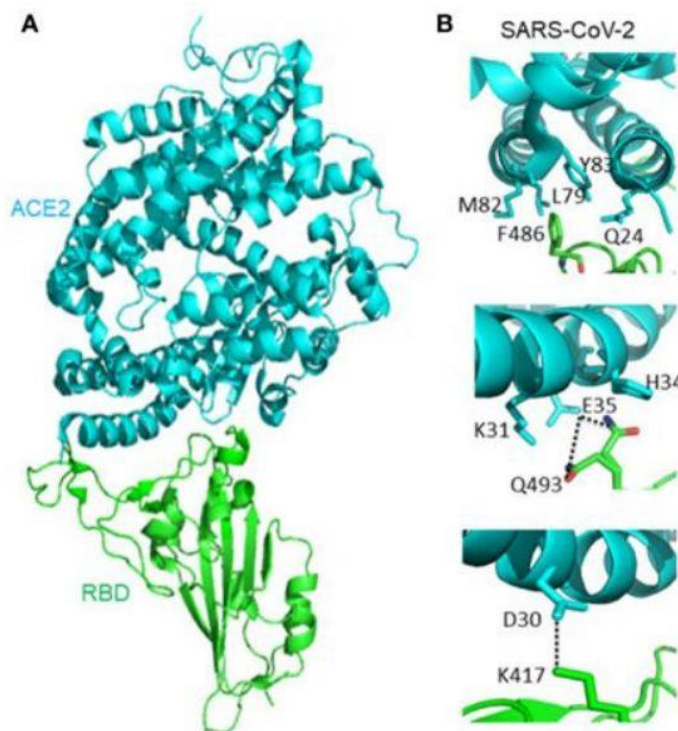
2.3 Modifikace liposomů

Liposomy je možné různě modifikovat podle požadovaného využití a jejich přípravu upravovat dle cílení v organismu. Důležitým faktorem je stavba a propustnost membrány liposomů. Ta se dá modifikovat tak, aby měnila strukturu na základě teplotních změn a okolního pH. Dále je možné modifikovat liposomy pomocí navázání ligandů. Tato práce se zaměřuje na přípravu liposomů, jakožto nosičů pro možnou terapii, pomocí rekombinantních antigenů u virů typu koronavirů.

2.3.1 Rekombinantní receptor vázající doména (RBD – receptor binding domain)

Jedná se o doménu vázající receptor ACE 2. Strukturně je RBD krátký imunogenní fragment viru, který je umístěn na jeho *spike* doméně (glykoprotein). Díky tomu je vir schopen spojit se s receptory somatických buněk, fúzovat a infikovat je. Jedná se tudíž o hlavní cíl v prevenci a terapii virových infekcí. Vazba RBD na *spike* glykoprotein je kritickým krokem, díky kterému se koronaviry váží na cílové receptory ACE2 na povrchu buněk. *Spike* protein je cílem neutralizujících protilátek indukovaných vakcínou, nebo protilátky z dárcovské plasmy uzdravených pacientů, kteří koronavirové onemocnění prodělali. Na obrázku číslo 3

je zobrazena interakce mezi receptorem ACE2 a RBD u viru SARS-CoV-2. Na obrázku A je znázorněna celá interakce – ACE2 (modrý) je zachycen jako měnící se enzym který interaguje s vazebnou částí RBD proteinu (zelený). Na obrázku B jsou zachyceny interakce, které ovlivňují vazebnou afinitu – vodíkový můstek, solný můstek. [67][68][69]



Obrázek číslo 3: Vazebné interakce mezi receptorem ACE2 a RBD doménou. Převzato a upraveno, [67]

2.3.2 Polysacharid Manan

Liposomy, které jsou povrchově modifikované manany, jsou především nástrojem pro cílení a aktivaci dendritických buněk při navození antigen specifické imunitní odpovědi. Jedná se o polysacharid v buněčných stěnách kvasinek. Jeho struktura jsou glykosidickou vazbou spojené jednotky D-manózu. Imunitní systém je manan schopný rozpoznat pomocí receptoru manózový receptor (MR) a lektin vázající manózu (MBL). Manózový receptor dokáže navázat patogeny díky sacharidovým zbytkům na jejich povrchu. Následně jsou patogeny fagocytovány a antigeny jsou prezentovány. MBL je složen z kolagenové a lektinové domény. Imunitní odpověď navazuje pomocí rozpoznání karbohydrátů, které se vyskytují na povrchu některých virů, bakterií a kvasinek. Manan navázaný na liposomy může sloužit jako cílicí a stimulační molekula pro rozpoznání liposomů makrofágy a dendritickými buňkami.[70][71][72][73]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie, přístroje a biologický materiál

3.1.1 Použité chemikálie

Použité chemikálie a komponenty jsou řazeny abecedně, nikoliv podle četnosti používání

- Desprej sensitive (Schulke & Mayr, Německo)
- Destilovaná voda
- EliGene Lab Cleaner A (Elisabeth Pharmacon, Ltd. UK)
- Elisabeth Pharmacon COVID19 Lite RT (Elisabeth Pharmacon, Ltd. UK)
- Ethanol 70 %
- Fyziologický roztok NaCl
- GeneProof SARS-CoV-2 PCR kit (GeneProof a.s., Brno)
- Injekční voda
- Kogene PowerChek SARS-CoV-2 S-gene (Kogene, Korea)
- Lysaminrhodamin
- Metalochelatační lipid s Ni
- Mili Q voda
- Nasofaryngeální stěry (biologický materiál)
- PCR voda
- Vaječný fosfatidylcholin
- Vitassay qPCR SARS-CoV-2 (Vitassay Healthcare, Spain)
- Zybio Mollacu izolační kit (I.T.A.- Interact, ČR)

3.1.2 Biologický materiál

Nasofaryngeálnímu výtěru bylo podrobena 205 pacientů. Vzorkům bylo přiřazeno příslušné číslo a osobní údaje byly anonymizovány. Odběry probíhaly v odběrové místnosti pro testování onemocnění COVID-19. K odběrům byla použita odběrová sada Bi-VoV™, která díky složení připraveného media umožňuje vynechat izolační krok a může být rovnou podrobena PCR reakci. Je tudíž bezpečnější a šetrnější k laboratorním pracovníkům. Výrobce uvádí, že výtěr může být proveden i z dutiny ústní. Toho pro potřeby této práce nebylo využito, kvůli spolehlivé komparaci s druhou použitou odběrovou sadou, kde je možno provádět pouze

nasofaryngeální stěry. Druhý typ použitých odběrových zkumavek byl od firmy BIOLOGIX. Jedná se o klasické transportní medium pro diagnostiku virových částic s nutnou izolací virové RNA před PCR reakcí. Dominantní složkou media je Hankův solný roztok HBSS (pro udržení pH), antibiotikum a biologický pufr. Pro barevnou indikaci je zpravidla přidána fenolová červen. Vzoroky byly uchovávány a skladovány při teplotě $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, aby nedošlo k poškození a znehodnocení biologických agens.

3.1.3 Použité přístroje

- BioRad CFX96 (Bio-Rad, US)
- FT-IR INVENIO S (Bruker, US)
- Multikanálová pipeta 20 μl (Eppendorf, Německo)
- NanoFCM analyzer (Nano FCM, China)
- Nextracor (Genolution, UK)
- Pipetovací stanice Myra (Biovendor LM, ČR)
- Pipety 10 μl až 1500 μl (Eppendorf, Německo)
- Ruční vysokotlaký extrudér (Avanti Polar, US)
- TEM (Phillips 208, FEI, ČR)
- Vortex (P-LAB, CZ)
- Zetasizer Ultra (Malvern Panalytical, UK)

3.1.3.1 Zetasizer Nano

Metoda měření rozptylu světla je popsána v teoretické části práce. V laboratoři byl dostupný Zetasizer Nano, který umožňuje měřit tři charakteristiky částic v kapalném prostředí. Jedná se charakteristiky:

- Velikost částic
- Zeta potenciál
- Molekulární hmotnost

Díky konstrukci analyzátoru je možno měřit vybraný analyt v širokém intervalu koncentrací. Optická část přístroje je výrobcem nastavená, programovatelné jsou pozice pro analýzu velikosti a Zeta potenciálu. To je využitelné zejména při potřebě opakovaného měření. Laser je možné použít červený (632,8 nm) nebo zelený (532nm). Na používaném přístroji v laboratoři NEXARS je nainstalován laser červený. Obecně lze říci, že červené lasery jsou méně vhodné

pro analyty zbarvené do modra a zelené lasery jsou nevhodné pro červené analyty. Úhel rozptylu detektoru je 90 °, což je výhodné právě pro analýzu velikosti částic. V laboratoři NEXARS je laser MALDS, který disponuje úhly detektoru 13 °, 90 ° a 173 °. Samozřejmostí je možnost dodatkových filtrů pro vylepšení signálu pro vzorky, které fluoreskují při vlnové délce užívaného laseru.

Komponenty přístroje Zetasizer Nano:

- Optická jednotka
- Buňka – pro plynulý průchod vzorku přes laserovou dráhu
- Titrátor
- PC se softwarem Zetasizer [47]

3.1.3.2 Nanoanalyzér NanoFCM

Nanoanalyzér je nový přístroj na trhu, který umožňuje komplexní analýzu funkčních nanočástic na úrovni jedné částice. Jedná se o zatím jediný přístroj, který dokáže analyzovat jednotlivé nanočástice s vynikající detekční citlivostí, vysokým rozlišením a stabilním výkonem. Díky flexibilitě použití se předpokládá, že bude v blízké budoucnosti nepostradatelný pro studium nanočástic umělého a přírodního původu.

Jedná se o dvoubarevný analyzátor s dvěma lasery. Laser modrý 488 nm a červený 640 nm. Analyzátor dokáže změřit biologické i syntetické nanočástice, extracelulární vezikuly, viry (vyjma vzdušných patogenů), mitochondrie a nosiče nanočástic. Je schopen pracovat v rozmezí 7–1000 nm. Díky přesné kvantifikaci ultra slabého, elasticky rozptýleného, světla dokáže vyhodnotit distribuci a velikost částic. Oproti běžnému průtokovému cytometru přístroj NanoFCM umožňuje nastavení intenzity signálu a událostí, které si uživatel optimalizuje pro svou potřebu. Jedná se první zařízení, které je schopno pokrýt celý rozsah velikostí extracelulárních vesíklů, a to především díky simultánní fluorescenci jednotlivých extracelulárních vesíklů a bočního rozptylu světelného toku. Analýza je časově nenáročná – přístroj podá první data zhruba 120 s po spuštění měření. Pakliže uživatel vyžaduje analýzu biochemických vlastností, analyzátor NanoFCM dokáže tyto vlastnosti detekovat na základě vícebarevné fluorescenční detekce. Intenzita fluorescence analyzované částice se odvíjí od:

- Počtu navázaných fluoroforů (přímá závislost s účinností vazby během inkubace)
- Účinnosti buzení
- Množství vyzařovaného světla ve spektru detekce (čočka)

Možnosti analýzy NanoFCM:

- biologické nanočástice
- syntetické nanočástice
- extracelulární vezikuly
- virové částice
- mitochondrie
- nosiče nanočástic
- zlaté nanočástice

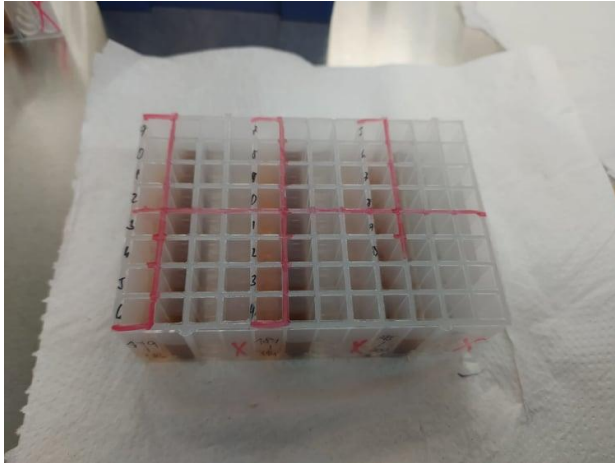
Pro potřeby této práce byl analyzátor NanoFCM použit pro vyhodnocení připravených liposomů. Konstruované liposomy jsou předpokladem pro vývoj nosiče léčiv a léků. [45][46]

3.2 Použité metody

Práce byla členěna do dvou částí – stanovení biologických odběrů na COVID-19 a přípravy modifikovaných liposomálních nosičů pro rekombinovatelné antigeny. Stanovení přítomnosti koronavirů, mutací a experimenty s biologickým materiálem probíhaly na pracovišti IFCOR-KLINICKÉ LABORATOŘE v laboratoři Molekulární diagnostiky. Přípravy liposomů, jejich modifikace a charakterizace probíhala v prvním soukromém výzkumném centru v České republice NEXARS.

3.2.1 Izolace viru

Do připravené cartidge (24 vzorků) bylo pipetováno 200 μ l vzorku. Následně byla cartidge vložena do izolátoru a pomocí magnetické extrakce byla izolována nukleová kyselina. Proces izolace trvá 21 min a jako izolační kontrola byla do poslední pozice vložena PCR free voda o objemu 200 μ l. Po izolaci byla cartidge zalepena folií, aby se předešlo možné kontaminaci.



Obrázek číslo 4A: Pipetovací cartridge pro 24 vzorků, Genolution UK



Obrázek číslo 4B: Izolátor DNA a RNA, Nextextractor Genolution UK

3.2.2 Pipetovací stanice Myra – bezizolační metoda

Do robotického systému bylo vloženo 94 vzorků s bezizolačním médiem do předem definovaných pozic a připravený mastermix pro PCR reakci. Pipetovací stanice do připravených stripů (pozice A1 až H12) pipetovala 5 μ l mastermixové směsi a následně 5 μ l vzorků. Mastermixová směs byla přidána do každé pozice stejná. Každé jamce ve stripu příslušel jeden vzorek. Celkem bylo naplněno 12 stripů po 8 vzorcích. V posledním stripu byla na pozicích G12 a H12 napipetována pouze mastermixová směs a pozice sloužili jako negativní a pozitivní kontroly PCR reakce. Do pozice G12 byla v laminárním PCR boxu přidána *PCR free* voda (negativní kontrola). Strip byl uzavřen, aby se minimalizovalo riziko kontaminace. Posledním krokem bylo přidání pozitivní kontroly, která je dodávána výrobcem PCR kitu, do pozice H12 za vypnutí laminárního proudění v biologickém bezpečnostním boxu. Pakliže probíhal experiment, kde nebylo nutné naplnit všechny pozice, napočítal se reálný počet potřebných jamek a k tomu odpovídající objem připraveného mastermixu.

