

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2021

Lenka Mužíková

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Katedra biologických a biochemických věd

DNA vakcíny proti chřipkovému viru

Autor: Lenka Mužíková  
Vedoucí práce: Mgr. Marcela Slováková, Ph.D.

Pardubice  
2021

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2020/2021

## **ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE** (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Lenka Mužíková**  
Osobní číslo: **C18262**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Téma práce: **DNA vakcína proti chřipkovému viru**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Zásady pro vypracování

V dostupné odborné literatuře mladší 10 let se seznamte s DNA vakcínou a jejím vývoji proti chřipkovému viru. Zpracujte rešerši na téma původce chřipkového onemocnění, včetně pojmů antigenní shift a drift. Stručně se věnujte průběhu onemocnění, laboratorní diagnostice a léčbě s důrazem na sledování mezisezónních změn. Zaměřte se na očkování proti chřipce a DNA vakcíně, především jejímu vývoji a výrobě.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Marcela Slováková, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2020**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **2. července 2021**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.**  
děkan

---

**prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**  
vedoucí katedry

Prohlašuji, že jsem práci s názvem DNA vakcíny proti chřipkovému viru vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů a směrnici Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 30.6 2021

Lenka Mužíková

## **PODĚKOVÁNÍ**

Chtěla bych poděkovat Mgr. Marcele Slovákové, PhD. za vedení práce, cenné rady a odborný dohled. Dále děkuji mé rodině za vstřícnost a podporu během studia.

## **ANOTACE**

Tato bakalářská práce se zabývá DNA vakcínami proti chřipkovým virům. Úvodní část je věnována historii chřipky a prvním vakcínám proti chřipce. Dále se zabývá stavbou virové částice, množení a mutací virů, nevyjímaje pojmy antigenní shift a drift. V práci je popsán průběh onemocnění, včetně imunologických odpovědí organismu na virus a laboratorní diagnostika chřipkových virů. Je zde zahrnutý i stručný přehled dosavadních typů vakcín. Stěžejní kapitola je věnována vývoji, výrobě DNA vakcín a imunologickým reakcím na vakcínu. V závěru práce se předkládá srovnání DNA a RNA vakcín a široké využití DNA vakcín.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

DNA vakcína, viry chřipky, vakcinace, imunitní reakce, T-lymfocyty, B-lymfocyty

## **TITLE**

DNA vaccine against influenza virus

## **ANNOTATION**

This bachelor thesis deals with DNA vaccines against influenza viruses. The introductory part is devoted to the history of influenza and the first influenza vaccines. Furthermore, the structure of the virus particle, the multiplication and mutation of viruses, together with the concepts of antigenic shift and drift are explained. The work describes the progress of the disease, including the body's immune responses to the virus and laboratory diagnostics of influenza viruses. It also includes a brief overview of current types of vaccines. The main chapter is devoted to the development and production of DNA vaccines and immunological reactions to the vaccine. At the end, the work presents a comparison of DNA and RNA vaccines and the wide use of DNA vaccines.

## **KEYWORDS**

DNA vaccine, influenza viruses, vaccination, immune responses, T-lymphocytes, B-lymphocytes

# OBSAH

ÚVOD	13
1 HISTORIE CHŘIPKY	14
1.1 Historie vakcinace proti chřipce.....	15
2 PŮVODCE ONEMOCNĚNÍ CHŘIPKY	17
2.1 Popis chřipkového viru.....	17
2.1.1 Stavba částice .....	18
2.1.2 Faktory virulence a působení imunitního systému .....	20
2.1.3 Množení virů .....	22
2.2 Mutace .....	23
2.3 Antigenní shift a drift .....	24
2.3.1 Antigenní drift a jeho monitorování .....	24
2.3.2 Antigenní shift a jeho monitorování.....	25
3 PRŮBĚH ONEMOCNĚNÍ	27
3.1 Reakce imunitního systému.....	27
3.2 Laboratorní diagnostika.....	28
3.3 Léčba a prevence .....	31
4 OČKOVÁNÍ JAKO PREVENCE	33
4.1 Vakcíny využívané proti chřipce.....	34
5 DNA VAKCÍNY	37
5.1 Molekula DNA .....	37
5.2 Vývoj DNA vakcín.....	40
5.3 Složení DNA vakcín.....	42
5.4 Působení DNA vakcín na organismus.....	43
5.4.1 Reakce B-lymfocytů .....	45



5.4.2	Reakce T-lymfocytů .....	45
5.5	Příprava DNA vakcín .....	47
5.6	Další klinické využití DNA vakcín a srovnání s RNA vakcínami .....	48
	ZÁVĚR .....	51
	POUŽITÁ LITERATURA .....	52

## SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Druhy vakcín a způsob jejich podání.....	34
Tabulka 3 Obecné strategie používané ke zlepšení účinnosti DNA vakcín proti chřipce .....	41

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 A) Stavba virové částice typu A; B) Stavba virové částice typu B.....	19
Obrázek 2 Mechanismus množení virů. ....	23
Obrázek 3 Antigenní shift a drift u chřipkového viru.....	26
Obrázek 4 Počet pozitivních případů testovaných na chřipku pro ČR.....	32
Obrázek 5 Základní chemická struktura DNA .....	38
Obrázek 6 Časová osa imunitní odpovědi. ....	44
Obrázek 7 Vznik buněčné a humorální odpovědi po imunizaci DNA vakcínou.....	46
Obrázek 8 Procesy čištění plazmidové DNA pro přípravu DNA vakcín .....	47

## SEZNAM ZKRATEK

ADCC	buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách
APC	antigen prezentující buňka
CARD	caspase activation and recruitment domains
CD	znak přítomný na buňce
CpG	fosfoguanosin
CTL	cytotoxické T – lymfocyty
DC	dendritická buňka
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dsRNA	dvouřetězcová RNA
EIA/ELISA	enzymová imunoanalýza
ENIA	Evropský imunologický test na bázi nanočástic
HA	hemaglutinin
HAI	test inhibice hemaglutinace
HLA-DR+	aktivační znak lymfocytů a monocytů
HxNx	antigenní podtyp chřipkového viru
IgX	protilátka určitého typu
IL	interleukin
INF	interferon
IRF	interferonový regulační faktor
LAIV	živá oslabená vakcína
M1	matrixový protein
M2	membránový protein
MHC	hlavní histokompatibilitní systém
mRNA	messenger RNA
MUC	mucinové glykoproteiny
NA	neuraminidáza
NEP/NS1	nestrukturální protein
NF- $\kappa$	nukleární faktor $\kappa$ -lehkého řetězce
NK buňky	buňky přirozeně zabíjející

NKp	receptor NK buňky
NP	nukleoprotein
PA	kyselý protein
PAMP	molekulární vzorec patogenu
PB	polymerázový bazický protein
PCR	polymerázová řetězová reakce
pDNA	plazmidová DNA
PRR	receptor rozpoznávající patogen
QIV	kvadrivalentní inaktivovaná vakcína
RIG-I	gen indukovaný kyselinou retinovou
RNA	ribonukleová kyselina
ssRNA	jednořetězcová RNA
SA	kyselina sialová
SVC	Shell Viral Culture
TCR	receptor T – lymfocytů
TIV	trivalentní inaktivovaná vakcína
TLR	toll-like receptor
TNF	tumor nekrotizující fáze
WHO	Světová zdravotnická organizace

## ÚVOD

Virus chřipky, stejně jako jiné skupiny virů (např. virus způsobující onemocnění COVID – 19) představuje velký problém moderního světa. Způsobuje onemocnění dýchacích cest a díky svému snadnému přenosu ve formě kapének se řadí mezi vysoce nakažlivé onemocnění. Chřipka může být doprovázena závažnými komplikacemi a to především u starších pacientů, malých dětí a pacientů s imunodeficiencí. Jednou z nejúčinnějších preventivních opatření je vakcinace populace vůči cirkulujícím kmenům chřipky. Tématem mé bakalářské práce je očkování proti chřipce se zaměřením na DNA vakcíny.

Virová částice podléhá častým antigenním změnám v podobě antigenního shiftu a driftu. V zimním období se tak vyskytuje sezónní chřipka navozená zmutovanou částicí viru. V případě velkého počtu nárazových mutací viru jsou vyvolány epidemie či pandemie. Tomuto faktu je nutno uzpůsobit i vakcinaci. Existují různé typy vakcín užívané pro prevenci vůči epidemiím, avšak všechny očkovací látky se musí přizpůsobit každoroční obměně v závislosti na mutacích virů. Je třeba monitorovat a předpokládat jakým změnám viry podlehnou a zajistit tak potřebnou vakcínu.

DNA vakcíny společně s RNA vakcínami představují bezpečnější a do jisté míry účinnější vakcíny oproti doposud běžně užívaným typům. DNA vakcíny jsou již několik let ve fázi vývoje a jsou testovány pouze na vybrané druhy onemocnění, včetně chřipky. Vývoj DNA vakcín pramení ze snahy o vytvoření univerzální vakcíny. A to z toho důvodu, aby nemuselo docházet každoročně k přeočkovávání populace v závislosti na mutacích viru. DNA vakcína a zároveň i RNA vakcína kódují virové proteiny, na které reaguje imunitní systém hostitele. Vakcína tak odolává řadě změnám chřipkového viru. Viry běžně během mutagenních procesů mění své povrchové epitopy, avšak nukleová kyseliny uvnitř virové částice zůstává neměnná. DNA vakcíny v organismu navozují buněčnou cytotoxickou a taktéž protilátkovou imunitní odpověď.

Cílem aktivní imunizace neboli očkování je navodit v organismu specifickou imunitní odpověď na antigen přítomný ve vakcíně. Během primární infekce způsobené očkováním dochází k produkci protilátek specifických vůči danému antigenu. Současně jsou vytvořeny paměťové buňky, které v organismu přetrvávají celý život. U sekundární infekce vyvolané stejným antigenem je imunitní odpověď rychlejší a více specifická než u primární infekce.

# 1 HISTORIE CHŘIPKY

Chřipkové nákazy sužují lidstvo již celá staletí [1]. Virus způsobující chřipku se člení do skupin A, B, C a nedávno objevené skupiny D. Přičemž skupina A je nejběžnějším cirkulujícím virem a je schopná vyvolat epidemie i pandemie [3]. Každá chřipková epidemie a pandemie je jiná. Zásadní změna je ve struktuře antigenu viru, s tím souvisí i povaha onemocnění (nakažlivost, úmrtnost) [1].

Ve 20. století chřipky představovaly velkou hrozbu, jelikož měly vysokou míru úmrtnosti, která souvisela s mnoha faktory. Jedno z nejvýznamnějších bylo válečné období spolu s přidruženými bakteriálními infekcemi, absencí antimikrobiálních látek a nedostatečnou lékařskou péčí apod. [1].