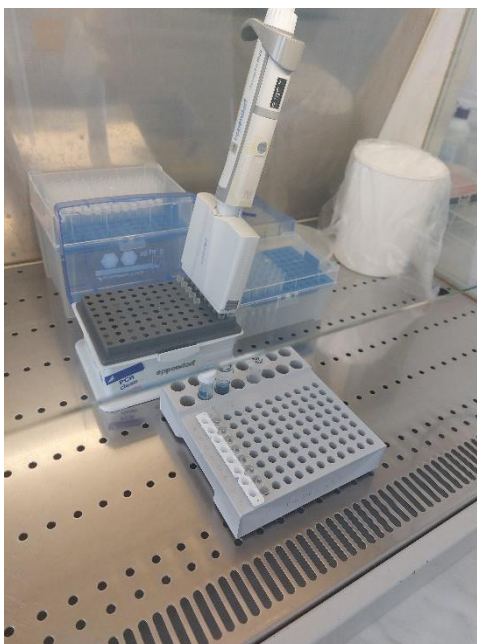


Obrázek číslo 5: Pipetovací stanice Myra s vloženými vzorky a stripy, Biovendor LM ČR

3.2.3 Příprava mastermixové směsi

Mastermixové reagenty (MM) se zpravidla vyrábí jako MM „ready to use“, nebo lyofilizovaný MM. Pro potřeby této práce bylo pracováno s více druhy MM směsí (viz kapitola 4.1.2). Při přípravě MM je zejména nutné zcela přesně dodržet požadované objemy pro úspěšnou amplifikaci. Nejprve je žádoucí reagenty důkladně protřepat a následně vložit do centrifugy. Díky tomu se obsah zkumavky zhomogenizuje a neulpívá na stěnách zkumavky. V případě lyofilizovaného MM bylo nezbytné nejdříve sypkou směs naředit pufrem.

Není-li v práci uvedeno jinak, byl použit poměr 4:1. Na jednu reakci bylo tudíž spotřebováno 4 μl MM a 1 μl enzymu reverzní transkriptázy (RT). Na kompletně zaplněný run bylo vypočteno potřebné množství takto: 384 μl MM a 96 μl enzymu (RT). Díky pipetovací chybě a práci s malými objemy bylo reálně pipetováno 400 μl MM a 100 μl RT. Připravená směs se protřepala a centrifugovala. Takto připravený mastermix se vložil do pipetovací stanice Myra, nebo jím byly manuálně naplněny jednotlivé jamky (v případě izolační techniky). Objem v obou případech byl neměnný – 5 μl . Do takto naplněných stripových jamek bylo následně přidáno 5 μl vzorku. Práce probíhala v laminárním proudícím PCR boxu na chladícím stojánku (především kvůli enzymu RT) s nepudrovými rukavicemi a ochrannou úst a nosu. *Powder free* rukavice jsou pro práci na molekulární úrovni zásadní, neboť pudr inhibuje PCR reakce. Po skončení práce byl biologický box řádně vydesinfikován a vysvícen UV zářením (30 min).



Obrázek číslo 6: Příprava mastermixu pro PCR v laminárním bezpečnostním boxu

3.2.4 PCR reakce

Připravené, protřepané a zcentrifugované stripy byly opatrně vloženy do Bioradu CFX96. V tomto kroku je důležitá zejména manipulace se stripy. V případě že dojde k převrácení stripu, zachytí se malé množství směsi vzorku a MM na víčku a fluorescence tím může být ovlivněna. V připojeném počítači se vybere příslušný program s předem definovaným teplotním profilem. V případě, že není naplněna celá kapacita přístroje (tj. 12stripů respektive 96 vzorků) je doporučeno vložit stripy tak, aby byl přístroj vyvážen. Není to nezbytné, ale prodlouží to životnost analyzátoru (viz. fotografie číslo 7). Časová náročnost celé analýzy je zhruba 90 min. Po skončení je nutné amplifikační křivky správně interpretovat a nechat vychladnout víko přístroje. Použité stripy se vyhodí do infekčního odpadu.



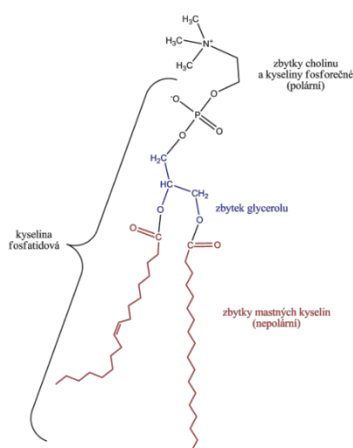
Obrázek číslo 7: PCR s naplněnými reakčními stripy, BioRad CFX96 US

3.3 Příprava liposomů

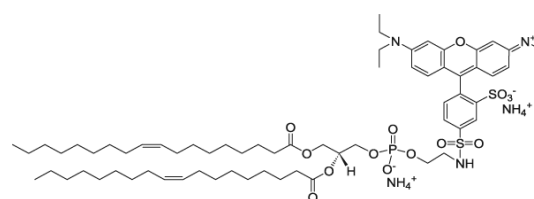
Nejdříve bylo nezbytné připravit liposomy o konkrétní velikosti. Dle zmíněných postupů v teoretické části práce a možností laboratoře byla jako nejvhodnější metoda vybrána vysokotlaká extruze za použití ručního vysokotlakého extrudéru.

Použité lipidy a doplňky:

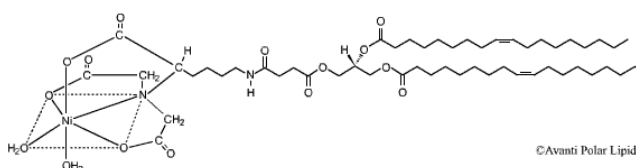
- Vaječný fosfatidylcholin (94 %)
- Metalochelatační lipid s niklem (5 %) 2-DOGS-NTA-Ni
- Lysaminrhodamin (1 %)



Obrázek číslo 8: Fosfatidylcholin



Obrázek číslo 9: Lysamin Rhodamin. Byl použit jako fluorescenční marker – zbarvení do růžova



Obrázek číslo 10: 2-DOGS-NTA-Ni

Do směsi se přidal 70 % ethanol a celá substance se převedla, pomocí fyziologického roztoku, do vodní fáze. Celý objem byl důkladně protřepán na Vortexu.

Počáteční koncentrace byla 10 µg/µl. Pro potřeby analýzy bylo roztok nutné zředit na koncentraci 1 µg/µl. Do skleněné kyvety bylo tudíž přidáno 1800 µl fyziologického roztoku a 200 µl připravených liposomů. Kyveta byla vložena do DLS. V současnosti se DLS používá velmi často k měření právě velikosti liposomů. Difuzní koeficient je počítán z Brownova pohybu částic a velikost částic se spočítá z difuzního koeficientu pomocí Stokes-Einstainovy rovnice. Je známo, že čím větší částice, respektive menší, tím vykazuje pomalejší, respektive rychlejší, Brownův pohyb.

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

Kde $d(H)$ zastupuje hydrodynamický poloměr, k je Boltzmannova konstanta, T odpovídá termodynamické teplotě, η je veličina viskozity a D znázorňuje translační difúzní koeficient. U menších částic se dopadené světlo rozptyluje do všech směrů – jedná se o jev Rayleighův rozptyl. Toto se děje do momentu, kdy velikost částic nepřesahuje vlnovou délku světelného zdroje, tj 250 nm. Obvykle přístroj DLS používá jako zdroj světla laser. Světlo je tudíž monochromatické a koherentní. V čase jsou viditelná různě velká zakolísání intenzity rozptylu světla. To mají na svědomí malé částice konající Brownův pohyb. Rozptýlené světlo následně podléhá destruktivním nebo nedestruktivním interferencím obklopujících částic. Z toho lze vyčíst informaci o pohybu rozptylů v čase.

Liposomy byly extrudovány přes ruční extrudér. Požadovaná velikost výsledných liposomů byla 100, 200 a 400 μm . Toho bylo docíleno pomocí membránových filtrů, přes které byly liposomy protlačovány. Při technice je nutné dodržet správný postup připevnění příslušného membránového filtru. S filtrem by mělo být sterilně manipulováno a kritickým bodem celého procesu je sesunutí filtru k jedné straně extrudéru. V tom případě se vytvoří nežádoucí prostor, přes který se protlačované liposomy dostanou bez úpravy své velikosti. Liposomy musí být protlačovány několikrát, k docílení požadované velikosti. Celkový počet průchodů přes membránový filtr je vždy lichý (konečný produkt je odebrán z druhé strany, než byl do extrudéru vložen). Při přípravě se vždy začíná od největších až po nejmenší požadované.

3.3.1 Navázání antigenu + DLS

Navázání antigenu na připravené liposomy proběhlo dle následujícího výpočtu:

94 % EPL (nosný lipid) $M_r = 760$

5 % NGSNi $M_r = 1057$

1 % Rho $M_r = 1301$

Protein $M_r = 26\,750$

Polovina metalochelatačního lipidu s Ni^{+2} je uvnitř struktury, nelze ji tudíž použít pro vazbu. Pro úspěšné navázání antigenu je nutné pracovat v poměru 3:1. Což odpovídá 1 molu proteinu na 3 moly, respektive 6 molům metalochelatačního lipidu. Výsledkem je tudíž 6342 Da.

$$1 \text{ protein} \sim 3\text{Ni} (6\text{Ni})$$

$$1 * 26750 \sim 6 * 1057$$

$$714,4 + 5,285 + 10,301 = 729,986 \sim 730$$

Jaké skutečné množství lipidu bylo použito shrnuje následující tabulka číslo 5:

Tabulka číslo 5: Vypočítané množství potřebných objemů

Zkumavka	Obsah	Složky		
		Liposomy [μl]	PBS [μl]	RBD [μl]
1	Prázdné liposomy	175	108	0
2	Proteoliposomy	175	0	108
3	Protein RBD	0	44	22

Hodnoty byly vypočteny na základě přímé úměry. Na 0,6 μg proteinu RBD je spotřebováno 2,1 μg lipidu. Na 0,5 μg proteinu RBD je tudíž potřeba 1,75 μg lipidu. Při dodržení požadované koncentrace 10 μg v 1000 μl bylo vypočteno potřebné množství 175 μl lipidu. Objem fosfátového pufru, který sloužil jako rozpouštědlo, byl vypočten také přímou úměrou.

$$130 * \frac{0,5}{0,6} = 108,3 \mu\text{l}$$

Celkový objem zkumavky číslo 1 byl 238 μl . 175 μl lipidová složka a 108 μl roztoku PBS. Zkumavka číslo 2 měla stejný celkový objem a skládala se z 175 μl lipidu a 108 μl proteinu RBD. Zkumavka číslo tři obsahovala zbytek nepoužitého proteinu PBS, tj. 22 μl a 44 μl fosfátového pufru. Bylo vyzkoušeno proměření zkumavky číslo 2 i v 10x menší koncentraci pro lepší zobrazení v metodě DLS. Pro tyto potřeby bylo použito 100 μl lipidu s navázaným RBD a 900 μl fyziologického roztoku. Substance byla převedena do měřicí kyvety v příslušném objemu.



Obrázek číslo 11: přístroj Zetasizer, metoda DLS, laboratoř NEXARS

3.3.2 Analýza Nano FCM postup práce

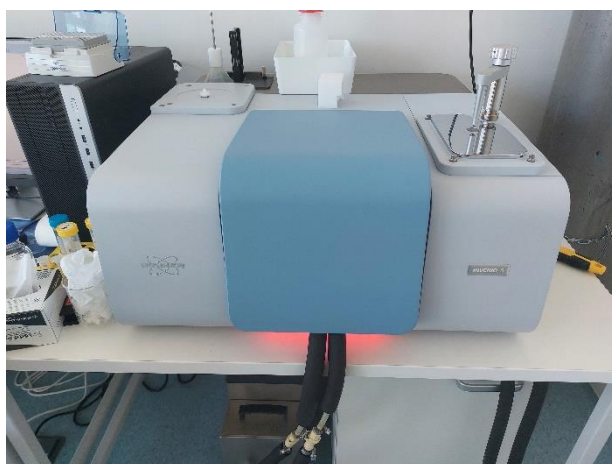
Nejprve bylo nutné přístroj řádně promýt a zkalibrovat. Jedná se o velmi citlivou analýzu, takže tento krok byl opakován při každém měření. Po nastavení správného tlaku, počtu událostí a intenzity signálu byla sestavena kalibrační křivka. K tomu sloužil výrobcem dodávaný velikostní standard *Silica Nanosphere Cocktail (SI6M-Exo)* a roztok *QC beads*. K promývání byla vždy použita voda o čistotě Milli Q. Vzorek byl naředěn na koncentraci částic $1 \times 10^8/\text{ml}$ (pro optimální záchyt událostí). Poté byl převeden do originální vialky a byla spuštěna analýza s automatickým dávkováním. Doba měření je zhruba 45 min (včetně přípravy přístroje). Měření proběhlo pro samostatné liposomy (200 μm), RBD protein a pro navázaný antigen na liposomech. Postup práce byl u každého analytu stejný. Po ukončení práce je nezbytné analyzátor Nano FC řádně propláchnout a vyčistit. K dostatečnému propláchnutí výrobce dodává *Cleaning solution R*, který je v druhém promývacím kroku nahrazen vodou.



Obrázek číslo 12: Přístroj Nano FCM, laboratoř NEXARS

3.3.3 Technika FT-IR postup práce

Po zajištění požadovaného tlaku a kalibraci přístroje byly připravené liposomy kapátkem naneseny do jamky na krystalu. Spektrometr umožňuje měřit téměř všechny struktury a velikosti analytu. Nebylo nutné dodržet přesný objem. V připojeném počítači byly vyplněny vstupní údaje a spektrometr byl spuštěn. Měření bylo několikrát opakováno a kritickým faktorem bylo udržování konstantního tlaku. Pozadí měření bylo dvou typů. Po ukončení práce se hrot krystalu opláchl ethanolem a následně dočistil destilovanou vodou.



Obrázek číslo 13: Analyzátor FT-IR, laboratoř Nexars

3.3.4 Fotografie na elektronovém mikroskopu SEM

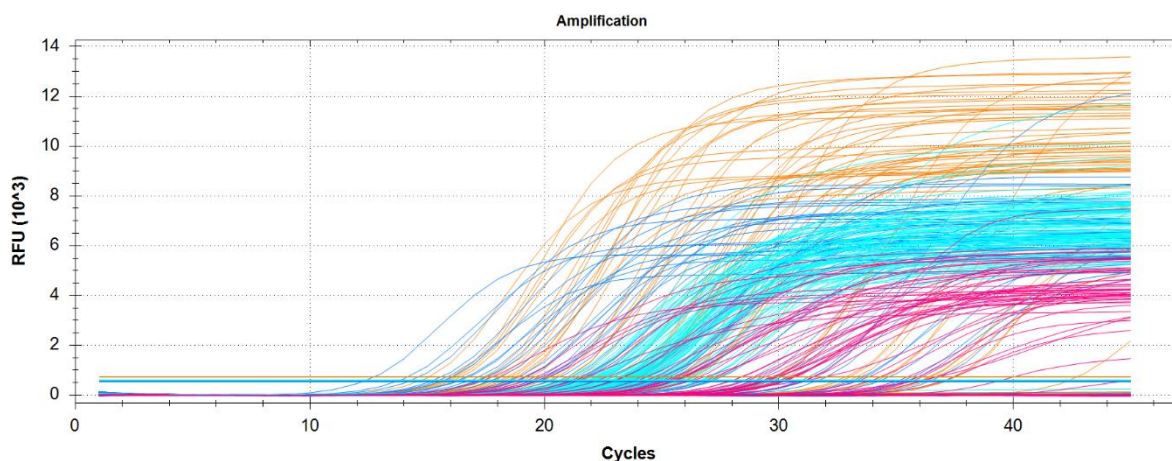
Připravené liposomy byly nejprve extrudovány na požadovanou velikost (100 μm). Analyt byl zředěn v poměru 1:9-100 μl liposomů a 900 μl fyziologického roztoku. Následně byly vytvořeny dvě ependorfky (1 a 2). V ependorfce 1 bylo 70 μl liposomů a 57 μl RBD proteinu. V ependorfce 2 bylo 57 μl fyziologického roztoku. Tato ependorfka sloužila jako negativní kontrola pro správnou interpretaci získaných dat.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Diagnostika viru SARS-CoV-2

Pomocí kvantitativní metody RT-PCR bylo stanoveno 94 vzorků na přítomnost virové RNA v odebraném biologickém vzorku. Všechny použité vzorky jsou nasofaryngeální stěry, a to z toho důvodu, že dojde k nejkonzentrovanejšímu odběru virové RNA. Při výtěrech z dutiny ústní (případně molárů v dutině ústní) je důležité dbát na čistotu dutiny ústní a před odběrem je nutné nejíst, nekouřit a nepít alespoň 2 hodiny. Je mnoho běžných potravin, které inhibují PCR (např. rýže) a nedojde k požadované amplifikaci interní kontroly. Výsledek testu je tudíž neplatný a stěr se musí opakovat.