Pojem „chřipka“ se objevil už v 15. století v Itálii, odkud se rozšířil po celé Evropě a nejspíš i do Asie a Afriky. Z roku 1510 pochází první zmínka o příznacích chřipky rozšířené po celém světě. Chřipka té doby byla přenášena infikovanými prasaty přepravovanými na lodích. Od roku 1404 do poloviny 19. století následovalo ještě několik chřipkových epidemií a pandemií [3].

V období mezi roky 1918-1919 propukla Španělská chřipka, díky které si vědci, jedním z nich byl Richard Edwin Shope, začali uvědomovat, že chřipku nezpůsobuje bakterie (*Haemophilus influenzae*), jak se doposud domnívali. Chřipkový virus typu A byl však izolován až později v letech 1932-1933 britskými vědci: Wilson Smith (1897-1965), Sir Christopher Andrewes (1896- 1988) a Sir Patrick Laidlaw (1881-1940). V roce 1935 se podařilo Siru Burnetovi a Smithovi kultivovat chřipkový virus na chorio-alantoidní membráně slepičích embryí a o rok později z nich vyizolovat příslušné protilátky [3].

U chřipkového viru je obecně známo, že často podléhá mutacím a proto se každým rokem objevuje nová sezónní chřipka. Při větším počtu hybridizací viru, typického pro zvířata, vzniká celosvětová pandemie [4].

V minulém století celosvětově propukly tři pandemie chřipky známé jako španělská, asijská a hongkongská [1]. Španělská chřipka se objevila v roce 1918 označována antigenním podtypem H1N1. Asijská chřipka propukla v roce 1957 s podtypem H2N2 a hongkongská chřipka se vyskytla nedlouho poté v roce 1968 (H3N2). První dvě zmiňované si vyžádaly až milion obětí a následně v roce 1957 byla vyvinuta vakcína mikrobiologem Maurice Hilemanovi (1919-2005) [2]. Jednotlivé chřipky se od sebe liší strukturou virových částic

i působením na člověka. Za změnu struktury viru je zodpovědný hemagglutinin (HA) na povrchu a neuraminidáza (NA), které společně mění vlastnosti částice [1].

Původ španělské chřipky není jednoznačný, tento kmen byl však vysoce virulentní a rozšířil se po celém světě. U většiny pacientů se projevoval typickou chřipkou a po 5 dnech následovalo úplné zotavení. U dalších nakažených se k chřipce přidružily sekundární bakteriální infekce (např. spalničky u vojenských rekrutů), které byly příčinou smrti [2]. Nejvíce úmrtí nastalo u mladých lidí ve věku 20 – 40 let. Jedno z možných vysvětlení je, že před rokem 1889 na světě cirkuloval podobný kmen H1 a poskytl tak míru ochrany před kmenem H1N1 [1].

Další pandemie vykazovala jinou strukturu hemagglutininu a neuraminidázy a proto byl virus označen H2N2. Virus byl testován fixací komplementu [1]. Onemocnění se nejprve vyskytlo v severní Číně, odkud se šířilo do Hongkongu, Singapuru a odtud do celého světa [2]. Typické projevy chřipky doprovázely pneumonie a chronické onemocnění srdce. To bylo často důvodem úmrtí [1].

Poslední z výše zmiňovaných pandemií započala v Hongkongu a rozšířila se nejprve po celé Asii a poté na západ. Antigenní výbava hemagglutininu se lišila od asijského typu, ale antigen neuraminidázy byl stejný, proto označení H3N2. Výzkumy ukázaly, že pro člověka očkovaného vakcínou proti viru H2N2, je průběh onemocnění, způsobený virem H3N2, mírnější. V tomto období se vyskytl i mezidruhový přenos. A tento kmen virů je původcem i dnešní chřipky. Další často zmiňovaná chřipková epidemie je prasečí chřipka, způsobená kmenem H1N1 a ptačí chřipka (H5N2 a H9N2). U těchto onemocnění je nízké riziko přenosu z člověka na člověka [1].

## **1.1 Historie vakcinace proti chřipce**

Vakcinace je jedinou významnou prevencí vůči turbulentním chřipkovým nákazám [1]. První studie [2] potvrzující vývoj vakcín je až z poloviny 30. let minulého století. Díky těmto studiím byla v roce 1937 podána subkutánně první inaktivovaná vakcína proti chřipce izolovaná z myších plic. Ta obsahovala pouze podtyp viru A. V roce 1942 byl potvrzený fakt, že inaktivované vakcíny dokáží ochránit před chřipkovými epidemiemi. WHO v roce 1952 začala s trasováním cirkulujících virulentních kmenů a zdokonalilo se tak složení vakcín proti sezónní chřipce [3].

K rozvoji očkování významně přispěla pandemie asijské chřipky. Zvýšila se proočkovanost populace, začalo se sledovat působení očkovací látky na populaci, zavedlo se podání více

injekčních dávek v rozsahu méně než 4 týdnů. Od roku 1971 se využívá antigenního driftu virových částic při výrobě vakcín [1]. V letech 1976-1977 byla prokázána nutnost podání dvou dávek ke zvýšení ochrany, dále bylo zavedeno genetické přeřazení kmenu a byla vytvořena podjednotková vakcína. Pro její účinnost bylo potřeba podání dvou dávek [3].

Chřipkové vakcíny byly nejprve vytvořeny pro zvládnutí pandemií a postupně se vyvíjely, jako ochrana před cirkulujícími kmeny virů. Na počátku 2. poloviny minulého století (od roku 1942) vznikly bivalentní vakcíny zahrnující jednu jednotku viru A (konkrétně H3N2) a jednu jednotku viru B. Poté byly k dostání trivalentní vakcíny, které ve svém složení mají dvě podjednotky viru typu A a jednu podjednotku viru B. Dalším velkým pokrokem roku 2016 byl vývoj kvadrivalentní vakcíny, ta je rozšířená o oba typy skupiny B (Yamagata a Victoria). Tato vakcína dokáže působit na širší okruh kmene virů [4].

S vývojem oborů epidemiologie, virologie, imunologie a molekulární genetiky se vyvíjí i přístup k očkování. Ustoupilo se od podávání chemicky čištěných vakcín obsahující celovirionové inaktivované částice, z důvodu jejich slabé účinnosti, bezpečnosti a složitosti přípravy, závislé na dodávání slepičích embryí. Vznikl tak nový typ vakcín s adjuvans MF-59, který se vyznačuje vyšší antigenicitou a je snášenlivější i pro starší osoby a děti. V roce 2013 byla schválena trivalentní rekombinantní vakcína pro populaci ve věku 18 - 49 let. Šlo o první trivalentní vakcínu vyrobenou pomocí rekombinantní DNA technologie. Pro přípravu byl využit bakulovirus a vakcína tak obsahovala třikrát vyšší dávku hemaglutininu než klasické trivalentní vakcíny [3]. I u nově zařazených vakcín je však důležité vyvíjet každoročně nové vakcinační přípravky v závislosti na antigenní modifikaci patogenu [4].



## 2 PŮVODCE ONEMOCNĚNÍ CHŘIPKY

Chřipka je závažné respirační onemocnění. Mezi příznaky chřipky se řadí respirační potíže, hořčinaté stavy, onemocnění horních i dolních dýchacích cest, bolesti svalů, kloubů, hlavy, krku, únava, v těžkých případech se může jednat i o pneumonie a přidružené bakteriální infekce. U pacientů se mohou vyskytovat i nerespirační příznaky jako je onemocnění srdce, centrální nervové soustavy a dalších systémových orgánů [6]. Na severní polokouli se v zimním období každým rokem vyskytuje sezónní chřipka, která postihne 5 až 10 % populace. Chřipkové viry mohou vyvolat i těžký průběh a být příčinou úmrtí u rizikových skupin (např. senioři, dlouhodobě nemocní, lidé s oslabenou imunitou). Po 20 až 30 letech dochází pravidelně ke kompletní změně antigenní výbavy viru a vzniku pandemie. Sezónní chřipka nepředstavuje takové riziko, jako pandemická chřipka, už z toho důvodu, že u sezónní chřipky dochází k mírné změně antigenů a člověk se tak snadněji dokáže bránit. I přesto WHO uvádí, že každoročně má těžký průběh chřipky 3-5 milionů celosvětové populace a 250 000-500 000 lidí jí podlehnou [4].

### 2.1 Popis chřipkového viru

Viry způsobující chřipku jsou zařazovány do čeledi Orthomyxoviridae [4]. Viry obecně se od ostatních mikroorganismů liší hlavně díky svojí velikosti. Velikost chřipkových virů se pohybuje od 80 - 120 nm [6].

Viry se člení na čtyři typy: A, B, C a nově objevený typ D. Viry typu A a C infikují člověka a mnoho druhů zvířat, zatímco typ B dokáže infikovat pouze člověka [4]. Viry chřipky typu A se svým širokým zastoupením podtypů patří do zoonotických patogenů [12]. Na základě antigenní struktury byly chřipkové viry typu A rozřazeny do 18 subtypů HA (H1 až H18) a 11 subtypů NA (N1 až N11) [4]. Podtypy HA přenosné na člověka jsou H1, H2, H3, H5, H6, H7, H9, H10 [12]. Mnoho z vyjmenovaných podtypů (H5, H6, H7, H9, H10) jsou na člověka sporadicky přenosné z ptáků avšak bez dalšího přenosu z člověka na člověka [11]. U divokých vodních ptáků je všeobecně nejvíce zastoupený typ A s mnoha podtypy [12]. Chřipkové viry typu B mají jeden podtyp se dvěma liniemi: Victoria a Yamagata. Primárně se vyskytují u tuleňů, ale jsou potencionálními patogeny i pro člověka [11].

Viry, které způsobují běžnou sezónní chřipku, patří do typu A, konkrétně subtypy H1N1 a H3N2 a viry typu B. [6]. Chřipkové viry každoročně způsobují velké epidemie hlavně i z toho důvodu, že během roku se vyskytnou nové virové typy, se kterými se hostitel

dosud nesetkal. Z tohoto důvodu je nejúčinnější prevencí každoroční očkování a vytvoření tak dostatečné imunity [7].

Období sezonní chřipky nastává začátkem zimních měsíců, kdy přenosu napomáhá nízká vlhkost a teplota. Ročně se tak zaznamenávají dvě sezonní chřipky, jedna na severní polokouli a druhá na jižní. Cirkulující kmeny na jižní polokouli jsou daleko různorodé oproti mírném pásu. Je to dáno klimatickým prostředím: vyšší teploty, sluneční záření, množství srážek apod. [6].

V minulém století subtypy H1N1, H2N2 a H3N2 vyvolaly velké pandemie a doteď jsou běžně vyskytující se a cirkulující. Podtyp H7N7 po desítky let infikuje převážně koně a tvoří tak stabilní linii u savců. Podtypy H5 a H7 patří mezi nepatogenní u vodních ptáků, avšak následkem mutace se mohou stát vysoce patogenním typem pro chovnou drůbež. Nejčastější změnou je vazba peptidu HA s peptidem bakterií a HA je rozštěpen furinovými enzymy a vzniká tak vysoce patogenní kmen H5N1 a H7N9. Proto, aby byly přenosné na člověka, musí dojít k další změnám v závislosti na adaptaci prostředí [11].

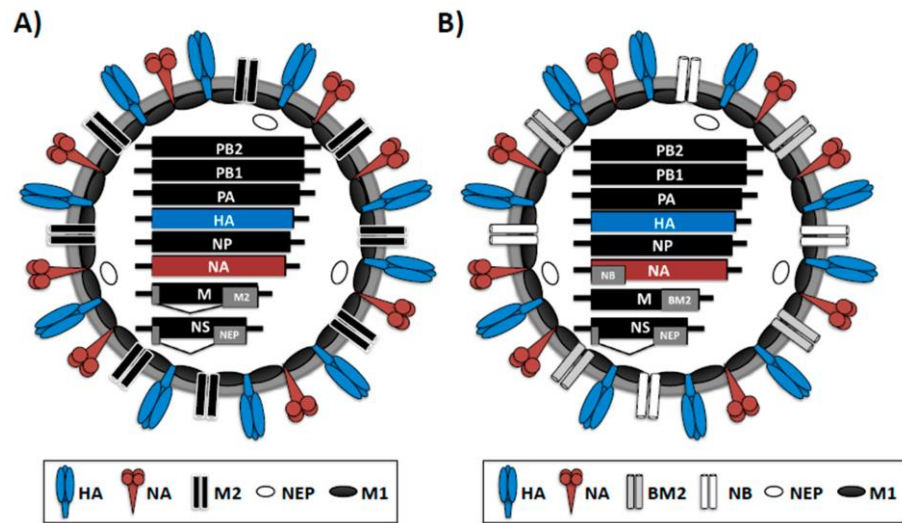
### **2.1.1 Stavba částice**

Struktura viru je složitá a ovlivňuje chování viru během epidemie [4]. I když se jednotlivé typy viru chřipky od sebe antigenně liší, funkce proteinů kódovaných genomem zůstává stejná [6]. Uvnitř viru je obalená záporně nabitá částice se segmentovaným jednořetězcovým genomem RNA. Ve své virové membráně má zabudované dva hlavní antigenní glykoproteiny hemaglutinin (HA) a neuraminidázu (NA) [5].

Celá struktura virových částic typu A, B je znázorněná na obrázku 1. Virový genom RNA je jednořetězcová nukleová kyselina. U virů typů A, B je rozložen do osmi segmentů. První tři segmenty kódují RNA polymerázy (PB1,PB2,PA), další dva segmenty kódují glykoproteiny (HA, NA). Nukleoproteiny (NP) jsou tvořeny 5. segmentem. Segmenty 6 a 8 kódují matrixový protein (M1) a membránový protein (M2), nestrukturální protein (NS1), jaderný exportní protein (NEP). U virů typu C, D mají genomy RNA pouze sedm segmentů, tyto dva typy nezpůsobují u člověka závažné onemocnění, pouze v některých případech u dětí [6].

Virové genomy u typů A a B se segmenty kódující proteiny jsou ukončeny nekódujícími úseky, které mají úlohu promotoru pro začátek replikace a transkripce v genomu virovou polymerázou. Nově vzniklý virový genom tak obsahuje virový ribonukleoprotein (vRNP), enkapsidovaný nukleoproteinem (NP) a úsek virové polymerázy. Polymeráza,

vyskytující se u chřipkových virů, je komplex složený z polymerázových bazických proteinů (PB1, PB2) a kyselých proteinů (PA) [21].



Obrázek 1 A) Stavba virové částice typu A; B) Stavba virové částice typu B, převzato z [21].

Na povrchu virové částice (znázorněné na obrázku 1) jsou antigeny HA (které jsou důležité pro vazbu na receptory kyseliny sialové a vstup viru do buňky) a NA (ty naopak uvolňují viry z neaktivních receptorů a pomáhají tak množení virů v těle hostitele). Pod strukturou antigenů je v lipidové membráně zakotvený matrixový protein (M1), jehož funkce není zcela jasná. Je možné, že tvoří opěru pomáhající udržení struktury viru. V membráně je dále zakotvený tetramerní protonový kanál M2, ten pomáhá udržovat stálé pH a zabraňuje tak strukturním změnám HA [72]. V membráně je i v nižším zastoupení protein NB unikátní pro typ B. PB1, PB2 a PA zodpovídají za syntézu a replikaci RNA v hostitelské buňce. Chřipkové viry obsahují i další doplňkové proteiny podílejících se na prevenci vrozených antivirových odpovědí hostitele anebo jejich funkce není upřesněna. Mezi takové proteiny se řadí PB1-F2, PA-X (pro typ A) a NS1 nebo NB (pro typ B) [6, 73, 74]

I přes podobnou virovou strukturu se částice viru typu A a typu B od sebe liší a to konkrétně díky odlišným délkám koncových nekódujících segmentům (viz obrázek 1). Odlišují se od sebe také vnitřními antigenními proteiny: pro typ A je přirozeně vyskytující se protein M2 a pro typ B jde o protein BM2. Oba dva jsou kódovány společně s proteinem M1 stejným genovým segmentem 7 a následně jsou importovány na povrch infikovaných buněk. Avšak M2 je translován ze sestříhané mRNA, mezitím co BM2 je přeložen jinou cestou. Translace je zahájena iniciačním kodonem BM2, který překrývá terminační kodon M1 proteinu. Virus typu B také obsahuje NB protein [21].

NB protein je složen ze 100 aminokyselin, které jsou kódované na stejném genovém úseku jako NA u chřipkových virů typu B. NB protein je po translaci exprimován ve formě tetrameru na povrchu napadené buňky a během pučení je v malém počtu včleněn do intracelulárního prostoru viru. Význam a funkce není doposud zcela známa. Bylo prokázáno, že NB protein není nezbytný k životu viru. V testech byla použita metoda reverzní genetiky za účelem vytvořit rekombinantní viry typu B bez NB proteinu. Virus se následně replikoval stejným mechanismem jako viry s NB proteinem. Mutace tak nevyvolala změny ve funkci neuraminidázy. Aktivita NA byla měřena třemi testy: eluční test červených krvinek, test inhibice hleny a test aktivity NA pomocí enzymů. I následná opakovaná replikace virů nebyla chybějícím NB proteinem ovlivněná. Neprojevila se ani celková oslabenost viru *in vivo* sledováním titru viru u myši [22].

### **2.1.2 Faktory virulence a působení imunitního systému**

Proto, aby se mohl virus replikovat, musí kvůli své jednoduché struktuře spoléhat na řadu faktorů hostitele. Tyto faktory jsou u každého hostitele jinak zastoupeny a virová částice se musí přizpůsobit [9]. Například obalová vrstva viru je tvořena lipidovou membránou uvolněnou z hostitelské buňky - virová RNA je tak chráněna před vnějšími vlivy [7].

Nejvýznamnější je povrchový glykoprotein hemaglutinin (HA). Hraje hlavní roli při vstupu do hostitelské buňky, kdy zprostředkovává vazbu na tuto buňku přes její povrchové struktury. Je složen ze dvou podjednotek HA1 a HA2 spojených disulfidickým můstkem. HA1 se váže na receptory cílové buňky a HA2 následně umožňuje fúzi viru mezi virovými a hostitelskými endozomálními membránami díky vazbě HA na receptory kyseliny sialové (SA) [71]. Konkrétně HA identifikují všechny receptory na povrchu SA epitelu buněk. Kmeny virů napadající lidské buňky upřednostňují koncovou galaktózu na SA vazbou přes uhlíky  $\alpha$ 2-6. V lidském organismu se tyto receptory nachází u buněk na řasinkovém epitelu dýchacích cest [8]. HA je taky hlavním nosičem epitopů vyvolávající tvorbu neutralizujících protilátek B-lymfocytů. Díky velkému množství epitopů HA a jejich různorodosti snadno unikají imunitnímu systému, šíří se na další hostitele a tím snadno vyvolávají epidemie [71].

Druhý povrchový glykoprotein neuraminidáza (NA) má také důležitou biologickou funkci během životního cyklu viru. Neuraminidáza štěpí zbytky kyseliny sialové přítomné na povrchu buněk dýchacího epitelu během konečné fáze replikace. Dochází k lýze buněk a uvolnění nových virových částic z hostitelských buněk [5, 72]. NA je tvořena z virové exo- $\alpha$ -sialidázy (neboli neuraminidázy) přítomné na vnější straně membrány virionu

a infikovaných buněk. NA nedokáže rozkládat návnadové receptory přítomné na HA virových částic, což může být následkem shlukování virů. Zároveň je NA schopna degradovat mucinové glykoproteiny (MUC5AC, MUC5B, MUC1) přítomné na povrchu buněk v respiračním traktu. Je v nich hojně zastoupena SA a tvoří tak návnadu povrchovým molekulám viru a brání přilnutí virionu na hostitelskou buňku [72].

Bylo prokázáno, že z důvodu účinnější replikace a přenosu viru na dalšího hostitele existuje rovnováha mezi HA a NA [8]. NA kromě katalytického místa, obsahuje také samostatné vazebné místo pro SA a vykazuje hemadsorbční aktivitu. HA i NA jsou postupným přenosem glykosylovány a to následně ovlivňuje funkci enzymu a afinitu k receptoru. To vše může vést až ke změně povahy viru a schopnosti infikovat jiný druh [9].

Mezi faktory virulence současně patří i nestrukturální protein-1 (NS1). Je složen ze dvou částí: N-koncová vazba RNA a oblast efektoru C-terminálu. Hlavní funkce NS1 je potlačení vrozené imunitní reakce organismu (např. utlumení produkce a zesílení signálu interferony typu 1). NS1 mají také schopnost vyvolat apoptózu epitelových buněk dýchacích cest v závislosti na kaspáze [73].

Virová polymeráza PB1-F2 s mutací na místě N66S potlačuje tvorbu interferonů produkovaných imunitním systémem hostitele vazbou mitochondriální receptorů namířených proti virům [74].