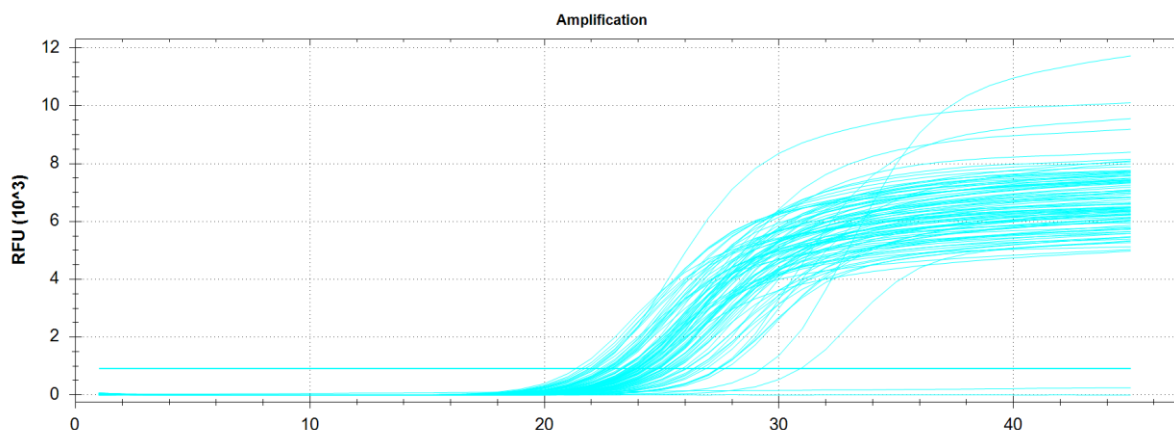
Na obrázku číslo 14 jsou zobrazeny všechny amplifikační křivky ve všech měřených fluorescenčních kanálech. Bylo proměřeno 94 vzorků a 2 kontroly reakce – pozitivní kontrola a negativní kontrola. Negativní kontrola slouží jako kontrola izolace a zároveň kontrola PCR reakce. C_t hodnota (*cycle of treshold*) reflektuje cyklus, kdy dochází k nárůstu fluorescence nad linii pozadí. Tuto zvýšenou fluorescenci zpracuje detektor a vypočítá přesnou hodnotu C_t . Obecně platí, že čím větší virová nálož v měřeném izolátu, tím nižší je hodnota C_t . Křivky, které mají kratší exponenciální fázi křivky vzorků, které vykazují vysokou pozitivitu na vir COVID-19. Lze předpokládat, že pacient se nachází v infekční části nemoci a vir pronikl do imunitního systému organismu. Ideální je provést odběry v určitém časovém odstupu a opakovat vyšetření. Díky tomu lze zřetelně vidět vývoj virové nálože v organismu pacienta. Tabulka číslo 6 doplňuje tabulku číslo 2. Při správné interpretaci naměřených dat je nutné zohlednit doporučení hraničního C_t cyklu od výrobce. Případně je nutné zohlednit změny v teplotním profilu, či pozměnění reakčních objemů. Nicméně téměř vždy se určení positivity odvíjí od $C_t = 35$.



Obrázek číslo 14: Amplifikační křivky, všechny fluorescenční kanály

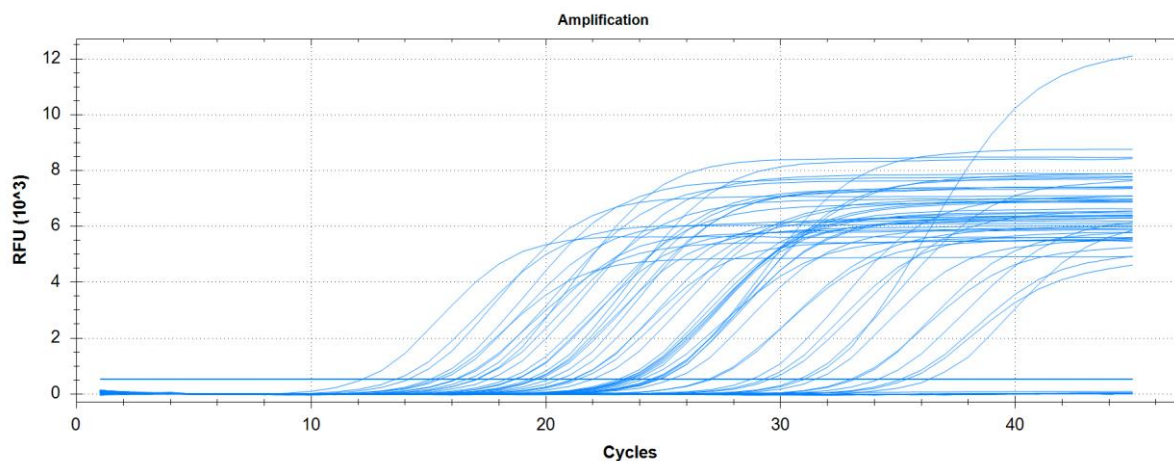
Tabulka číslo 6: Interpretace amplifikačních křivek v jednotlivých fluorescenčních kanálech

FAM	Cy5	HEX	Výsledek	Interpretace
RdRp/E	gen N	IC		
+	+	+/-	validní	SARS-CoV-2 pozitivní
-	+	+/-	validní	SARS-CoV-2 pozitivní
+	-	+/-	validní	SARS-CoV-2 negativní
-	-	+	validní	SARS-CoV-2 negativní
-	-	-	nevalidní	Nespolehlivý výsledek: nízký výtěžek izolace RNA nebo inhibice RT-PCR, zpravidla doporučeno zopakovat izolaci
Ct>35	-	-	nespolehlivý	Slabě COVID-19 pozitivní: nízký výtěžek izolace RNA nebo inhibice RT-PCR, doporučeno zopakovat izolaci RNA (opakovaně pozitivní signál alespoň v jednom kanálu je považován za pozitivní výsledek).
-	+	Ct>35	validní	Slabě COVID-19 pozitivní: doporučeno zopakovat RT-PCR (opakovaně pozitivní signál alespoň v jednom kanálu je Ct > 35 považován za pozitivní výsledek).
Ct < 35	+/-	-	nespolehlivý	Nespolehlivý výsledek: může ukazovat kontaminaci produktem amplifikace nebo mutaci v jednom z genů, doporučeno zopakovat izolaci RNA, doporučeno zopakovat analýzu s RT-PCR soupravou, která detekuje jiné geny
-	Ct < 35	+/-		



Obrázek číslo 15: Fluorescenční kanál VIC – interní kontrola

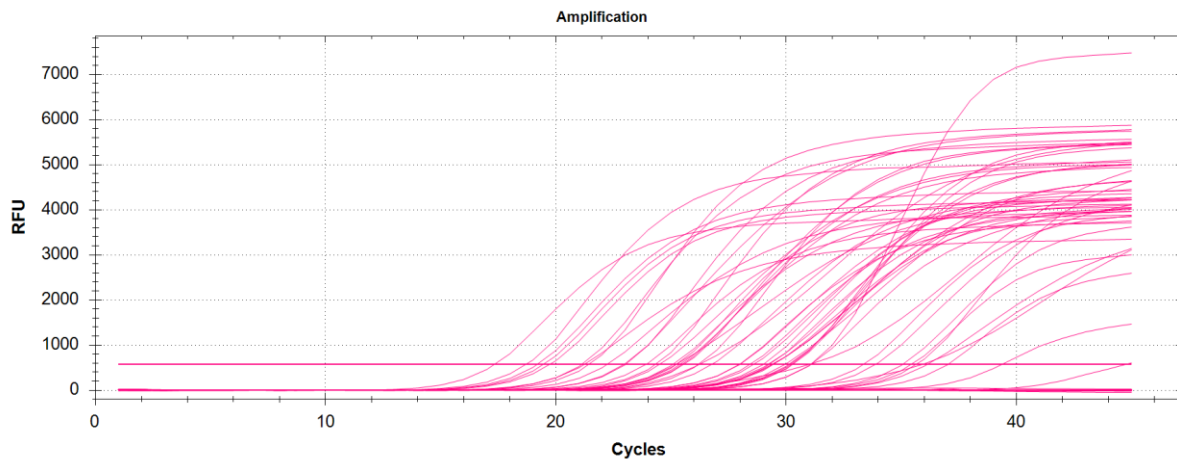
Na obrázku číslo 15 jsou amplifikační křivky fluorescenčního kanálu VIC. Tento kanál zobrazuje amplifikaci interní kontroly, kterou je při kvantifikaci nezbytné vyhodnotit. Znamená to, že z 94 měřených vzorků nedošlo k amplifikaci pouze u 2 z nich. Jejich amplifikační křivka takřka kopíruje linii grafu osy x. Není nalezen průsečík s křivkou tresholdu, tudíž došlo k inhibici PCR reakci. Tento jev může být způsoben nedostatečným odběrem (na odebírací špičce došlo k malému záchytu lidské DNA, respektive virové RNA) nebo nekvalitou nosného media, nedostatečnou izolací, špatným napipetováním mastermixové směsi nebo vystavení vzorku náročným životním podmínkám. Výsledek může být zkreslený i díky přítomnosti inhibitorů PCR. Obecně platí, že práci s RNA je nutné vzorek uchovávat v chladném stojánku, lednici nebo ho zmrazit.



Obrázek číslo 16: Fluorescenční kanál FAM

Na obrázku číslo 16 je zobrazen fluorescenční kanál FAM. Tento kanál dává informaci o přítomnosti genu EndoRNaz. Jedná se o přímou detekci a naměřená hodnota Ct je stěžejní pro

kvalitativní stanovení viru. Zjednodušeně lze říci, že pozitivní výsledek tzv. E-genu dává informaci o přítomnosti virové RNA v diskutovaném vzorku.

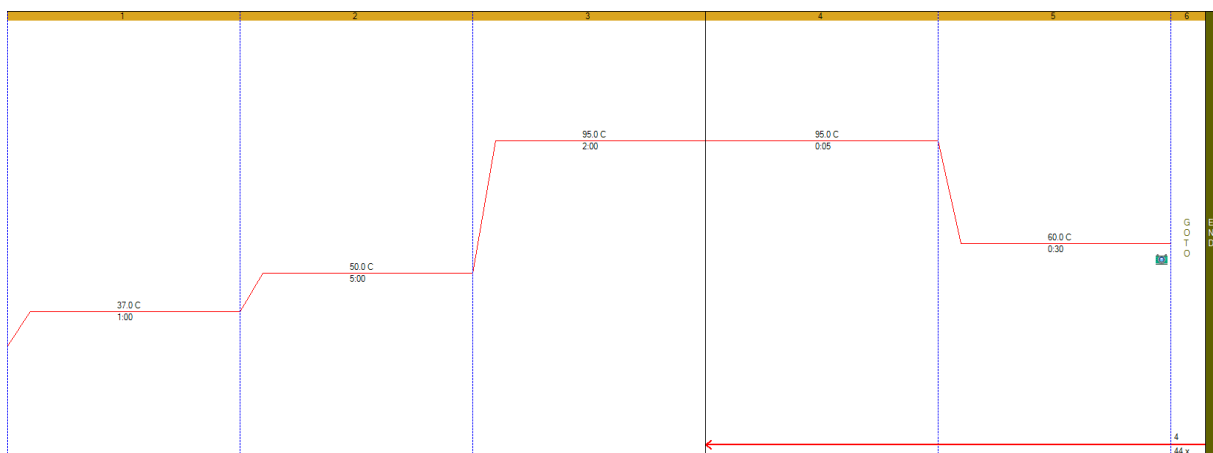


Obrázek číslo 17: Fluorescenční kanál Cy5

Třetí fluorescenční kanál byl použit Cy5. V tomto kanálu je sledována zvýšená fluorescence virového genu *Spike*. Tento glykoprotein virus využívá k proniknutí do hostitelské buňky. Součástí imunitní odpovědi je vytvoření protilátek právě proti *spike proteinu*. Buňky následně tuto interakci blokují.

Celý run experimentálního měření byl puštěn na přístroji Biorad CFX96. Teplotní profil, při kterém probíhala amplifikace je zobrazen na obrázku číslo 18.

Lze konstatovat, že z experimentálního měření bylo použito 94 vzorků biologického materiálu, 1 negativní kontrola a 1 pozitivní kontrola. Je zřejmé, že pozitivitu na COVID-19 vykazuje 57 vzorků. Dvě biologické agens inhibovaly a 35 vzorků je na virus SARS-CoV-2 negativní.



Obrázek číslo 18: Teplotní profil PCR analýzy experimentu

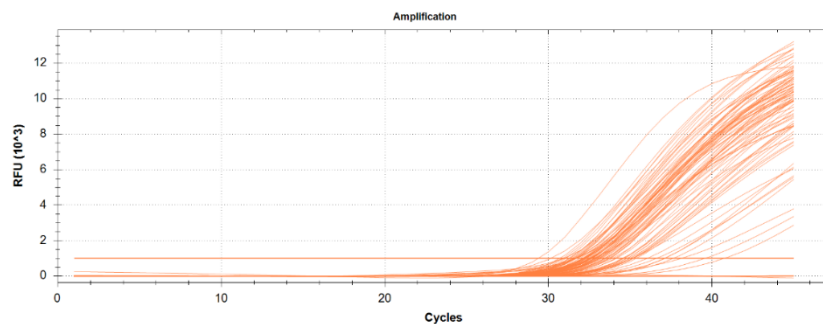
4.1.1 Diagnostika SARS-CoV-2 na různých komerčních kitech

Pro komparaci a ověření funkčnosti jednotlivých kitů bylo použito 94 náhodných vzorků, které byly podrobeny RT-PCR metodě na různých typech reagensů od různých výrobců. Testování proběhlo za stejných podmínek, vzorky byly odebrány současně a skladovány byly za stejných podmínek. V tabulce číslo 7 je shrnutí testovaných kitů.