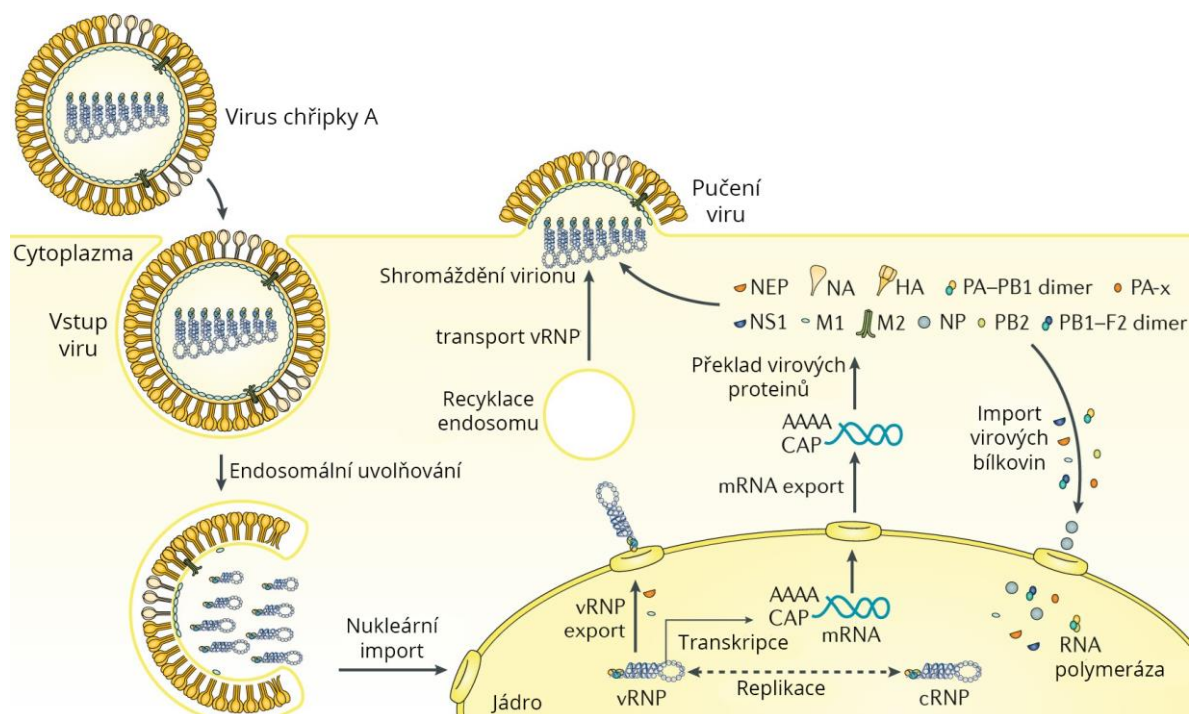
Kyselina sialová (SA) je součástí dalšího výzkumu virového mechanismu, konkrétně vazba SA na subterminální galaktózu glykanů, díky které lze rozlišit druhovou specifitu viru. SA je složena ze záporně nabitých sacharidů (manóza, galaktóza N-acetylglukosamin). Již výše zmiňovaná HA virů běžně napadajícího člověka se poutá k  $\alpha$ 2-6 vázané SA, avšak u virů způsobující ptačí chřipku se vážou na  $\alpha$ 2-3 vazbu SA. Tento typ SA se nachází v plicních sklípcech v dolních cestách dýchacích, a proto se virus špatně přenáší z člověka na člověka. Lidské viry chřipky snadno podléhají adaptivním mutacím v závislosti na vazebném místě receptoru oproti ptačí chřipce. Působení virů na hostitelskou buňku neovlivňuje pouze koncová struktura SA, ale také další sacharidové části ve struktuře (fruktóza, N-acetylgalaktosamin), dále pak další navázané skupiny či celková délka řetězce SA. Epitel horních cest dýchacích je hojně zastoupen komplexem N-glykanů se sialylovaným N-acetyl-laktosaminem a právě tento komplex zvyšuje vaznost virových HA na buněčné receptory [9, 72].

Během virové infekce dochází nejprve k aktivaci neadaptivního imunitního systému a spouštění protizánětlivé reakce. V pozdějším stádiu infekce se aktivuje adaptivní imunitní systém. Jedná se o propojení mechanismy eliminace replikaci virionů a destrukce virových patogenů [10].

### **2.1.3 Množení virů**

Chřipkové viry primárně cílí na buňky respiračního traktu a alveolární buňky, které mají na svém povrchu SA glykany. Způsobují tak poškození epitelu až nedostatečnou výměnu dýchacích plynů. Jednotlivé podtypy virů typu A jsou schopné vázat se na odlišný typ epitelových buněk horních cest dýchacích, např. H1N1 se váže na řasinkové a pohárkové buňky, H5N1 infikuje alveolové buňky a alveolové makrofágy. H5N1 (virus ptačí chřipky) se váže spíše na dolní cesty dýchací a je vysoce patogenní z toho důvodu, že infikují pneumocyty II. typu a vyvolávají pneumonie. Dále dochází k nadměrné produkci cytokinu vedoucímu k plicnímu poškození [72].

Množení virů zobrazuje obrázek 2. Replikace virů začíná v epitelových buňkách dýchacího traktu savců a v trávicím traktu ptáků. Prvním krokem je adheze viru na cílovou buňku vazbou HA na kyselinu sialovou, přítomnou na povrchu buňky ve vazbě na oligosacharidech glykoproteinů. Vznik vazby indukuje receptorem zprostředkovanou endocytózu. Dochází ke vstupu viru do endosomu, sníží se pH endosomu, to aktivuje membránové kanály M2 a dochází ke splynutí virového obalu s lysozomální membránou [75]. Fúze je uvolněn virový obsah do buňky (konkrétně virové ribonukleoproteiny - vRNP). Z cytoplazmy buňky jsou vRNP transportovány do jádra, kde za pomoci virové RNA polymerázy začne probíhat replikace a transkripce. Replikace je umožněna díky kladně nabitému ribonukleoproteinovému komplexu (cRNP). Následuje transkripce, která probíhá přes mRNA. Transkribovaný řetězec vychází z jádra do cytoplazmy a dochází k translaci virových proteinů. PB1, PB2, PA a NP putují zpátky do jádra k další syntéze RNA a virové membránové proteiny (HA, NA, M2) jsou transportovány do plazmatické membrány. Nová HA se proteázami štěpí, pro jejich správnou funkci, na polypeptidy HA1 a HA2. Nestrukturální virové proteiny (NS1, PB-F2, PA-x) zabraňují buněčným antivirovým procesům. U pokročilejší infekce jsou M1 a NEP vázány na vRNP, díky kterým jsou transportovány z jádra do cytoplazmy. Po vazbě s endosomem se lokalizují do plazmatické membrány buňky. Po dokončení replikace se virion z buňky dostává pučením. Uvolněný virion je obalen plazmatickou membránou [75, 76].



Obrázek 2 Mechanismus množení virů, převzato a upraveno z [6].

## 2.2 Mutace

Mutace virů jsou díky jejich struktuře velmi časté. Přežití viru zajišťuje rozmanitost strukturních glykoproteinů. U chřipkového viru nejčastěji dochází k bodovým mutacím genomu. Genom RNA virů je u typu A, B rozložen do osmi segmentů a u typu viru C do sedmi segmentů. Drobné změny v genomu jsou náhodné a jsou výsledkem hybridizace virů, typické u zvířat. Ovšem typ A často podléhá větším variacím genomu, což zapříčiní vznik pandemie [4].

Nové typy virů často vznikají adaptací na nové prostředí, to lze označit jako mezidruhový přenos. Nejvíce podtypů chřipkového viru typu A se přirozeně vyskytuje u vodního ptactva, odkud se dále šíří na jiné druhy ptactva a některé savce (koně, prasata, psi, kočky, člověk a atd.). Při každém dalším napadení nového druhu dochází k mutacím virionu a to konkrétně adaptace virové RNA polymerázy, která je díky své jednovláknové struktuře náchylnější k mutacím než buněčná DNA polymeráza. Mezidruhový přenos je výsledkem mnoha faktorů a zahrnuje i substituci antigenní výbavy záměnou povrchových aminokyselin. Během virové mutace a rekombinantních procesů jsou dominantními determinanty HA. Všeobecně je antigenní vývoj virů rychlejší u člověka jako hostitele než u zvířat, což je výsledkem mnoha faktorů (velikost organismu, věk, kontakt s ostatními apod.). V hojně míře se také testují sekvence virové RNA [6, 77].

Konformace HA je vyvolána v důsledku výhodnějšího napojení na buněčný receptor, následně je vyrovnána koncentrační rovnováha mezi HA a NA a aktivace HA při změně pH. Zároveň se nové viriony musí přizpůsobit změně teploty prostředí (např. teplota horních cest dýchacích u člověka je přibližně 33°C, mezitím co u ptáků a prasat je teplota vyšší) pomocí konformace v podjednotkách virové RNA polymerázy [6, 78].

Rekombinace genetické výbavy viru ovlivňuje ale i další řadu strukturních změn proteinů M1 a M2, které jsou schopné změnit virovou morfologii. Dále pak vznikají funkční změny ve vazebném proteinu Mx1 indukovanému interferonem. Výsledkem funkčních změn viru je pak snadnější přenos částic vzduchem[6].

Monitorování mutací a přenos chřipkových kmenů má na starosti WHO (Světová zdravotnická organizace), která je složena z více než 120 národních laboratoří pro sledování vývoje chřipky. Společně tvoří Globální systém monitorování chřipky a reakci na ni (Global Influenza Surveillance and Response Systém). WHO má mimořádnou úspěšnost v předpovědi chřipkových epidemií a vydávání doporučení pro vývoj vakcín. Pro trasování protilátek v séru lidské populace na nové chřipkové antigeny slouží imunologické testy na principu sekvenční analýzy. Na základě výsledku se následně sestaví seznam doporučení pro vývoj nových vakcín [11].

## **2.3 Antigenní shift a drift**

### **2.3.1 Antigenní drift a jeho monitorování**

Jako antigenní drift je označován souhrn bodových mutací, jejichž důsledkem je schopnost viru uniknout protilátkám imunitního systému aktivovaných při předchozí infekci či očkování. Spouštěčem antigenního driftu je opakované setkání viru s imunitním systémem hostitele. Každá virová částice se snaží uniknout imunitnímu systému, čemuž napomáhá substituce povrchových glykoproteinů (HA a NA). Vznikají tak nové epidemické chřipkové typy nahrazující současný cirkulující typ. Změny v antigenní struktuře jsou testovány vznikem imunokomplexu reakcí testovaných antigenů HA a monoklonálních protilátek [11].

Obrázek 3 zobrazuje mechanismus antigenního driftu, který je v podstatě nahromadění mutací na hemaglutininu a neuraminidázy a z toho důvodu se každoročně vyvíjejí nové vakcíny pro zachování antigenní specifity. HA tvoří hlavní složku chřipkových inaktivovaných vakcín. Antigenní drift HA je průběžně monitorován, testuje se pomocí testu inhibice hemaglutinace (je tak ověřována inhibice vaznosti mezi HA a buněčnými receptory).



Testy namířené proti NA vychází z kontroly inhibice neuraminidázy navyšující shodu v epitopech antigenů mezi vakcínami a cirkulujícími typy virů [78].

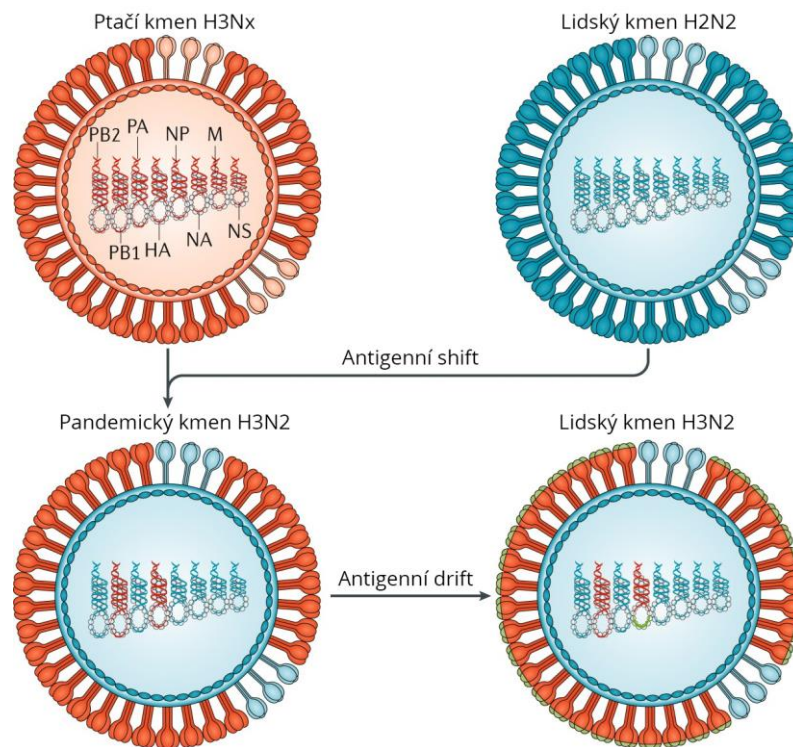
Mezi novější analýzy antigenního driftu u chřipkových virů se řadí metoda antigenní kartografie, která je schopná kvantitativně vyhodnotit údaje z testů inhibice hemaglutinace a z testů inhibice neuraminidázy. Antigenní kartografie se společně s lokálními výzkumy mutagenezí chřipkových virů zabývá jejich trasováním. Bylo prokázáno, že zásadní antigenní drift dokáže vyvolat i nepatrná změna konformace aminokyselin sousedících s funkčními místy HA proteinu. [78].

### **2.3.2 Antigenní shift a jeho monitorování**

Druhá forma změny virové částice je antigenní shift neboli posun. Výsledkem této změny je celková změna genu HA nebo NA, případně obojího. Antigenní shift je možný pouze u virů typu A a je tak důsledkem pandemií vyvolaných tímto chřipkovým kmenem. Typ A jako hostitele využívá velké množství živočišných druhů a během jeho šíření mezi druhy podléhá rozsáhlým změnám za účelem přizpůsobit se konkrétnímu druhu hostitele. Na rozdíl od typu B, který byl potvrzen pouze u tuleňů a koní [12].

Antigeny HA a případně i NA pochází z antigenně odlišných zvířecích kmenů virů. Ty jsou po kontaktu s lidskými cirkulujícími kmeny kombinovány a vzniká tak nový podtyp viru (obrázek 3) [6]. Po infekci jedné buňky virem dochází následně k výměně genových segmentů mezi dalšími virovými částicemi a iniciuje se tak šíření této změny mezi okolní viry. Některé objevené segmenty obsahovaly geny i pro změnu proteinu M2, PA, PB2. Viry typu B po napadení člověka mohou v menší míře být pozměněny, dochází u nich však pouze k delecí a inzerci. K záměně celého typu viru však nedochází [12].

Nová ohniska pandemií vznikají vyhnutím předchozích cirkulujících kmenů. Takto došlo k pandemiím kmene H1N1 a H3N2 typu A, cirkulujících dodnes společně s typem B. Další pandemie jsou těžko předvídatelné jednak z historického hlediska, kdy nevypuklo tolik pandemií, ze kterých by se dal usuzovat princip vzniku další pandemie a jednak velkého množství variací zvířecích subtypů (ptačí H5N1, H7N9 nebo prasečí H3N2 a další). U takových subtypových variant může dojít k přenosu ze zvířete na člověka, ale z člověka na člověka přenos není častý [79].



Obrázek 3 Antigenní shift a drift u chřipkového viru, převzato a upraveno z [6].

## 3 PRŮBĚH ONEMOCNĚNÍ

### 3.1 Reakce imunitního systému

Chřipkové viry jsou do organismu vdechnuty přes respirační cesty, ve větší míře nosní sliznicí. Již v nosním sliznici se vyskytují specifické protilátky IgA, které zabraňují prvotnímu vniknutí viru do buněk neutralizací virového HA a NA. Až v pozdějším stádiu infekce se začnou tvořit protilátky IgM. Koncentrace IgG protilátek se zvyšuje během sekundární infekce díky zvýšené sekreci imunoglobulinů [60, 62].

Chřipkové viry typu A v závislosti na jednotlivých podtypech napadají epitelové buňky dýchacích cest a buňky alveolárního epitelu. Viry se na buňky váží přes vazbu s buněčnými receptory SA $\alpha$ -2,3galaktóza a SA $\alpha$ -2,6galaktóza. U člověka viry upřednostňují buněčné receptory SA $\alpha$ -2,6galaktóza přítomné na respiračních epitelových buňkách horních cest dýchacích [63].

V první fázi reakce imunitního systému reaguje vrozená imunitní odpověď, jedná se o rychlou avšak antigenně nespecifickou reakci. NK buňky (natural killers), monocyty a neutrofilové jsou efektorovými buňkami, které se zapojují do nespecifické imunitní odpovědi. Tato skupina buněk eliminuje replikaci virů a předkládá virové antigeny specifické imunitě. Z počátku virové invaze se buňky lokalizují z krevního řečiště do místa infekce. Následně makrofágy fagocytují virem infikované buňky a zabraňují tak dalšímu šíření viru. NK buňky se řadí mezi cytotoxické lymfocyty a způsobují lýzi napadených buněk prostřednictvím vazby virové HA s cytotoxickými receptory NKp44 a NKp46. Dendritické buňky propojují nespecifickou imunitu se specifickou. Nejprve v cytosolu rozkládají virový protein na peptidy a ty jsou následně transportovány do endoplazmatického retikula, kde jsou navázány na molekuly hlavního histokompatibilního komplexu I. (MHC I.) a prezentovány na povrchu buněčné membrány pro cytotoxické T-lymfocyty (CD8+). Virový protein může být taktéž degradován v endosomu a poté se na peptidové zbytky váže MHC II. Celý komplex je transportován na buněčný povrch, kde je předkládám pomocným T-lymfocytům (CD4+) [10, 60].

Buňky vrozené imunity díky svým PRR (receptor rozpoznávající antigen) na povrchu rozeznávají nebezpečné struktury patogenů (PAMP). Úlohou PRR je rozlišovat vlastní a nevlastní molekuly v napadených buňkách. Z PRR virovou ssRNA (součást PAMP) a transkripční meziproducty identifikují gen indukovaný kyselinou retinovou (RIG-I), které svojí signalizací prostřednictvím receptorů pro RIG-I aktivují CARD. Další ze skupiny PRR

detekující patogen je toll-like receptor (TLR). Speciálně pro detekci viru jsou využity TLR-3,7,8,9 exprimované na povrchu lyzozomů a endosomů. U obou zmíněných receptorů dochází na konci buněčné reakční kaskády k aktivaci transkripčních faktorů, jako je interferonový regulační faktor 3 (IRF3) a 7 (IRF7) a aktivace B-lymfocytů nukleárního faktoru  $\kappa$ -lehkého řetězce (NF- $\kappa$ B). Následkem je exprese interferonů (IFN) a cytokinů. Jinak je tomu u lidských monocytů a makrofágů: TLR8 je stimulován ssRNA, což zvýší produkci cytokinu interleukinu 12 (IL-12). V neposlední řadě se během protizánětlivé imunitní reakce uplatňují NOD-like receptory zahrnující skupiny NOD a NRPL. Ty jsou aktivovány po buněčné infekci a exprimovány na dendritických buňkách, makrofázích, fagocytech, monocytech a plicních epitelových buňkách. Následkem aktivace těchto receptorů je aktivace inflamazómu a produkce cytokinů [10].

Adaptivní imunita tvoří druhou obrannou linii u virové infekce. Je tvořena B a T-lymfocyty. CD8+ T-lymfocyty se za pomoci IFN typu I, IFN- $\gamma$ , IL-2 a IL-12 diferencují na cytotoxické T-lymfocyty (CTL), produkující cytokiny znemožňující replikaci viru. Během vakcinace se zvyšuje účinnost i IFN- $\lambda$  při proliferaci T-lymfocytů. Cytotoxiny produkované CTL zahrnují molekuly perforiny a granzymy. Konkrétně perforin vytváří v membráně napadené buňky póry a umožňuje tak difúzi granzymů k vyvolání apoptózy. Paměťové CD8+ T-lymfocyty zamezují množení viru z horních cest dýchacích do plic, dále brání proti heterologní chřipkové infekci omezením replikace viru. CD4+ T-lymfocyty aktivují B-lymfocyty a tvorbu specifických protilátek. Proliferace CD4+ vede k vývoji Th-lymfocytů exprimujících antivirové cytokiny (IFN- $\gamma$ , IFN, IL-2) a aktivují alveolární makrofágy. B-lymfocyty jsou také součástí adaptivní imunitní reakce, kdy v součinnosti s paměťovými T-lymfocyty snižují postinfekční poškození, zároveň tvoří protilátky snižující počty virů a podporují expanzi CD8+ T-lymfocytů [59, 61].

### **3.2 Laboratorní diagnostika**

Včasný laboratorní průkaz chřipkových virů v biologickém vzorku má podstatný vliv na zahájení léčby. Pro tyto účely se v dnešní době využívají následující metody: izolace virionu a pomnožení v buněčné kultuře, imunofluorescenční testy, imunochemické a sérologické testy, amplifikační testy nukleových kyselin, diagnostické testy na principu imunochromatografie pro rychlý výsledek atd. [13].

Diagnostika viru začíná izolací virové částice. Ta se provádí dvěma metodami: pomocí klasické metody pomnožení virové kultury a metody SVC. Klasická metoda pomnožení viru slouží zároveň k prvnímu screeningu viru. Principem metody je naočkování virové linie nebo vaječných embryí infekčními vzorky. Během dalších 7-10 dní dochází k namnožení kmene viru. Mimo to lze sledovat vývoj cytopatického účinku. Konečné zmnožení se testuje specifickým barvením protilátek, erytrocytární hemadsorpcí, nebo imunofluorescenční mikroskopií. Dalším typem virové kultury je SVC. Používá se již od počátku 90. let minulého století pro klinickou diagnostiku chřipkových virů. Prvním krokem je pomnožení virů v savcích buňkách a poté následuje fluorescenční značení specifických monoklonálních protilátek. Výsledek je znát už během 24-48 hodin na rozdíl od výše zmíněné metody využívající buněčné linie [13].

Mezi časté antigenní testy se řadí přímý fluorescenční test protilátek. Principu testu zahrnuje přímé barvení buněk dýchacího epitelu izolovaných z nosofaryngeálních výtěrů či aspirátů. Následuje fluorescenční značení protilátek namířených proti chřipkovým virům a detekce na fluorescenčním mikroskopu. Tímto principem se vyšetřují typy virů A a B, nejsou však určeny na detekci subtypů virů. Pro zvýšení citlivosti se používá přímý fluorescenční test protilátek s cytospinem, avšak jsou celosvětově nahrazovány pro jejich přesnost a citlivost molekulárními testy [64].