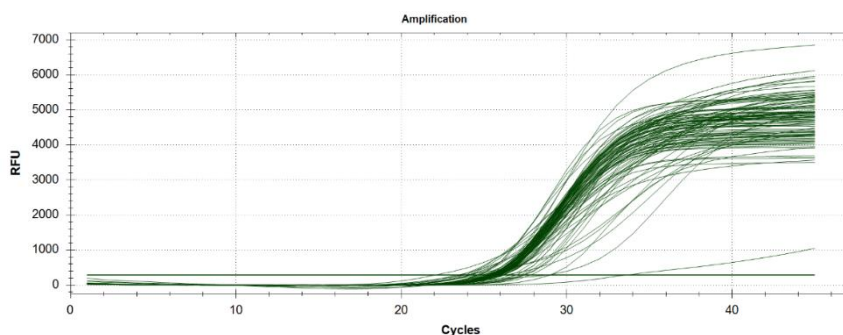
Tabulka číslo 7: Přehled používaných mastermixových směsí

Výrobce	MasterMix	Detekce	Odběr	Počet fl. sond
A	Ready-to-use	Kvalitativní	nosohltan, sputum, stolice, br. laváž	2
B	Ready-to-use	Kvalitativní	Nosohltan, sliny, ústa, plasma, sputum, sérum	4
C	lyofylizovaný	Kvalitativní	Nosohltan, sliny, ústa, plasma, sputum, sérum	3
D	Ready-to-use, dvousložkový	Kvalitativní	Ústa, nosohltan	3

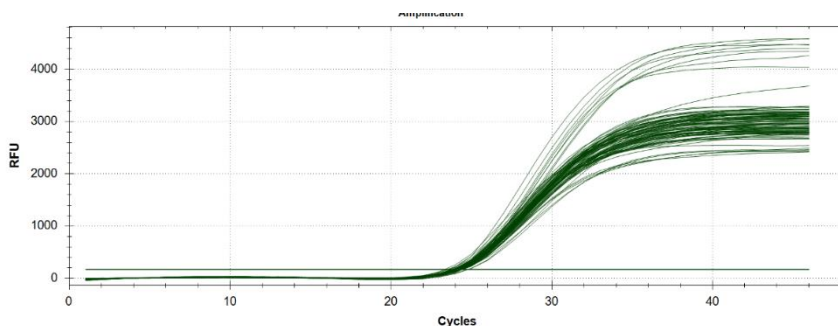
Naměřená a vyhodnocená data jsou v následujících grafech. Je zřetelné, že amplifikace v kanálu interní kontroly se takřka shoduje. U výrobce C je amplifikace nejvýraznější. Křivky mají téměř podobný tvar – obdobná doba exponenciální i lineární fáze. Ve fázi *plateau* jsou téměř konstantní a vykazují esovitý tvar. U výrobce B a D jsou viditelné různé odchylky. Některé vzorky amplifikovaly později, než u chemie typu C. Průsečík s linií tresholdu ale existuje a lze říci, že amplifikace byla úspěšná a vzorky nevykazují inhibici PCR reakce. U výrobce typu D je situace odlišná. Jsou viditelné dva vzorky, u kterých amplifikace vůbec neproběhla. To může být zapříčiněno špatným napipetováním, nebo nedostatečným zvortexováním PCR stripu. Vypovídající efekt může mít i nedostatečná stabilita master mixu. Složka, která je nejvíce náchylná na teplotní změny a nedokonalé skladování je enzym reverzní transkriptáza. Jev lze odůvodnit i užitím levnějšího postupu výroby, kde není zachována např. požadovaná provozní teplota. Nutno dodat, že interní kontroly u vybraných kitů nebyly totožné. Díky tomu mohou být výsledky odlišné.



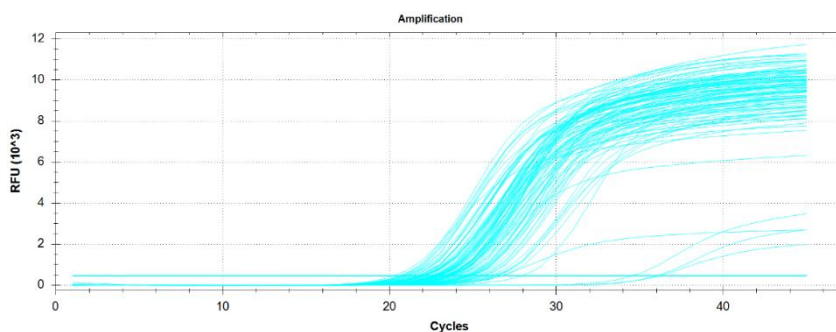
Obrázek číslo 20: Amplifikační křivka interní kontroly při stanovování stejných analytů na různých komerčních kitech, výrobce A



Obrázek číslo 21: Amplifikační křivka interní kontroly při stanovování stejných analytů na různých komerčních kitech, výrobce B



Obrázek číslo 22: Amplifikační křivka interní kontroly při stanovování stejných analytů na různých komerčních kitech, výrobce C



Obrázek číslo 23: Amplifikační křivka interní kontroly při stanovování stejných analytů na různých komerčních kitech, výrobce D

U stanovení pozitivitu jsou viditelné různé nepřesnosti. Každý výrobce uvádí lehce odlišnou rozhodující hodnotu C_t , při které je vzorek klasifikován jako COVID -19 pozitivní. Z 94 testovaných vzorků bylo u všech typů chemie určeno 43 jako pozitivních na výskyt viru SARS-CoV-2. U 12 vzorků bylo vyhodnoceno, že se jedná o slabou pozitivitu na virus SARS-CoV-2 – zvýšenou fluorescenci nezachytily všechny sondy, ale jejich většina. 2 vzorky se na chemii typu C jeví jako negativní, nicméně na reagentech od výrobců A, B i D pozitivitu vykazaly. Odlišnost byla viditelná i v amplifikaci pozitivní kontroly. Každý výrobce dodává svou vlastní. U chemie typu A a D amplifikační křivka protнула linii tresholdu do 25. cyklu. U chemie typu B se jednalo o cyklus 29. U chemie typu C se pozitivní kontrola naamplifikovala až v cyklu 35, což je, dle návodu dodaném výrobcem, hraniční cyklus pro určení pozitivitu.

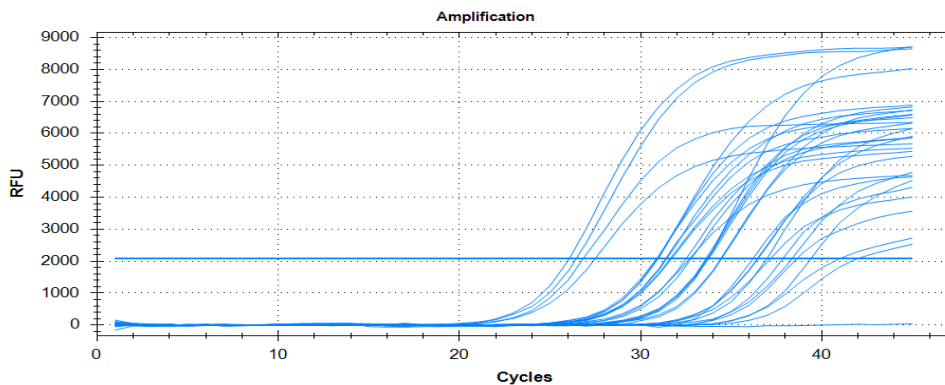
Z výše zmíněného lze usuzovat, že téměř totožné výsledky byly naměřeny u chemie typu A a D. Byla zjištěna korelace i s chemií typu B, pouze s výjimkou pozdější amplifikace pozitivní kontroly. V testování nejhůře dopadla chemie typu C, která vykazovala falešnou negativitu a run by bylo obtížné hodnotit, především díky pozdnímu amplifikování pozitivní kontroly. Všechny čtyři programy mají téměř totožný teplotní profil v PCR přístroji a doba trvání jednotlivých programů se liší v rámci minut.

4.1.2 Experimenty s biologickými stěry

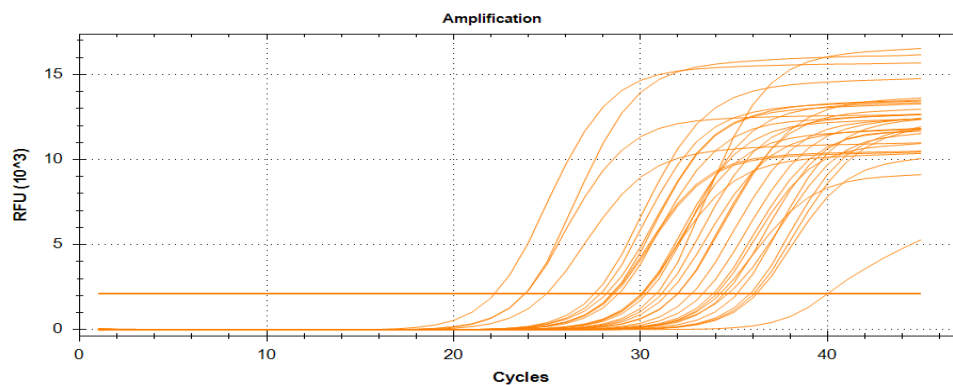
Správný a dostatečný odběr je zcela zásadní pro úspěšnou diagnostiku viru. Pakliže nedojde k dostatečnému zachycení interní kontroly v PCR reakci není dostatek materiálu k amplifikaci a vzorek vykáže inhibici PCR reakce. Nyní jsou na trhu dostupné i testovací sady, které jednu fluorescenční sondu namíří na detekci lidské DNA. Bylo vybráno 8 vzorků které předem byly stanoveny jako COVID-19 pozitivní. Tyto vzorky byly podrobeny několika dílčím zkouškám a následně byla pozorována změna chování amplifikačních křivek.

Dílčí experimenty byly provedeny čtyři.

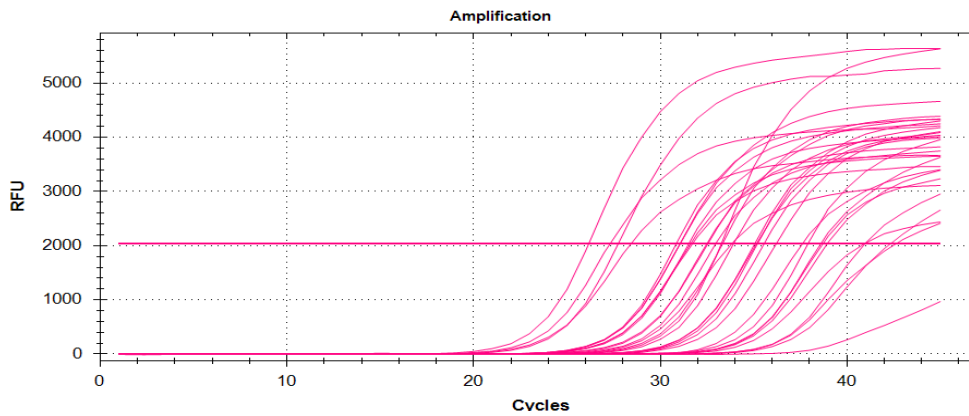
- *Strip A*-byl naplněn vzorky, které nebyly předem řádně protřepané
- *Strip B*-vzorky 3 min protřepané na systému Vortex
- *Strip C*-vzorky povařené (5 min, 90 °C)
- *Strip D*-povařené vzorky (*strip C*) byly zmrazeny (30 min, -70 °C)



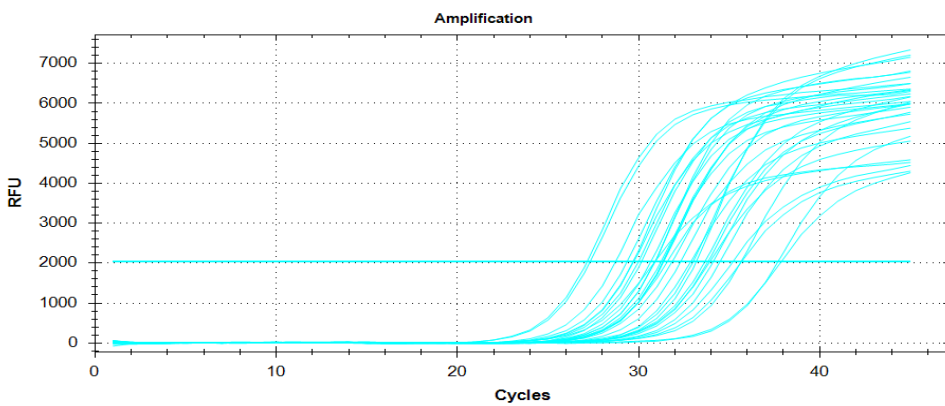
Obrázek číslo 24: Amplifikační křivky kanálu FAM, všechny analyty



Obrázek číslo 25: Amplifikační křivky kanálu ROX, všechny analyty

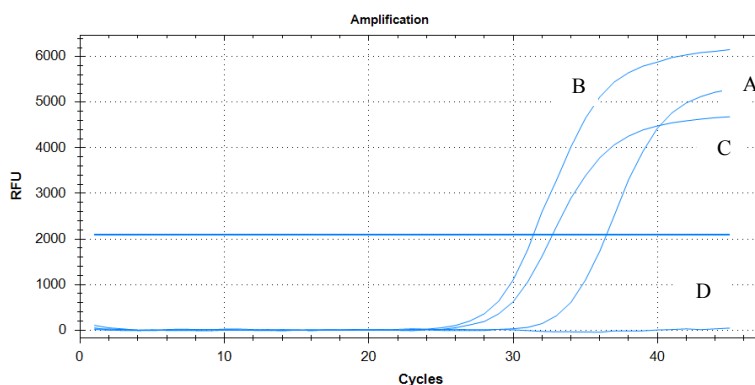


Obrázek číslo 26: Amplifikační křivky kanálu Cy5, všechny analyty

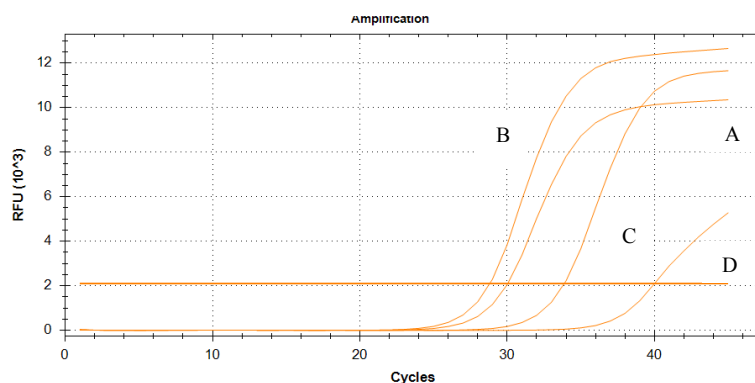


Obrázek číslo 27: Amplifikační křivky interní kontroly kanálu HEX, všechny analyty

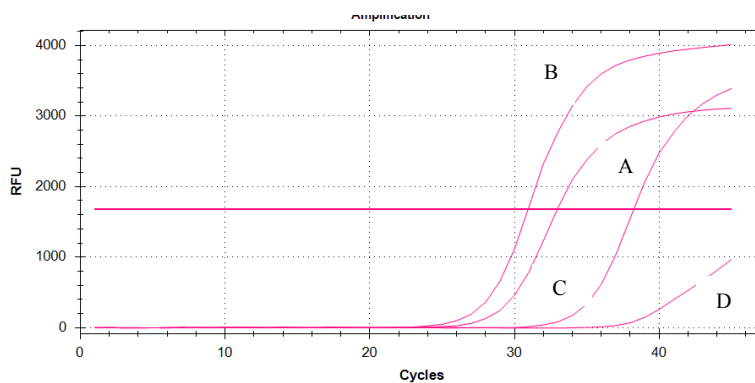
Z obrázků číslo 24-27 jsou všechny experimentální vzorky v jednotlivých kanálech – FAM, HEX, Cy5 a ROX. Byly testovány 4 stripy s 8 vzorky. Každý strip byl naplněn mastermixovou směsí a vzorkem za dodržení příslušné pozice. V grafu je tudíž 32 křivek, které odpovídají osmi vzorkům v pěti různých dílčích zkouškách. Z naměřených dat vyplývá, že v dominantním kanálu FAM (E gen) jsou posunuté Ct hodnoty. To podává informaci o tom, že virová částice byla narušena a její amplifikace proběhla později. Stejný trend vykazují i kanály ROX a Cy5. Interní kontrola (kanál HEX) se amplifikovala u všech vzorků. Na následujících grafech (číslo 28-30) je zobrazen pouze jeden vzorek a jeho amplifikační křivka pro všechny experimenty s biologickým odběrem.



Obrázek číslo 28: Amplifikační křivky kanálu FAM, vzorek číslo 2 ve všech dílčích experimentech



Obrázek číslo 29: Amplifikační křivky kanálu ROX, vzorek číslo 2 ve všech dílčích experimentech



Obrázek číslo 30: Amplifikační křivky kanálu Cy5, vzorek číslo 2 ve všech dílčích experimentech

Jak je ukázáno na grafech na přechozí stránce, je patrný trend, který vykazují všechny testované vzorky. Ideální varianta je řádně protřepat biologický materiál a nevystavovat ho velkým teplotním změnám. Posuny amplifikačních křivek jsou velmi výrazné. U experimentu povařit/zmrazit se dokonce amplifikovalo tak malé množství virové RNA, že amplifikační křivka neprotne linii tresholdu a byl by hodnocen jako vzorek negativní na přítomnost SARS-CoV-2. Jak uvádí tabulka číslo 8. Získané hodnoty Ct odpovídají popsanému trendu.

Tabulka číslo 8: Změna Ct hodnoty u vzorku číslo 4 v jednotlivých experimentech

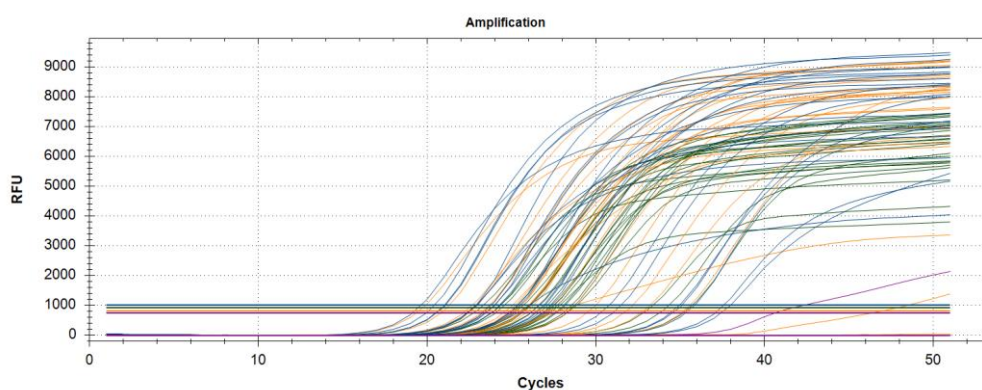
Typ experimentu	Ct
2 - nevortex	29,41
2 - vortex	28,38
2 - povařené	33,51
2 - zmražené	N/A

4.1.3 Určení typu mutace

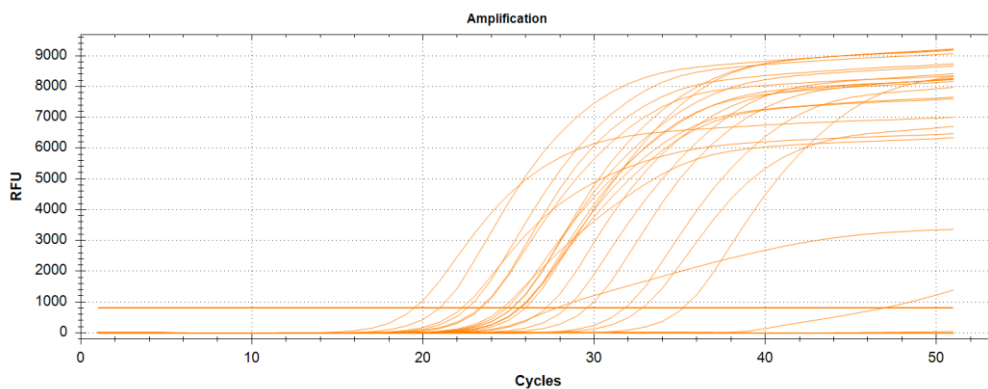
Na experimentální měření pro určení mutační varianty koronavirů bylo použito 29 vzorků. Tyto vzorky byly předem klasifikovány jako COVID-19 pozitivní. Cíl práce byl stanoven na určení varianty Delta, varianty Omikron nebo *wild type (WT)*. Ke vzorkům byly přidány pozitivní kontroly od každého očekávaného výsledku. Díky preanalytické fázi práce nebylo očekáváno, že by některý z testovaných vzorků vykázal negativní hodnotu. Na souhrnném grafu amplifikačních křivek jsou čtyři barvy:

- Žlutá – varianta Omikron *B.1.1.529* (kanál ROX)
- Zelená – interní kontrola (kanál HEX)
- Fialová – varianta Delta *B.1.617.2* (kanál Cy5)
- Modrá – WT (kanál FAM)

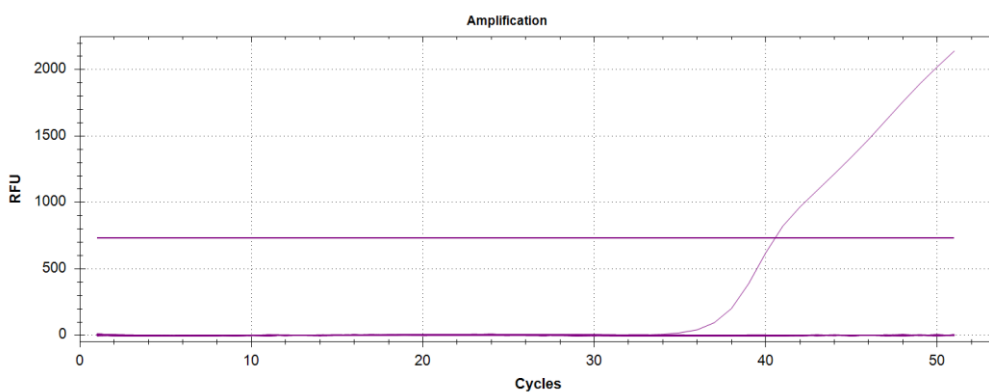
Je patrné, že varianta mutace Omikron zcela převládá. Tato varianta mutace byla zjištěna u 20 testovaných vzorků (viz obrázek číslo 32). Oproti tomu je zřejmé, že varianta Delta je, v době provedené analýzy na ústupu. Na variantu Deltu vykázal pozitivitu pouze jeden z testovaných vzorků (obrázek číslo 33). Naměřené výsledky zcela korelují s epidemiologickou situací v době konání experimentu. Na podzim roku 2021 byla drtivá většina testovaných vzorků pozitivní na mutaci typu Delta. Tato varianta se jevila jako velmi agresivní a lehce přenositelná. Nástup Omikronu do ČR přišel v polovině měsíce ledna 2022. Během jednoho týdne se začal velmi rychle měnit procentuální podíl zastoupených mutací. Začalo i ubývat vzorků, které vykazovaly pozitivitu na koronavirus, nicméně v testovacím kitu, který je schopen odlišit variantu *B.1.617.2* a *B.1.1.529* byly naměřeny jako WT – bez mutace (viz obrázek číslo 34). Omikron, který díky svým vlastnostem, začal v populaci naprosto dominovat, vytěsnil ostatní varianty. Mezi jeho specifika patří i vyšší míra reinfekcí, která byla do té doby méně častá.



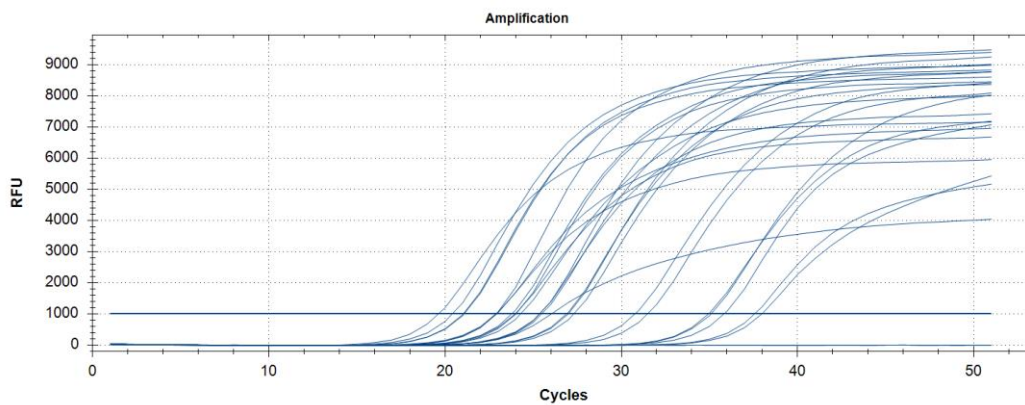
Obrázek číslo 31: Amplifikační křivky kanálu FAM, ROX, HEX a Cy5 při stanovování konkrétního typu mutace



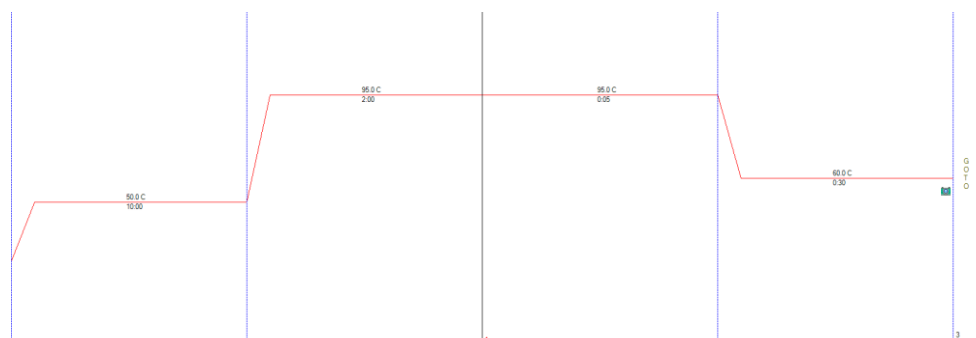
Obrázek číslo 32: Amplifikační křivky kanálu ROX, detekce mutace B.1.1.529 (Omikron)



Obrázek číslo 33: Amplifikační křivky kanálu Cy5, detekce mutace B 1.617.2 (Delta)



Obrázek číslo 34: Amplifikační křivky kanálu FAM, nedetekována žádná mutace. Nález označen za WT



Obrázek číslo 35: Teplotní profil PCR analýzy při určování konkrétního typu mutace viru SARS-CoV-2

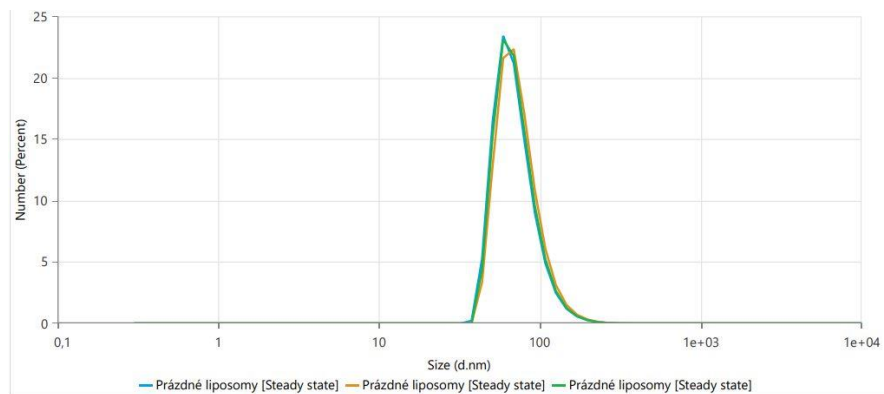
4.1.4 Výsledky měření metodou DLS

Metoda DLS byla měřena na přístroji Zetasiser Nano ve výzkumné laboratoři NEXARS. Tuto metodu je vhodnější použít pro menší velikosti měřených objektů (ideálně pod 20% vlnové délky). Obecně k naměřeným datům lze říci, že pakliže u struktury liposomů s navázaným antigenem není korelogram plně esovitý, antigen patrně není zcela navázán, nebo může být agregovaný. Stejně substance byly proměřeny i na přístroji Nanoanalyzer Nano FCM pro komparaci získaných dat. Experimentální měření proběhlo pro samostatné liposomy, které byly extrudované přes 100 µm filtr. Velikost prázdných liposomů je očekávána 100 µm. Dále byly proměřeny ty samé liposomy s navázaným RBD proteinem – substance se nechala řádně navázat a byla proměřena za 24 h. Metodou DLS se liposomy s navázaným antigenem jeví větší, což znamená úspěšné navázání proteinu RBD metalochelatační vazbou. V případě, že by navázané liposomy vykazovaly menší velikost, mohlo by to být způsobeno lomem spektra, existence zadního i předního laseru (180 °), což vychází z Einsteinovy rovnice.

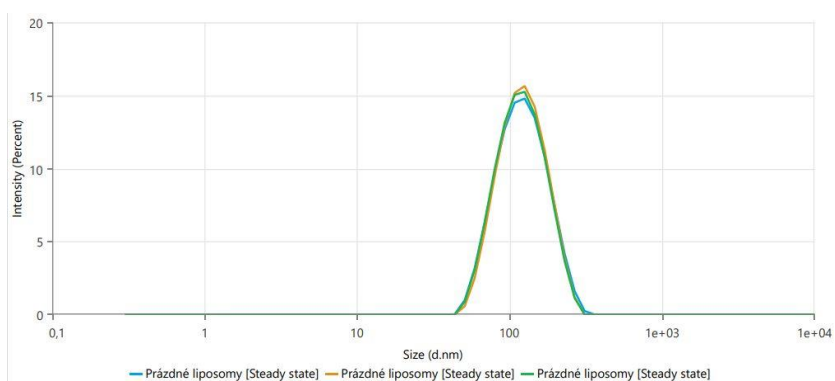
Výstupem měření jsou závislosti konkrétního parametru na velikosti. Samostatným liposomům byla naměřena průměrná velikost 108,3 nm. Největšímu liposomu, který se v analytu nacházel byla naměřena velikost 108,6 nm. Nejmenší naměřená velikost byla 107,9 nm. Dále byla změřena intenzita, počet a objem. Hodnoty jsou shrnuty v tabulce číslo 9. U liposomů s RBD byla zjištěna průměrná velikost 137,1 nm. Maximální velikost molekuly byla stanovena na 137,7 nm a nejmenší 136,6 nm. Opět byly stanoveny i ostatní veličiny (intenzita, celkový počet částic, objem) a jsou taktéž v tabulce číslo 9. Srovnání obou velikostí je uvedeno v obrázku číslo 42.