Hodně rozšířené jsou sérologické metody s imunochemickým principem detekce analytu, které lze rozčlenit do několika technik: test inhibice hemaglutinace (HAI), test mikroneutralizace a neutralizace viru, test fixace komplementu, testy enzymovaného imunoabsorbentu (ELISA), Western blot, test jedné radiální hemolýzy [13].

Testy HAI jsou určeny ke stanovení přítomnosti HA specifických protilátek chřipkového viru přítomného v séru. Základem metody je zamezit vazbě viru na savčí erythrocyty díky HA specifickým protilátkám. Výsledkem je titr, který je nadefinován jako převrácená hodnota nejvyššího ředění séra, která ještě dává pozitivní reakci. Specifické protilátky po virové infekci lze stanovit i další metodou, a to neutralizací protilátek. Metoda vychází ze schopnosti protilátek neutralizovat viry a zamezit infekci. Takto se stanovují titry protilátek sezonních chřipkových virů a virů ptačí chřipky. Test jedné radiální hemolýzy se běžně aplikuje opět ke stanovení protilátek namířených proti virovému onemocnění. Protilátka reagující s antigenem vytvoří imunokomplex, jehož tvorba vyvolá hemolýzu zprostředkovanou komplementem a ta je následně proměřena. Fixace komplementu spadá mezi imunodifúzní techniky, jejichž základem je měření protilátkové odpovědi na vnitřní

proteiny (NP a M) virové částice. Z důvodu nižší citlivosti je nahrazována testy HAI, EIA a neutralizace viru [13, 65].

ELISA může probíhat dvojím způsobem a to buď na mikrotitrační destičce anebo na formátu papírového proužku. Metodou ELISA lze prokázat virovou i bakteriální infekci s vysokou citlivostí a specifitou. Neustále je snaha o navýšení těchto dvou parametrů. Bylo toho dosaženo vytvořením metody ENIA (Evropský imunotest na bázi nanočástic) pro rychlou detekci monoklonálních protilátek namířených proti nukleoproteinu chřipkových virů [66].

K rychlému testování chřipkových virů se využívají rychlé chřipkové diagnostické testy, jejichž základem je reakce s monoklonálními protilátkami s virovým nukleoproteinem. K detekci se používá enzymový imunotest nebo imunochromatografické techniky. Výsledky testů jsou dostupné během 30 minut a díky jejich jednoduchosti a rychlému vyhodnocení jsou často využívány ke screeningu virové infekce. Testy však rozlišují virové typy A nebo B, ale nejsou schopny detekovat podtypy virů [13].

Velkou kategorií testů tvoří testy založené na detekci nukleových kyselin. Základem těchto testů je polymerázová řetězová reakce (PCR) nukleové kyseliny viru. Dostupná je celá řada testů k diagnostice chřipkových virů. Spadají sem testy: PCR s reverzní transkriptázou, ligázová řetězová reakce, testy jejichž základem je sekvenování, pyrosekvenování, sekvenování nové generace, DNA microarray, amplifikace založená na sekvenci nukleové kyseliny, smyčkově zprostředkovaná izotermická amplifikace, jednoduchý test na bázi amplifikace, transkripce zprostředkovaná amplifikace, amplifikace posunutím vlákna apod. Momentálně je k diagnostice chřipkových virů schválených 21 testů založených na detekci nukleových kyselin [67, 68].

Testy založené na sekvenování nukleových kyselin virů jsou rozděleny do dvou skupin: sekvenování dle Sangera a Sekvenování nové generace. Sekvenování dle Sangera se hojně využívá při sekvenci DNA s využitím DNA polymerázy, dvou DNA primerů, neznačených deoxinukleotid trifosfátů a deoxinukleotidů s koncovým řetězcem. Sekvenování nové generace přímo stanovuje fragmenty NA z testovaných vzorků [68].

Mezi nové analýzy se řadí technika lab-on-chip/microchip. Systém této analýzy je odvozen od mikroelektromechanických systémů se zaměřením aplikace v biologických a chemických oborech. Díky široké škále uplatnění těchto technik, lze zahrnout i vývoj testů pro více patogenů. U stanovení virů chřipky se jedná o izolaci a genetickou analýzu viru

H1N1 provedené na mikrofluidním čipu. Pro ušetření času byl vyvinut i jednorázový mikročip, na kterém probíhá PCR s reverzní transkriptázou se schopností extrahovat a amplifikovat virovou RNA (H1N1) ze vzorků. Dalšími novými čipy, pro detekci prasečí chřipky, jsou čipy s kontinuálním tokem nebo s elektrickým potiskem [13].

### 3.3 Léčba a prevence

U léčby akutní chřipky je klíčová zejména subvenční léčba, která se soustředí na srážení vysoké teploty, dostatek tekutin, léčení ostatních symptomů a komplikací způsobených sekundární infekcí (např. bakteriální pneumonie). U pacientů s horším průběhem, nebo u pacientů s imunodeficiencí je zvažována léčba užitím antivirotik. Pro vyšší účinek na pacienta je podmínkou užití antivirotik a jejich podání do 48 hodin od projevu prvních příznaků. U ostatních případů se dle klinických studií účinek antivirotické terapie jeví relativně nízký. Léčba sekundárních komplikací (plicní pneumonie) se vykonává podáním konkrétních antibiotik. Během terapie chřipky lze také využít imunoterapie se zaměřením na exacerbované protizánětlivé odpovědi, v kombinaci s antivirotiky. Léčba tak obsahuje několik typů inhibitorů současně: NA inhibitory, produkce cytokinů a náboje leukocytů [69].

Antivirotika se společně s vakcínami řadí mezi nejúčinnější léčbu a prevenci. Při nedostatku odpovídající vakcíny lze použít antivirotika u rizikových pacientů jako prevenci před onemocněním. Na trhu jsou dostupné dvě skupiny antivirotik: adamantany a NA inhibitory. Do adamantanů se řadí amantadin a rimantadin. Jsou podávány orálně a jejich účinek je lokalizován na iontové kanály M2 virů. Z důvodu virové rezistence se v nynější době nedoporučuje užívat tato skupina virostatik. Naproti tomu existují novější léčiva zvaná oseltamivir a zanamivir. Obě působí jako NA inhibitory zaměřující se na enzymatickou aktivitu NA proteinu. Oseltamivir se podává orálně ve formě oseltamivir fosfát a v játrech je metabolizován na karboxylát. Zanamivir je dodán pomocí inhalace [70].

Jako prevence se doporučuje omezit kontakty s nemocným do doby zmírnění klinických příznaků. Mezi preventivní opatření dále spadá mytí a desinfekce rukou, zakrývání úst při kašli, použití jednorázových kapesníků, čištění infikovaných ploch (madla, kliky u dveří apod.). Nejúčinnější profylaxí je však zavedení pravidelného očkování proti cirkulujícím kmenům chřipky. Současně jako prevence by měla být uskutečněna i opatření k omezení přenosu nových kmenů chřipkových virů ze zvířat na člověka. A to pomocí úpravy pitné vody, chovu v biologicky bezpečných stavbách, zavedení očkování a karantény u zvířat [6, 69].

Statistika WHO (obrázek číslo 4) znázorňuje počet pozitivních testů na chřipku v České republice během uplynulých let. V grafu je zahrnut i leden v roce 2021, ale obsahuje nedostatek dat k dosavadnímu vyhodnocení [18]



Obrázek 4 Graf 1A: Počet pozitivních případů testovaných na chřipku pro ČR, Graf 1B: Počet prokazatelných onemocnění chřipky pro ČR v letech 2018-2021, převzato a upraveno z [18].



## 4 OČKOVÁNÍ JAKO PREVENCE

Očkování je nejúčinnější prevencí proti chřipce. Vakcíny jsou všeobecně doporučovány všem věkovým kategoriím za účelem značné imunizace populace. Musí být zároveň bezpečné i z důvodu důvěry populace v očkování. I přes neustálý monitoring vakcín se u některých jedinců objevují nežádoucí účinky [16].

Vakcíny jsou látky, které obsahují imunogeny stimulující imunitní systém očkované osoby za účelem vyvolání specificky obranných látek a mechanismů. Cílem očkování je povzbudit imunitní systém člověka tak, aby při dalším setkání s patogenem došlo ke spuštění rychlé imunitní odpovědi. Tohoto organismus dosáhne produkcí protilátek a buněk imunitního systému jako jsou B-lymfocyty, T-pomahačské a cytotoxické T-lymfocyty (CTL). Další možností je působení na látkové faktory zprostředkované nespecifickou imunitou. Mezi tyto látkové faktory se řadí interferony, interleukíny, složky komplementu, enzymové působení lysozymů apod. [15].

Úspěšnost očkování závisí na povaze infekčního agens, ten se může vyznačovat extracelulárním nebo intracelulárním působením. Pokud je mikroorganismus extracelulárního působení, mezi jeho nejúčinnější protilátky patří adaptivní imunita. Viry patří mezi striktně intracelulární parazity, ale i pro ně hrají velkou roli v obraně před infekcí cytotoxické T-lymfocyty spadající do adaptivní imunity. [15]. Významný rozdíl mezi přirozenou a adaptivní imunitou je imunologická paměť. Jedná se o schopnost imunitních buněk, při opakované infekci, reagovat na daný antigen rychleji a efektivněji. Na tomhle faktu je vystavěna celá strategie vakcinace. Vakcinace tak cílí na antigen specifickou reakci adaptivní imunity. Studie [58] z roku 2020 však informuje o tom, že do imunitní paměti přispívá a úzce spolupracuje i vrozená nespecifická imunita a během vakcinace by neměla být opomíjena. Od rozšíření vakcinace o nespecifickou imunologickou paměť, se očekává vysoce ochranná vrozená a i adaptivní imunita namířená proti specifickým antigenům ihned v místě vstupu patogenu [58].

Očkovací látky v Evropě jsou pravidelně kontrolovány na vyžádání Evropské agentury pro léčivé přípravky z důvodu bezpečnostního profilu vakcíny. WHO také založila monitorovací centrum v Uppsale a komisy pro bezpečnost vakcín, jejichž cílem je globální sledování a řešení otázek ohledně bezpečnosti vakcín [16]. Každá vakcinační látka je do jisté míry schopna vyvolat nežádoucí účinky. Jedná se o „jakýkoli nežádoucí zdravotní stav, ke kterému dojde během podání vakcíny nebo po imunizaci, a který nemusí mít nutně

kauzální vztah s použitím vakcín“ [17]. V případě nízké bezpečnosti vakcín, by ztratili důvěru u veřejnosti. Zároveň se dvakrát ročně testuje antigenní shoda cirkulujícího chřipkového kmene viru s kmenem obsaženým ve vakcíně [16].