Tabulka číslo 9: Naměřené hodnoty Zeta potenciálu, objemu, velikosti, intenzity a hodnota PDI

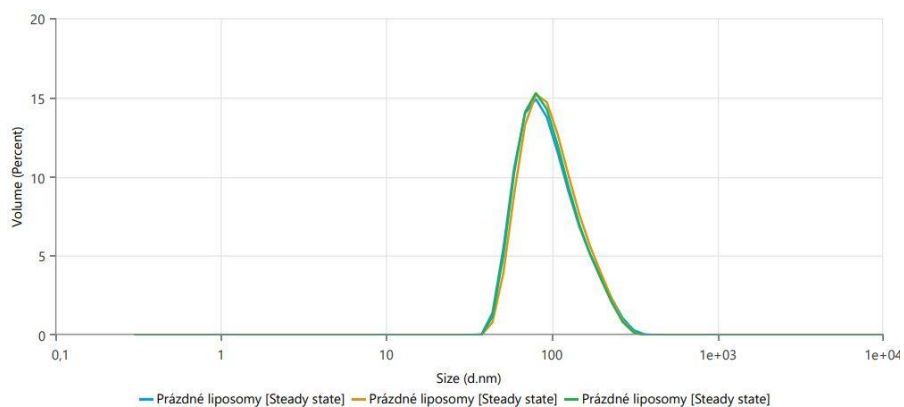
	Velikost průměr	Objem peak [nm]	Intenzita peak[nm]	Celk. počet peak [nm]	PDI
Prázdné liposomy	108,3	103,5	127,3	72,85	0,142
liposomy+RBD	137,1	138,1	149,1	106,2	0,072



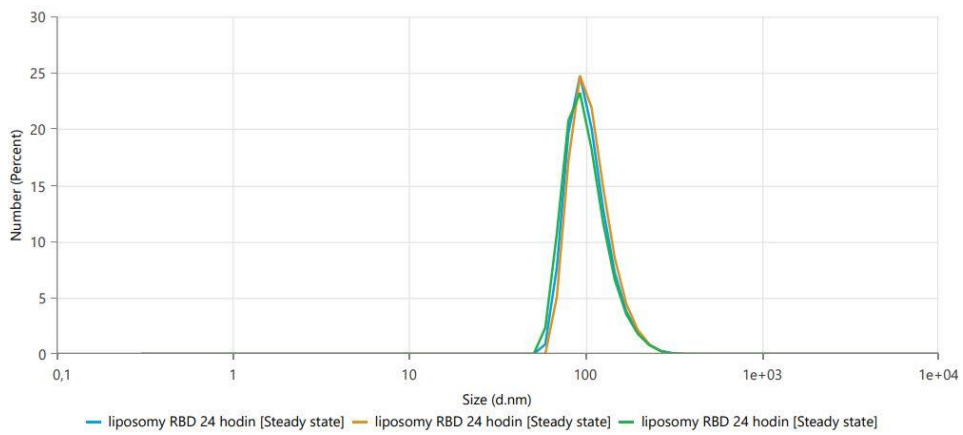
Obrázek číslo 36: Samostatné liposomy, závislost celkového počtu na velikosti, metoda DLS



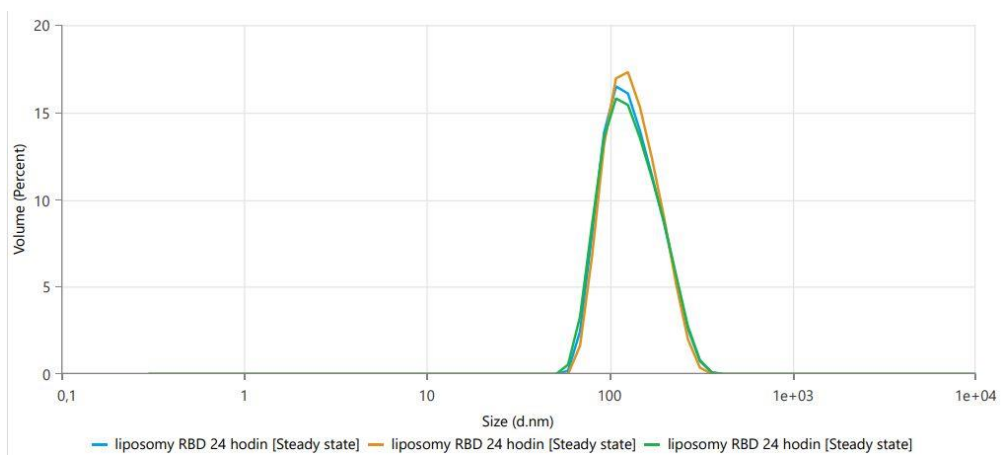
Obrázek číslo 37: Samostatné liposomy, závislost intenzity na velikosti, metoda DLS



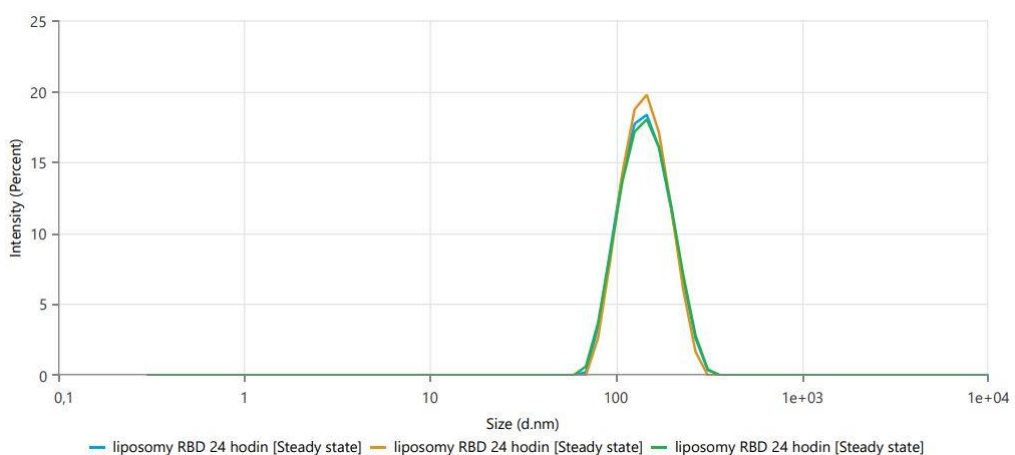
Obrázek číslo 38: Samostatné liposomy, závislost objemu na velikosti, metoda DLS



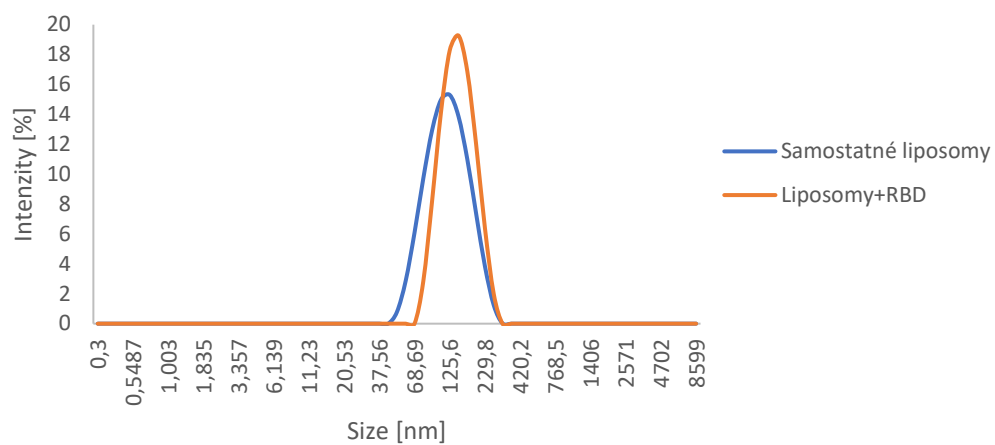
Obrázek číslo 39: Proteoliposomy, závislost celkového počtu na velikosti, metoda DLS



Obrázek číslo 40: Proteoliposomy, závislost objemu na velikosti, metoda DLS



Obrázek číslo 41: Proteoliposomy, závislost intenzity na velikosti, metoda DLS



Obrázek číslo 42: Srovnání velikosti proteoliposomů a samostatných liposomů, závislost intenzity na velikosti, metoda DLS

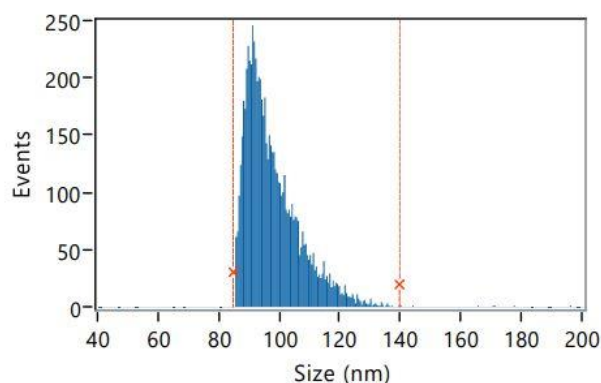
4.1.5 Nanoanalyzer Nano FCM

Jak je popsáno v kapitole 3.1.2.2 jedná se o unikátní přístroj, který je schopen detekce jedné částice. Bylo provedeno celkem 9 měření. Nejdřív byla vytvořena kalibrační křivka pro velikost a počet částic. Následně byly proměřeny

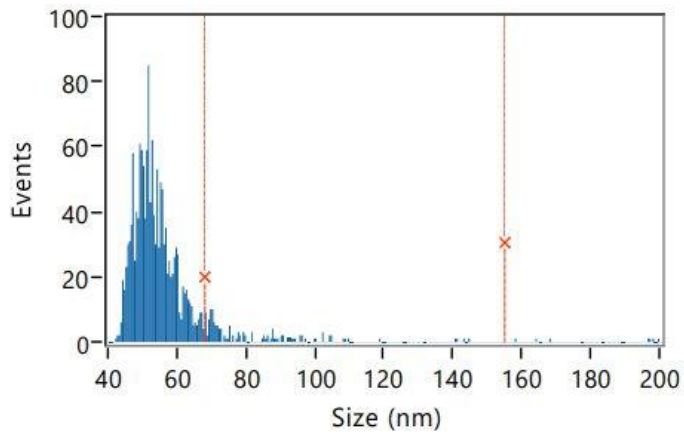
- Liposomy
- Protein (RBD)
- Liposomy s navázaným RBD proteinem

Výsledné grafy ukazují počet populací a událostí, které byly změřeny. Histogramy představují jednotlivé píky, vzhledem k průměru jednotlivých změřených částic. Bylo zjištěno, že samostatné liposomy jsou 97,79 nm velké. Což je výsledek, který odpovídá zamýšlené velikosti – liposomy byly extrudovány přes filtr s velikostí pórů 100 nm. Událostí bylo zachyceno 6976. U měřeného proteinu byla velikost 74,75 nm a událostí bylo 1556. Na histogramu je vyznačený úsek červenými svislými křivkami, který odpovídá rozsahu kalibrační křivky. Je zřejmé, že byly naměřeny menší částice. To koresponduje s údaji, které uvádí výrobce RBD proteinu (průměrná velikost cca 13 nm). Je nutné uvažovat skutečnost, že naměřené velikosti jsou velmi malé a přístroj Nano FCM při takto malých velikostech není schopen rozpoznat částice přesně. Výsledky nicméně odpovídají očekáváním. V souboru liposomů s navázaným proteinem byla naměřená průměrná velikost 114,75 nm a událostí bylo zachyceno nejvíce a to 8465. Stanovená velikost potvrzuje úspěšné navázání RBD proteinu na liposomy.

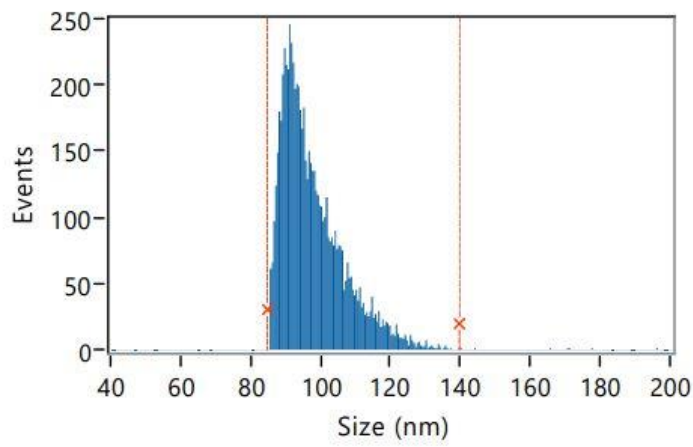
U všech analýz byl stejný ředící faktor a koncentrace částic byla $4,4 \cdot 10^8$ částic/ml. U prázdných liposomů bylo nalezeno 4864 částic v měřeném vzorku, u proteinu 1444 a vázaných liposomů 12 752. Oproti Zetasizeru Nano je analýza přesnější pro větší velikosti částic. Komparace s metodou DLS je zmíněná v kapitole 4.1.2.



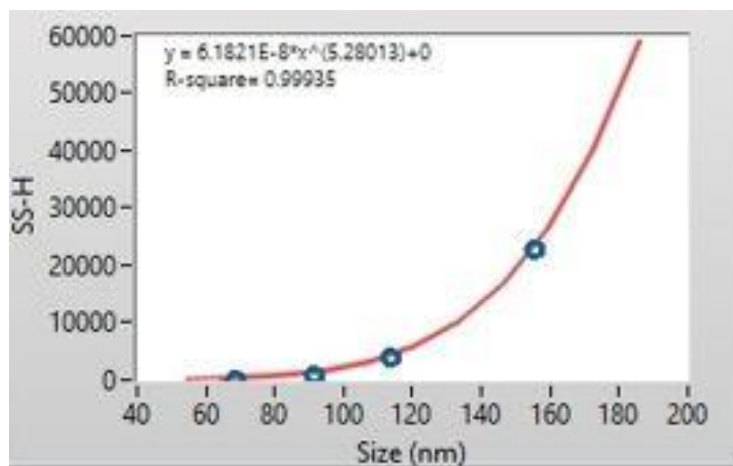
Obrázek číslo 43: Závislost počtu událostí na velikosti u samostatných liposomů, Nano FCM



Obrázek číslo 44: Závislost počtu událostí na velikosti u proteinu, Nano FCM



Obrázek číslo 45: Závislost počtu událostí na velikosti u proteoliposomů, Nano FCM



Obrázek číslo 46: Kalibrační křivka, Nano FCM

4.1.6 FT-IR

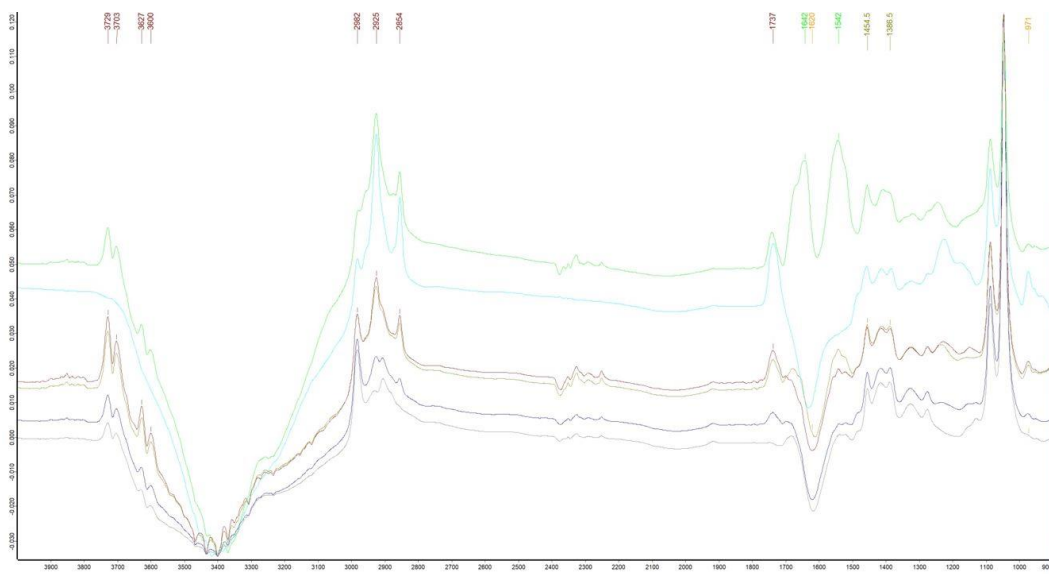
Na přístroji INVENIO S bylo provedeno několik analýz ve dvou sadách. První sada byla sestavena vůči *baseline* (liposomy ve fosfátovém pufru PBS). Pro druhou sadu bylo zvoleno pozadí samotných liposomů. Tabulka číslo 10 přehledně zobrazuje jednotlivé měření s přiřazenými barvami křivek.

Tabulka číslo 10: Shrnutí měření techniky FTIR

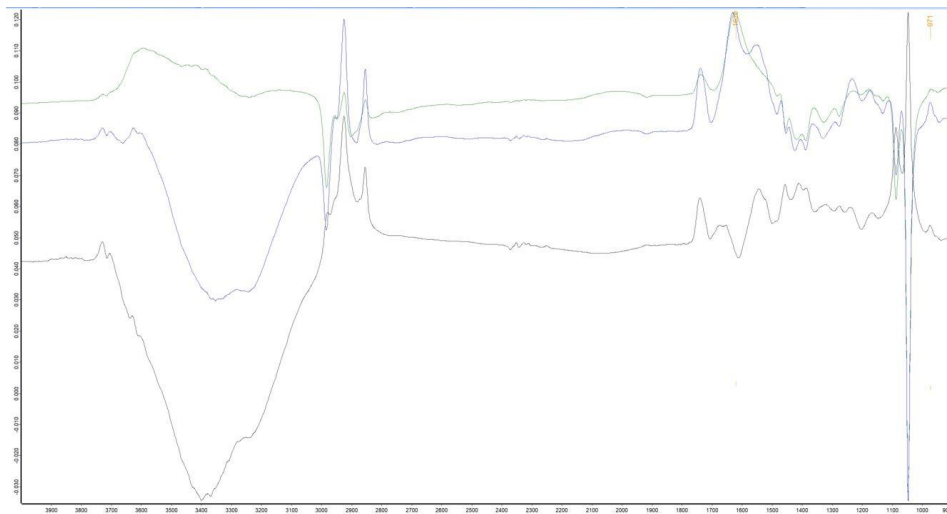
Sada 1		Sada 2	
Background liposomy v PBS		Background liposomy	
RBD	zelená křivka	RBD	zelená křivka
Manan	šedá křivka	Manan	modrá křivka
liposomy	modrá křivka	RBD+Manan	černá křivka
liposomy+RBD	světle zelená křivka		
liposomy+Manan	světle modrá křivka		

U stanovení, kdy jako *baseline* byly použity liposomy v PBS, byl výrazný negativní pík ve vlnočtu 3400 nm. To odpovídá přítomnosti molekul vody. Díky navázaným liposomům je jí přítomno malé množství, proto je pík orientován směrem dolů. U zelené křivky (antigen RBD) jsou dominantní dva kladné píky (vlnočty 1542 a 1642 nm). Pravděpodobně se jedná o dva amidy (amid 1 a amid 2), které jsou v doméně obsaženy. V komparaci s měření liposomů s RBD je patrné, že amidy nejsou tak výrazné a došlo k jejich redukci. Nevýraznější pík okolo 3700 nm odkazuje na volné OH skupiny, které jsou v antigenu obsaženy. U hodnoty 1800 nm negativní pík odpovídá vibračním stavům esterových vazeb v lipidech. Je zřejmé, že u liposomálních analytů jsou výraznější. U vlnočtu 1000 nm jsou viditelné alkoholy obsažené v lipidech.

V měření druhé sady s pozadím nevázaných liposomů je ve vlnové délce 2950 nm pík zobrazující antigen RBD. Ve vlnové délce 1620 nm je opět vidět amidový pík (tentokrát pouze jeden). Modrá křivka (manan) má výrazný negativní pík ve vlnočtu 3400 nm. Odkazuje na přítomnost složky, která je obsažena v lipidu a zároveň není přítomna v mananu. Tento fakt dokládá i poslední stanovovaný analyt (manan + RBD), kde negativní pík při stejné vlnové délce je mnohem výraznější.



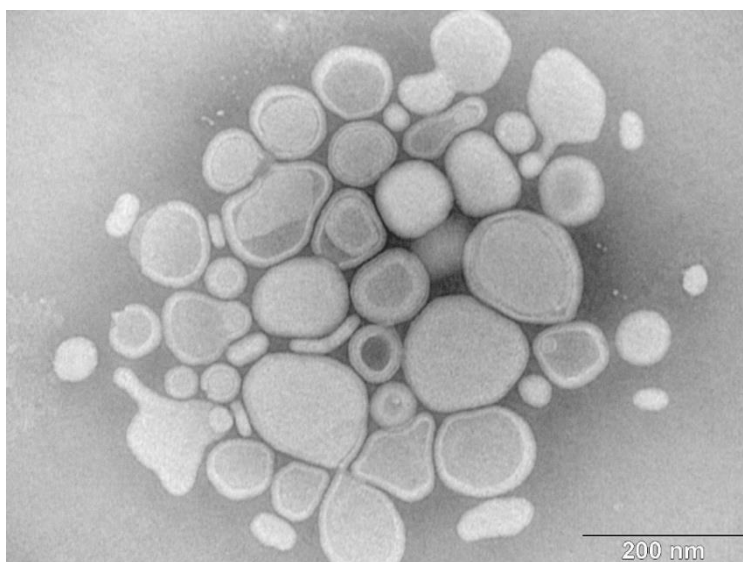
Obrázek číslo 47: IR spektrum, proteoliposomy (background liposomy v PBS)



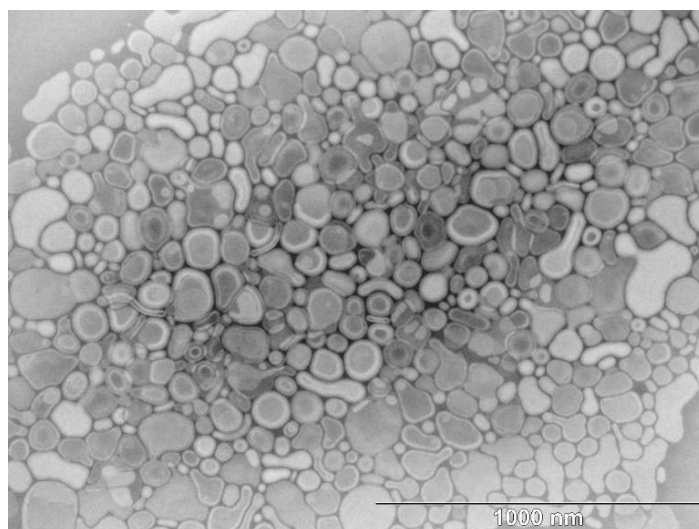
Obrázek číslo 48: IR spektrum, background liposomy

4.1.7 Fotografie elektronového mikroskopu SEM

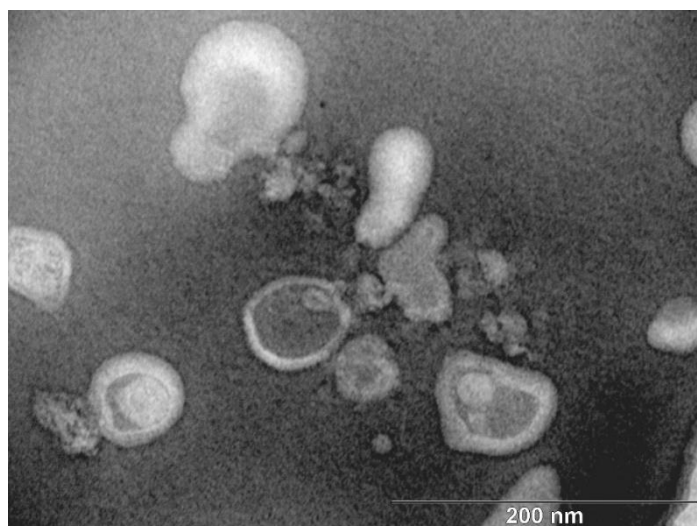
Pro ověření morfologie připravených liposomů byly vezikuly proměřeny na TEM. Vzniklé fotografie znázorňují samostatné liposomy a liposomy s navázaným antigenem. Autorka práce záměrně vybrala několik snímků s odlišným měřítkem pro přesnější viditelnost struktury získaných lipidních částic. Na fotografiích s měřítkem 200 nm jsou viditelné jednotlivé vezikuly nejlépe. Nemají stejnou velikost, ale přibližně odpovídají požadovaným kvalitám. Na fotografii číslo 51 je vidět navázaný protein RBD. Jednotlivé vezikuly jsou od sebe více vzdálené, ale vazba RBD je patrná. Koncentrace liposomů byl volena tak, aby odpovídala požadavkům elektronové mikroskopie.



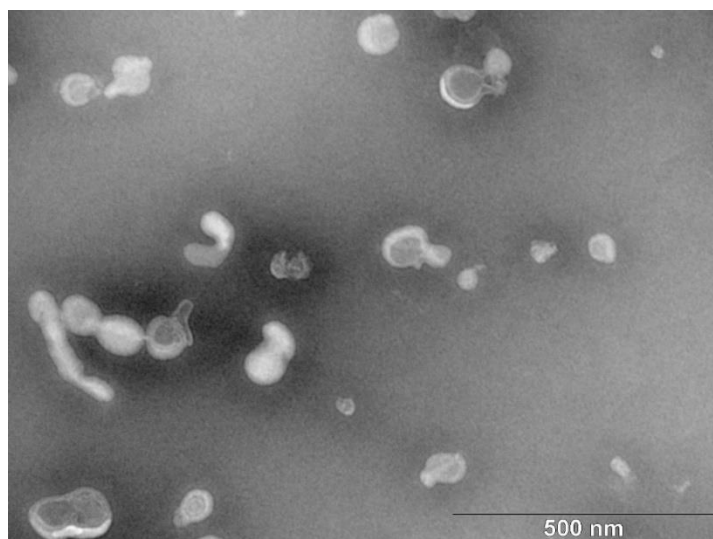
Obrázek číslo 49: Snímek liposomů, extrudovaných přes 100 nm filtr na 400nm filtru, metoda TEM



Obrázek číslo 50: Snímek liposomů, extrudovaných na 400nm filtru, metoda TEM



Obrázek číslo 51: Snímek liposomů s navázaným antigenem RBD, extrudovaných na 400nm filtru, metoda TEM



Obrázek číslo 52: Snímek liposomů s navázaným antigenem, extrudovaných na 400nm filtru, metoda TEM

5 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo stanovení přítomnosti koronavirů v nasofaryngeálních stěrech, určení typu mutace u prokázané positivity a dílčí experimenty s biologickým materiálem. Dále bylo předmětem připravit vhodně zvolenou technikou liposomy o konkrétní velikosti, pokusit se na připravené liposomy navázat protein RBD a tuto chemickou substanci dále charakterizovat.

Z výsledků, které jsou uvedené v této práci je zřejmé, že QRT-PCR je spolehlivou a kvalitní metodou u určování přítomnosti viru SARS-CoV-2. V celém diagnostickém procesu je zcela zásadní správný a dostatečný odběr. Pakliže na odběrové štětičce ulpí malé množství virové RNA (nebo jejích fragmentů) neproběhne správná amplifikace v PCR analýze a analyt může vykázat falešnou negativitu. Počet vzorků, které byly hodnoceny pozitivně na přítomnost koronaviru odpovídal republikovým statistickým údajům daného období. Je zřejmé, že vyzkoušené PCR kity předkládají obdobné výsledky. Odlišnosti byly nalezeny pouze v amplifikaci různých interních kontrol (externí RNA, lidská DNA). Jednotlivé dílčí experimenty s biologickým materiálem se prezentují velmi úspěšně. Z trendů vyplývá, že v případě, kdy je vzorek před analýzou důkladně protřepán a není podroben velké teplotní dilataci, koronavirová RNA je stabilní a nejlépe stanovitelná. Hůře dopadly experimenty, při kterých se ze vzorků odebral požadovaný objem bez předchozího protřepání. Jako nejhorší varianta se ukázala namáhat vzorky teplotním změnám – zmrazit a následně nechat projít varem. Bylo dokázáno, že u analytů, které předtím byly klasifikovány jako Covid pozitivní, došlo k degradaci virové RNA a tudíž PCR analýza vykazovala nesprávný výsledek. Falešná negativita byla stanovena u předem slaběji pozitivních vzorků. Je tudíž patrný trend posunu amplifikačních křivek. U určení mutačního kmene se analýzy dají hodnotit jako úspěšné. Nutno zmínit, že alelická diskriminace probíhala v čase, kdy v ČR začala zcela dominovat varianta Omikron (B.1.1.529) a tudíž její nález je četnější. Bylo také nalezeno několik WT vzorků. Virová nálož vzorku může být způsobena buď nemutovanou variantou viru SARS-CoV-2, nebo variantou, který používaný PCR kit neuměl rozpoznat. Vzhledem ke statistickým údajům zveřejňovaných MZČR v době konání experimentu, je ale tato skutečnost nepravděpodobná. U připravovaných liposomů, jakožto možných nosičů pro rekombinantní antigeny, bylo na elektronovém mikroskopu ověřeno, že jejich velikost odpovídá požadavkům. Jednotlivé složky se ukázaly jako složky vhodné pro přípravu – nedocházelo k nežádoucí agregaci, molekuly nedegradovaly a byly stále v čase. Vázání proteinu RBD bylo taktéž úspěšné.

Na výsledcích použitých charakterizačních metod je velmi dobře vidět, že protein se navázal. Díky faktu, že se jedná o jeden z hlavních cílů prevence a terapie virových infekcí, lze využít liposomy s navázaným rekombinantním RBD proteinem pro konstrukci vakcín vhodných pro injekční i mukózní podání. To by mohla být cesta k vývoji rekombinantní vakcíny proti Covid-19. Součástí práce mělo být ještě preklinické ověření na animálních modelech, ale to se z důvodu pandemických opatření časově nestihlo. Taktéž mělo být provedeno více metod charakterizace a další pokročilejší techniky s molekulárními adjuvans, nicméně kvůli globálním restrikcím a delším dobám dodání vybavení a reagensí se to též nepodařilo obsáhnout. Může to tudíž být námětem pro doktorské studium a disertační práci.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1]. RACLAVSKÝ, V., Úvod do základních metod molekulární genetiky. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 1998, 43 s. ISBN 80-706-7892-5
- [2]. http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2014_09_882-885.pdf[cit. 2021-09-21]
- [3]. LINCZ, L., F., SCORGIE, F., E., KERRIDGE, I., POTTS, R., SPENCER, A., ENNO, A., Methionine synthase genetic polymorphism MS A2756G alters susceptibility to follicular but not diffuse large B-cell nonHodgkin's lymphoma or multiple myeloma. *British Journal of Haematology*. 2003, č. 6, s. 1051-1054. DOI: 10.1046/j.1365-2141.2003.04220.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2141.2003.04220.x>
- [4]. [www.appliedbiosystem](http://www.appliedbiosystem.com) [cit. 2022-01-09]
- [5]. Bartůňková J.; Paulík M. a kol.: *Vyšetřovací metody v imunologii*. 1. Vyd. Praha: Grada, 2005, ISBN 8024706911.
- [6]. Konečná P.; Procházková D. a kol. (2005) Dědičný deficit alfa-1- antitrypsinu. *Čes.-slov. Pediat.* 60 (10), 558-563.
- [7]. <https://www.geneproof.com/respiratory-infections/c1018>[cit. 2022-03-05]
- [8]. <https://diagnostics.roche.com/cz/cs/innovation/todays-infectious-diseases-landscape.html> [cit. 2021-12-29]
- [9]. <https://www.mzcr.cz/wp-content/uploads/wepub/14520/31715/4.%20S%C3%A9AJB-RNDr.%20Kub%C3%A1tov%C3%A1-Semin%C3%A1%C5%99%20VNN-Biosafety,%20biosecurity,%20p%C5%99eprava%20BA.pdf>
- [10]. <https://www.nzip.cz/clanek/1084-covid-19-nove-varianty-koronaviru> [cit. 2022-03-02]
- [11]. *Molecular biology: Understanding the genetic revolution*. Elsevier Academic Press (2005), Edited by David P. Clark, ISBN 0-12-175551-7
- [12]. <https://biogen.cz/novinka-biomedomics-covid-19-orflab-e-a-n-genovy-fluorescencni-pcr-diagnosticky-kit-je-ucinnym-nastrojem-pro-diagnostiku-koronaviru>[cit. 2022-04-06]