#### 4.1 Vakcíny využívané proti chřipce

Vakcíny se rozdělují na inaktivované vakcíny, atenuované vakcíny, subjednotkové vakcíny a DNA vakcíny [15]. Z toho se u očkování proti chřipce používají inaktivované parenterální a živé intranazální vakcíny (viz. Tabulka 1). Jedná se o dlouhodobě aplikované vakcíny, schopné vyvolat širší imunitní odpověď. Vakcíny jsou podávány buď parenterálně, neboli mimo střevně nejčastěji aplikací injekcí do svalu, anebo intranazálně přes nosní sliznici [16].

Typ vakcíny	Způsob podání
TIV	parenterální intradermální
QIV	parenterálně
LAIV	intranazálně

Tabulka 1 Druhy vakcín a způsob jejich podání, TIV (trivalentní inaktivovaná vakcína), QIV (kvadrivalentní inaktivovaná vakcína), LAIV (živá oslabená vakcína), [16].

Inaktivované vakcíny jsou celobuněčné usmrcené patogeny, zbavené schopnosti replikace v organismu. Viry byly usmrceny tepelně nebo chemicky tak, aby nebyly poškozeny povrchové antigeny. Očkování inaktivovanými vakcínami vyžaduje více dávek, protože poločas retence imunogenu v těle imunizované osoby je relativně krátký. V některých případech lze zvýšit koncentraci imunogenu v dávce a tím snížit počet dávek. Závisí však na bezpečnostním profilu vakcíny. Z tohoto důvodu se připravují vakcíny s adjuvans s minerálním nosičem, které zvyšují retenční čas imunogenu a tím se i prodlužuje čas působení imunitního systému. Tento typ vakcín je vhodný na infekce s extracelulárním působením s humorální imunitní odpovědí. Nové technologické možnosti umožňují připravovat živé geneticky inaktivované vakcíny, zbavené replikačního genu [15]. Inaktivované parenterální vakcíny se v praxi nazývají také jako trivalentní vakcíny (TIV), z toho důvodu, že se konkrétně skládají z typu A se subtypy H1N1 a H3N2 a jednoho typu B. Tyto vakcíny se vyrábí už od roku 1978 a nahrazují bivalentní inaktivované vakcíny. V současné době jsou trivalentní vakcíny nahrazovány tzv. kvadrivalentními vakcínami (QIV) což znamená, že virový typ B ve vakcíně je rozšířen o subtypy Yamagata a Victoria. Zvyšuje se tak ochrana vůči virům typu B. První licence na tuto vakcínu byla přijata v roce 2012 [16].

Pomocí trivalentní vakcíny lze u lidí podnítit tvorbu reaktivních IgA protilátek chránící před subtypy chřipky H5N1 a H7N9 [24].

Živé oslabené vakcíny (LAIV) obsahují patogenní chřipkové viry v neaktivní formě. Ve svém složení obsahují virové typy A i B, přičemž každý rok se obměňují virové segmenty RNA na základě aktuálního výskytu sezónních podtypů chřipky [6]. Jednou z možností, jak tyto patogeny získat, je několikanásobné pomnožení na kultivačním médiu za specifických podmínek. Pro pomnožení virů se využívá kultivace ve slepičích embryích nebo buňkách tkáňové kultury. Kultivace je však velmi náročná a není výtěžná na 100%. Výhodou těchto kmenů je, že i po pomnožení v lidském organismu vykazují infekci bez klinických projevů v dlouhé expoziční době a tím i zajišťují kvalitní imunitní odpověď. Oproti tomu nevýhodou je, že atenuované vakcíny mohou být pro imunodeficientní jedince patogenní [23]. Tento druh vakcín je schopný vyvolat větší imunitní odpověď oproti inaktivovaným vakcínám a to díky intranazálnímu podání zvyšující u adaptivní imunitní reakce sérové protilátky. Tyto protilátky reagují na glykoproteiny HA a NA přirozeně se vyskytující u virové infekce [16]. LAIV nejsou schválené pro děti do 2 let a i u seniorů, kde jejich účinnost klesá. Zároveň nejsou vhodné pro osoby s alergií na vejce [23].

U očkování proti chřipce se také využívá subjednotkových vakcín získaných přirozenou izolací z virové částice a díky nepřítomnosti viru se řadí mezi nejbezpečnější vakcíny. Ve své struktuře obsahují virové proteiny HA, NP, M2e a postupně jsou rozšířené o další proteiny NA a M1 [24].

Polysacharidové vakcíny jsou schopné vyvolat humorální odpověď, při které dochází ke vzniku protilátek třídy IgG s nižší citlivostí k fagocytárním receptorům [24]. Pokud jsou ovšem polysacharidy vázané na protein představující nosič, je zaznamenána zvýšená imunitní odpověď. Dále dochází ke spuštění T-dependentní imunitní odpovědi a k dostatečné tvorbě B a T-lymfocytů. Subjednotkové vakcíny jsou složeny pouze z epitopů patogenu, které dokáží vyvolat imunitní reakci. Díky tomuto typu vakcíny se snižuje četnost nežádoucích účinků. Subjednotkové vakcíny mají poměrně malý retenční poločas a jsou omezené množstvím antigenu ve vakcíně. A proto se využívá adsorpce vakcíny na minerální nosič, díky kterému dojde ke zpomalení reakce s imunitním systémem. Subjednotková imunizační složka se váže na biologický vektor transportního systému, čímž se dosáhne připodobnění antigenu s reálnou nepatogenní částicí. Během imunizace organismu vektor působí na buněčnou membránu buněk imunitního systému, vyvolává aktivaci cytokinů a přepravou imunizující složky do hostitelské buňky vyvolá stimulaci Th - lymfocytů. Jako biologické vektory se využívají

proteiny, lipidové komplexy a pro člověka nepatogenní viry a bakterie, které nesou nové genomy kódující imunizační vakcínu. Takto připravené vakcíny stimulují buněčnou i humorální imunitní odpověď. Vakcinační subjednotky rozlišujeme dle charakteru přípravy na vakcíny získané izolací imunogenů z celobuněčných organismů, subjednotkové vakcíny připravené ze syntetických peptidů, rekombinantně konstruované vakcíny, epitopové a DNA vakcíny [15].

Další technologický postup u vývoje vakcín proti virovým infekcím jsou vakcíny s rekombinantně vázanými antigeny. Principiálně je příprava i výroba založená na začlenění genomu kódující protein nesoucí antigenní determinantu určitého patogenního mikroorganismu do nepatogenního viru pomocí DNA rekombinantních technologií [23].

Na trhu je v současnosti k dostání 26 licencovaných vakcín, z toho 13 se používá k vakcinaci sezónní chřipky. Významné firmy zabývající se vývojem a výrobou vakcín jsou Pfizer, Abbott, GSK a Sanofi. Další důležité společnosti jsou Protein Science, Mylan, Microgen nebo Seqirus [40].

## 5 DNA VAKCÍNY

DNA vakcíny se obecně patří mezi stabilnější, efektivnější, bezpečnější a nenáročné na výrobu oproti předešlým typům vakcín. [19]. Podstata očkování DNA vakcínami vychází ze silné imunitní reakce vyvolané T a B-lymfocyty na antigen. V očkovací látce DNA vakcíny je antigen kódován a příležitostně exprimován transfektovanými buňkami a následně je transportován do jádra hostitelské buňky. Tam dojde k vytvoření antigenního proteinu, na který reaguje imunitní systém. Tento typ vakcín je schopen vyvolat buněčnou i humorální imunitní odpověď díky molekulám MHC na povrchu buněk. Imunitní reakce na DNA vakcínu začíná prezentací antigenu pomocí MHC keratinocytů nebo monocytů cytotoxickým T-lymfocytům prostřednictvím znaku CD8+ [20].

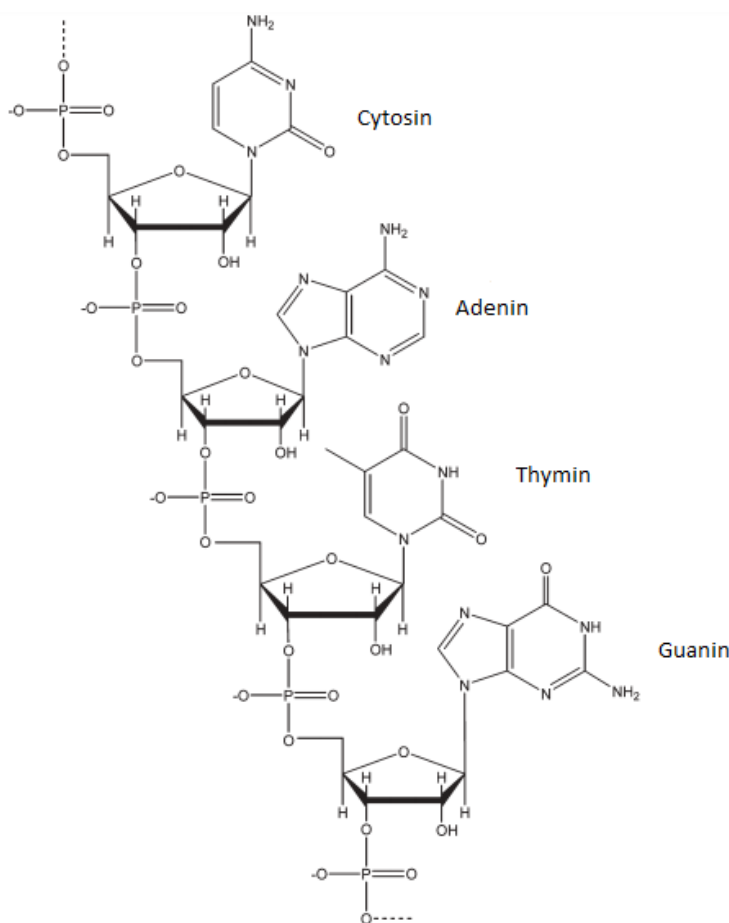
Ve světě je taktéž neustálá snaha o celkové zefektivnění použití DNA vakcín, konkrétně o zkvalitnění dodání DNA hostitelských buněk a současně exprese imunogenních proteinů kódovaných právě DNA vakcínami. Výrobu proteinu obsaženého ve vakcíně podmiňuje transkripce a translace DNA z vakcíny [20].

Plazmidová DNA obsažená ve vakcínách je pokládána za nástupce inaktivovaných vakcín. Nadějně výsledky přinesly vakcíny zahrnující geny pro HA, NA, M2, NP; šlo buď o vyvolání specifické protilátkové odpovědi či nastartování imunitní reakce proti homologním a heterologním virům. DNA vakcíny přináší značnou výhodu svojí bezpečností, snadnou úpravou cirkulujících virových genů a dalších komponent. Prozatím ale DNA vakcíny vykazují nízkou transdukcí a expresi několika genů zaraz, což následně vyvolává slabší imunitní reakce u člověka a také hrozí riziko vzniku malignit, z důvodu přenosu cizí DNA do DNA hostitelské buňky [24].