- [13]. Abdullah M. Seyd et al., Rapid assessment of SARS-CoV-2 evolved variants using virus-like particles, *Science* 4 Nov 2021
- [14]. SNIJDER, Eric J.; BREDENBEEK, Peter J.; DOBBE, Jessika C.; THIEL, Volker; ZIEBUHR, John; POON, Leo L.M.; GUAN, Yi. Unique and Conserved Features of Genome and Proteome of SARS-coronavirus, an Early Split-off From the Coronavirus Group 2 Lineage. S. 991–1004. *Journal of Molecular Biology* [online]. 2003-08 [cit. 2022-03-07]. Roč. 331, čís. 5, s. 991–1004. Dostupné online. DOI 10.1016/S0022-2836(03)00865-9. (anglicky)
- [15]. Hunter, D. G. & Frisken, B. J. Effect of extrusion pressure and lipid properties on the size and polydispersity of lipid vesicles. *Biophys. J.* 74, 2996–3002 (1998).
- [16]. Ong, S. G. M., Chitneni, M., Lee, K. S., Ming, L. C. & Yuen, K. H. Evaluation of extrusion technique for nanosizing liposomes. *Pharmaceutics* 8, 1–12 (2016).
- [17]. Wagner, A. & Vorauer-Uhl, K. Liposome Technology for Industrial Purposes. *J. Drug Deliv.* 2011, 1–9 (2011).
- [18]. Lim, J., Yeap, S. P., Che, H. X. & Low, S. C. Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering. *Nanoscale Res. Lett.* 8, 1–14 (2013).
- [19]. Polčík, M. Analyzátory velikosti částic. *Chemagazín* 28–29 (2010).
- [20]. Liposome Extrusion. *Biopharma process systems* [online]. Anglie: Copyright, 2015 [cit. 2021-05-09]. Dostupné z: <http://biopharma.co.uk/blog/2013/09/24/liposomeextrusion/>
- [21]. Fyzikální principy transmisní a skenovací elektronové mikroskopie. Laboratoř elektronové mikroskopie [online]. České Budějovice: Nebe Net, β007 [cit. 2021-06-02]. Dostupné z: http://www.paru.cas.cz/lem/bak/1_1.htm
- [22]. Egerton, R. F. *Physical Principles of Electron Microscopy. Physical Principles of Electron Microscopy: An Introduction to TEM, SEM, and AEM, Second Edition* (Springer International Publishing, 2016). doi:10.1007/978-3-319-39877-8.
- [23]. TRANSMISNÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE. *Atmilab* [online]. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci., β011 [cit. 2021-05-26]. Dostupné z: <http://atmilab.upol.cz/texty/TEM-teorie.pdf>
- [24]. SEM ve službách biologie [online]. Olomouc, 2010 [cit. 2021-05-07]. Dostupné z: https://docs.google.com/file/d/0B_qpB0hwjTB7ZGZiMGQxMGUtMDImZC00NW FkLTk5YjAtZmY5ZWVhOTU0Y2Q4/view?pli

- [25]. KVÍTEK, Libor. Metody studia koloidních soustav. In: Acta Universitatis Palackianae Olomucensis [online]. Olomouc, Czech Republic: Faculty of Physical Culture, Palacky University [cit. 2021-06-06]. Dostupné z: <http://chemikalie.upol.cz/skripta/>
- [26]. Optické vlastnosti koloidních soustav: fyzikální princip metody měření velikosti částic a zeta potenciálu. Krystalografická společnost [online]. 2008 [cit. 2021-06-06]. Dostupné z: <http://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/texty-ulohy-uvod.html>
- [27]. PECORA, Robert. Dynamic light scattering: the method and some applications. Editor Wyn Brown. Oxford [England]: Clarendon Press, 1993, 735 s. Monographs on the physics and chemistry of materials. ISBN 978-0-19-853942-1.
- [28]. Liposome Preparation. Avanti Polar Lipids, Inc. [online]. Alabama, ©2016 [cit. 2021-05-16]. Dostupné z: <https://avantilipids.com/tech-support/liposome-preparation/>
- [29]. Protocol for Liposome Preparation Through Thin-film Hydration. In: Consun Chinese medicines research centre for renal diseases [online]. Kowloon Tong, Kowloon, ©2015 [cit. 2021-05-16]. Dostupné z: <http://ccrd.hkbu.edu.hk/images/20130629/13724927885156.pdf>
- [30]. AKBARZADEH, Abolfazl, Rogaie REZAEI-SADABADY, Soodabeh DAVARAN, et al. Liposome: classification, preparation, and applications. Nanoscale Research Letters [online]. 2013, 8(1), 102- [cit. 2021-05-17]. DOI: 10.1186/1556-276X-8-102. ISSN 1556-276x. Dostupné z: <http://nanoscalereslett.springeropen.com/articles/10.1186/1556-276X-8-102>
- [31]. TORCHILIN, V. P. a Volkmar. WEISSIG. Liposomes: a practical approach. 2nd ed.. New York: Oxford University Press, c2003. ISBN 01-996-3654-0
- [32]. AFZAL, Arshad a Kwang-Yong KIM. Three-objective optimization of a staggered herringbone micromixer. Sensors and Actuators B: Chemical [online]. 2014, 192(3), 350-360 [cit. 2021-05-22]. DOI: 10.1016/j.snb.2013.10.109. ISBN 10.1016/j.snb.2013.10.109. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925400513013117>
- [33]. HPLC [online]. [cit. 2012-04-20]. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. Dostupné z WWW: http://www.vscht.cz/tmt/studium/LOTP/LOTP_09_emulse.pdf.
- [34]. http://www.3nastroje.cz/data/dokument/soubor/Sbornik_Sykora_prednaska_LS2008.pdf[cit. 2022122-29]
- [35]. <https://ksicht.natur.cuni.cz/serialy/detektivni-chemie/2>

- [36]. RÝCOVÁ, E. Fluorescenční korelační spektroskopie v hydrofilních koloidech. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 43 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Tereza Halasová, PhD.
- [37]. Šinkorová, Z., Zárybnická, L. (2008). Průtoková cytometrie jako analytická a selekční metoda I. ČÁST. Vojenské zdravotnické listy, 3, 98-103.
- [38]. Kurec, A. (2014). Flow cytometry: principles and practices. Med lab. obs., Oradell, 46(5), 30-31.
- [39]. Suda, J. (2005). Co se skrývá za rostlinnou průtokovou cytometrií. Živa, 53(1), 46-48.
- [40]. Mandy, F. F., Bergeron, M., Minkus, T. (1995). Principles of flow cytometry. Transfusion Science, 16(4), 303-314.
- [41]. Picot, J., Guerin, C. L., Le Van Kim, C., et al. (2012). Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation. Cytotechnology, 64(2), 109-130.
- [42]. Štulík K. a kol. (2004) Analytické separační metody, pp. 36-38, Karolinum, Praha, ČR.
- [43]. <https://pages.pedf.cuni.cz/kch/files/2018/04/Gelov%C3%A11-chromatografie.pdf>
- [44]. Cadburz, J.E. and B.Z. Chowdhry, *Biocalorimetry Applications of Calorimetry in the Biological Sciences*. 1998: John Wiley&Sons.
- [45]. <http://www.imperial.ac.uk/life-sciences/research/flow-cytometry-facility/equipment/nanofcm-nanoanalyzer/> [cit. 2022-01-11]
- [46]. <https://www.nanofcm.com/> [cit. 2022-02-21]
- [47]. <file:///C:/Users/anton/Downloads/Malvern-Zetasizer-ZS-DLS-user-manual.pdf>
- [48]. MURRAY, R. K, et al. Happer's Illustrated biochemistry. Lange Medical Publications, 2003. ISBN 0-07-138901-6.)
- [49]. Calvango, Maria Grazia, a další, a další. Effects of lipid Composition and Preparation Conditions on Physical-Chemical Properties, Technological Parameters and In Vitro Biological Activity of Gemcitabine- Loaded Liposomes. Current Drug delivery.2007,4 stránky 89-101.
- [50]. Bergstrand, Nill. Liposomes for Drug Delivery [Disertační práce]. Uppsala: Uppsala University, Faculty of Science and Technology, 2003. str. 71. ISBN 91-554-5592-1.

- [51]. Kodíček, Milan. Biochemické pojmy (výkladový slovník). [Online] VŠCHT, 2007. [Citace: 25. duben 2021.] vydavatelství.vscht.cz/knihy/uid_es-002/. ISBN 978-80-7080-669-2.
- [52]. Malvern instruments Ltd. User Manual (Zetasizer). 2003.
- [53]. Automated Protein Characterization With the MPT-2 Autotitrator. Pharmaceutical Online. [Online] 27. červenec 2005. [Citace: 25.duben 2021.] <http://www.pharmaceuticalonline.com/article.mvc/Automated-Protein-Characterization-With-The-M-0002>.
- [54]. Wang, Binghe, Siahaan, Teruna a Soltero, Richard. Drug Delivery: Principles and Applications. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2005. ISBN 0-471-47489-4.
- [55]. Míčková, Andrea a Buzgo, Matěj. Nanotechnologie v biomedicině. [Prezentace]. Praha: Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, 2011.
- [56]. Sultana, Abdus Samad Y a Aqil, M. Liposomal Drug Delivery Systems: An Update Review. Current Drug Delivery. 2007,4, stránky 297-305
- [57]. MARRIPATI, Saraswathi, K. UMASANKAR a P. JAYACHANDRA REDDY. A REVIEW ON LIPOSOMES. International Journal of Research in Pharmaceutical and Nano Sciences [online]. 2014, 3(3), 159-169 [cit. 2021-04-26]. ISSN 2319-9563. Dostupné z: <http://www.ijrpns.com/article/A%20REVIEW%20ON%20LIPOSOMES>.
- [58]. Ganesan, P., Karthivashan, G., Park, S. Y., Kim, J. & Choi, D. K. Microfluidization trends in the development of nanodelivery systems and applications in chronic disease treatments. Int. J. Nanomedicine 13, 6109–6121 (2018)
- [59]. M. Shafiur Rahman. Handbook of Food Preservation. (CRC Press, 2007). doi:10.1201/9781420017373."
- [60]. Bai, L. & McClements, D. J. Development of microfluidization methods for efficient production of concentrated nanoemulsions: Comparison of single-and dual-channel microfluidizers. J. Colloid Interface Sci. 466, 206–212 (2016).
- [61]. Li, Y., Arranz, E., Guri, A. & Corredig, M. Mucus interactions with liposomes encapsulating bioactives: Interfacial tensiometry and cellular uptake on Caco-2 and cocultures of Caco-2/HT29-MTX. Food Res. Int. 92, 128–137 (2017).
- [62]. ELOY, Josimar Oliveira, De Souza MARINA CLARO a Raquel PETRILLI. Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: Strategies to enhance encapsulation and delivery. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2014, roč. 123, s. 345–363, ISSN 0927-7765. D-OI: 10.1016/j.colsurfb.2014.09.029

- [63]. Bartovská, Lidmila a Šišková, Marie. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Praha: VŠCHT, ISBN 80-7080-579-X
- [64]. Johnsson, Markus. *Sterically Stabilised Liposomes and Related Lipid Aggregates*. [Disertační práce]. Uppsala: Uppsala University, Faculty of Science and Technology, 2001. str 69. ISBN 91-554-5027-X
- [65]. <http://old.vscht.cz/lms/Zverze/Infrared.html> [cit. 2021-09-15]
- [66]. Ellis, D.I. and Goodacre, R., Metabolic fingerprinting in disease diagnosis: biomedical applications of infrared and Raman spectroscopy, *Analyst*, 2006(131), 875-885. DOI:10.1039/b602376m
- [67]. Wang MY, Zhao R, Gao LJ, Gao XF, Wang DP, Cao JM. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 Nov 25;10: 587269. doi: 10.3389/fcimb.2020.587269. PMID: 33324574; PMCID: PMC7723891
- [68]. *Genové vakcíny proti novému typu koronaviru*. Pardubice, 2020. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice Fakulta chemicko-technologická. Vedoucí práce Mgr. Barbora Jankovičová, Ph. D.
- [69]. [https://www.news-medical.net/health/What-is-a-Receptor-Binding-Domain-\(RBD\).aspx](https://www.news-medical.net/health/What-is-a-Receptor-Binding-Domain-(RBD).aspx)
- [70]. Martinez-Pomares, L. (2012). The mannose receptor. *Journal of Leukocyte Biology*, 92(6), 1177-1186.
- [71]. Crespo, H., Reina, R., Glaria, I., Ramírez, H., de Andrés, X., Jáuregui, P., Luján, L., Martínez-Pomeres, L., Amorena, B., & de Andrés, D. F. (2011). Identification of the ovine mannose receptor and its possible role in Visna/Maedi virus infection. *Vet Res*, 42(1), 28.
- [72]. Sompayrac, L. (1999). *How the Immue System Works*, 4th eddition. Blackwell Sciece, 152 p
- [73]. Beltrame, M. H., Catarino, S. J., Goeldner, I., Boldt, A. B. W., & de Messias-Reason, I. J. (2014). The lectin pathway of complement and rheumatic heart disease. *Frontiers in Pediatrics*, 2.
- [74]. MEIJER, CATHARINA. Green werkzame stof in creme zonder goede aflevertechniek. *Beauty Journaal* [online]. 2015, 2015(6) [cit. 2021-08-23]. Dostupné z:

<http://www.beautyjournaal.nl/2015/07/07/geen-werkzame-stof-increme-zonder-goede-aflevertechniek/>

[75]. CHAPMAN, Graeme. Instrumentation for flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*. 2000, 243(1), 3-12

7 SEZNAM ZKRATEK

BSL	Biological safety level
CDS	Centre for Disease Control and Prevention
CMC	Kritická koncentrace micel
Ct	Cycle of treshold
DLS	Dynamický rozptyl světla
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
FT-IR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou tranformací
GPC	Gelová permeační chromatografie
HBSS	Hankův solný můstek
IC	Interní kontrola
ITC	Izotermální titrační kalorimetrie
MBL	Lektin vázající manózu
MLV	Multilamerální vezikula
MM	Mastermix
MR	Manózový receptor
MZČR	Ministerstvo zdravotnictví České republiky
NK	Negativní kontrola
PBS	Fosfátový pufr
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PK	Pozitivní kontrola
QRT-PCR	Kvantitativní real-time polymerázová řetězová reakce
RBD	Rekombinantní receptor vázající doména
REM	Rastrovací elektronový mikroskop
RNA	Ribonukleová kyselina
RT	Reverzní transkriptáza
SARS-CoV-2	Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus
SEM	Skenovací elektronový mikroskop
SUJB	Státní úřad pro jadernou bezpečnost
TEM	Transmisní elektronový mikroskop
US	United States
UTZ	Ultrazvuk
VOC	Variant of concern

VOI	Variant of interest
WHO	Světová zdravotnická organizace
WT	Wild type