### 5.1 Molekula DNA

DNA (deoxyribonukleová kyselina) obsažená ve vakcínách kóduje antigeny shodné s antigeny cirkulujících virových kmenů. Respektive DNA kóduje jednotlivé aminokyseliny i s posttranslačními úpravami a to díky inkubaci v *in vivo* podmínkách (v živých hostitelských buňkách). DNA je velice stabilní molekula pro transport i skladování ve srovnání s hotovými proteiny. Další nespornou výhodou DNA je jednoduché nahrazení nevhodících se kodonů za jiné, preferované hostitelem [27].

Hlavní funkcí molekul DNA je nést genetickou informaci o struktuře proteinů [29]. Jedná se o velice stabilní molekulu, v podobě dvoušroubovice, jejíž základ je tvořený purinovými (adenin, guanin) a pyrimidinovými bázemi (thymin, cytosin). Tyto báze se k sobě vzájemně váží, cytosin s guaninem a thymin s adeninem, přes vodíkové můstky [29]. Na kostru tvořenou nukleovými bázemi se přes N-glykosidovou vazbu připojuje molekula deoxyribózy, na které je navázán fosfát (zbytek kyseliny fosforečné) [81]. Na obrázku číslo 5 lze vidět čtyři základní druhy purinových a pyrimidinových bází připojených k sacharidové složce a z druhé strany připojení fosfátových skupin spojených do řetězce.



Obrázek 5 Základní chemická struktura DNA, převzato a upraveno z [33].

Ve struktuře DNA dochází k expresi genů. Jedná se o velmi složitý a regulovaný proces [32]. Prvním hlavním krokem je replikace, neboli zdvojení řetězce. Replikace je zahájena iniciací, do které spadá rozdvojení dvouvláknové DNA enzymem  $\alpha$ -helikázou. Následuje elongace (prodloužení) řetězce kopiemi chromozomu semikonzervativní DNA syntézou. Kopírování řetězce probíhá ve směru  $5' \rightarrow 3'$  po malých částech tzv. Okazakiho fragmentech.

Ukončení replikace se nazývá terminace, při které dochází k opětovnému spojení replikačních vidlic [30].

Transkripce je přepis genetické informace z DNA do mRNA (messenger RNA). Tento proces je podobně jako replikace rozdělen do tří kroků a ty jsou přísně regulovány. Zahájení transkripce závisí na přítomnosti promotoru a dalších faktorech transkripčního aparátu. Následuje prodloužení transkriptu vazbou s RNA polymerázou ve směru od 5' konce k 3' konci, podobně jako u replikace. Zároveň se thymin (T) přepisuje na uracil (U). Vzniklý primární transkript se dále upravuje sestřihovým komplexem až do podoby mRNA. Po dokončení syntézy mRNA se RNA polymeráza odpojí od DNA a tím se transkripce ukončí. Proces transkripce je možné několikrát zopakovat [32].

Po transkripci následuje translace, to je překlad z mRNA (messenger RNA) do aminokyselin pomocí rRNA (ribosomální RNA) a tRNA (transferová RNA). Translace probíhá v ribozomu, který je složen ze dvou podjednotek - velké a malé. Tyto podjednotky obsahují rRNA a skrz podjednotky je veden řetězec mRNA. Začátek mRNA dosedá na ribozomu na A (aminoacyl) místo a translace začíná dodáním energie ve formě guanosin trifosfátů. Na každý triplet (kodon) na řetězci v P místě na ribozomu je navázán antikodon s určitou aminokyselinou. Tento antikodon je tvořen aminoacyl-tRNA a s kodonem je vázán slabými vodíkovými můstky. Jednotlivé aminokyseliny se vzájemně propojují do dlouhých řetězců přes peptidové vazby. Proces translace je ukončen stop sekvencí a dochází k uvolnění bílkoviny z ribozomu. Po translaci následuje ještě několik kroků úpravy nově vzniklých bílkovin, např. posttranslační úpravy [31].

U DNA vakcín je neustálá snaha o zvýšení imunogenicity (hladina produkce protilátek v organismu) a naopak je snaha snížit nutné počty dávek vakcín. Toho lze dosáhnout například kodonovou optimalizací vakcíny na základě HA [27]. Optimalizací DNA pomocí kodonů se zabývá genové inženýrství. V sekvenci DNA jsou zaměňovány podobné kodony pro zvýšení tvorby rekombinantních proteinů. Využití této metody je široké. Kromě využití u RNA a DNA vakcín se uplatňuje také např. u terapie nukleovými kyselinami, genové terapie či terapie pomocí mRNA [28]. Pozitivní účinky vysoké produkce anti-HA protilátek vykazovaly testy DNA vakcín založené na hlavním antigenu virů HA. Další podobně přínosné výsledky byly zjištěny u myší očkovaných proti H5N2 a u fretek, kterým byla podaná vakcína s kodonovou optimalizací na bázi HA proti H1N1 [20].

## 5.2 Vývoj DNA vakcín

DNA vakcíny se staly předmětem zkoumání v 90. letech minulého století [36]. První DNA vakcína byla vyrobena vyčištěním infikované krve od virových částic. Tato vakcína se řadila do skupiny rekombinantních vakcín proti hepatitidě typu B. Představovala tak nový inherentní rekombinantní přístup k expresi povrchového antigenu. Mezi další nové přístupy k vývoji vakcín spadá i reverzní vakcinologie, která je schopna analyzovat kompletní genom povrchových antigenů, např. imunogenní epitopy. Po analýze jsou konkrétní epitopy sekvenovány pro využití ve vakcínách. Podstatou vývoje vakcíny chřipkového viru je rekombinantní hemagglutinin. Další přístup současného vývoje vakcín je systémová biologie zkoumající různé vztahy mezi jednotlivými biologickými systémy. Většina DNA vakcín je ve stádiu, kdy jejich použití je schválené pouze pro veterinární účely. Avšak existuje neustálá snaha o zdokonalení účinnosti vakcín pro schválení na humánní účely [35].

DNA vakcíny mohou být do organismu vpravovány různými způsoby (intramuskulárně, intradermálně, slizničně nebo transdermálně) na základě faktu, že plazmidová DNA vstupuje do buňky a poté do jádra z důvodu přepisu do mRNA. Bylo prokázáno, že po injekčním podání vakcíny se DNA spíše než do buněk ukládala do intracelulárního prostoru a nedocházelo tak k translaci DNA a tvorbě antigenů. Z tohoto důvodu se vakcína aplikuje pomocí intramuskulární nebo intradermální elektroporace, usnadňující její transport do jádra buněk. Dále lze také využít tzv. genové dělo pro mechanické dopravení plazmidů s DNA do cílových buněk či tkání. Mezi další zkoumané metody patří vpravení vakcíny do organismu tryskovými injektory (za vysokého tlaku je vakcína vpravena do svalů), dále pak pomocí nemechanického dodání vakcíny, molekulárního adjuvans a DNA vektoru [38].

Technologie výroby nukleových vakcín je založena na bakteriálním plazmidu kódujícím antigeny cílového kmenu viru. Antigeny jsou dále exprimovány eukaryotickým promotorem. K urychlení exprese se začalo využívat genových enhancerů (např. Intron A), neboli zesilovače ovlivňující transkripci. Následně dochází ke zvýšení polyadenylace a transportu mRNA z jádra na ribozom. Vakcíny využívající plazmidu jsou kultivovány v bakteriální kultuře, následně purifikovány a poté až aplikovány [38].

Jak už bylo zmíněno v podkapitole 5.1, proteosyntéza vede ke vzniku antigenů za přítomnosti kodonů. Díky optimalizaci kodonů se část vývoje DNA vakcín zaměřuje na zlepšení odpovědi znaků CD8<sup>+</sup> u T-lymfocytů a zvýšení titru neutralizačních protilátek. Ne vždy se však podaří imunogenicitu zvýšit jako tomu bylo ve studii vakcinace myši proti



malárii. Lze tedy předpokládat, že optimalizace kodonu nezaručí vyšší produkci bílkovin a zároveň je možná změna konformace a funkce bílkovin [39].

Obecně lze říci, že výsledkem očkování samotným vektorem DNA je poměrně nízká imunogenicita a to zejména u větších zvířat a člověka. To může být zapříčiněno nutností DNA překonat dvě membrány – cytoplazmatickou membránu a jadernou membránu buňky za účelem exprese genu. Toto však neplatí pro RNA, která je obklopena pouze cytoplazmatickou membránou. Na základě této informace byly vyvinuty nové postupy zvyšující absorpci, expresi a imunogenicitu DNA vakcín. Využívá se aplikačního zařízení, genové pistole, injekční zařízení bez jehly a nejpoužívanější elektroporace *in vivo*. Pro zkvalitnění absorpce genu do buňky se testovala vazba DNA na lipidové nanočástice obsahující cholesterol a lipidové kationty, vaznost na polymery, např. polyethylenimin, vazba s biologicky rozložitelnými nanočásticemi např. poly-mléčná--Co--glykolová kyselina nebo chitosan. Pro zvýšení imunogenicity jsou ve vývoji i molekulární adjuvans, ke kterým se řadí ligandy receptoru pro rozpoznávání vzorů (PRR) a různé cytokiny (např. IL-12). Ty jsou dodávány do adjuvans společně s kódovaným antigenem a se schopností vyhledat konkrétní buněčný kompartment nebo buňku prezentující antigen. DNA vakcíny mohou být také vázány na proteinový nebo virový nosič [36].

Vývoj DNA vakcín se v současné době zabývá především čištěním, validací a výrobou bez nutnosti zavádění nových postupů pro vývoj kódování proteinů. Vývoj je tak rychlý, flexibilní a možnosti výroby zahrnují několik vakcín v jednom výrobním zařízení [36].

Expresní kazeta	Adjuvans		Nosič	Způsob podání	Ostatní strategie
Regulační prvky	Biologické	Biochemické	Vaxfectin	Běžné injekce	Aplikace s jinými vakcínami
Intracelulární cílení	Cytokiny	Krátké peptidy	Chitosanové nanočástice	Injekce bez jehly	
Optimalizace kodonů	CD40		Nanočástice stříbra	Elektropolace	
Další změny v kódovací sekvenci	MAD5			Helios gene gun	
Různé formy a fragmenty antigenu	MDPI			Mikrojehly	
	ESAT-6				

Tabulka 2 Obecné strategie používané ke zlepšení účinnosti DNA vakcín proti chřipce,[20].

### 5.3 Složení DNA vakcín

Obecná struktura DNA vakcín je podmíněna syntézou nukleové kyseliny a naklonování na plazmidový vektor. Vakcinační látka tak obsahuje neživý patogen podněcující vyrovnanou imunitní reakci [39]. Technika DNA vakcín je založená na plazmidové DNA kódující antigenní proteiny. Ty jsou po aplikaci vakcíny transportované do buněk k tvorbě specifických protilátek a celkové imunizace organismu na daný typ antigenu [39, 45].

Podstatou DNA vakcín je deoxyribonukleová kyselina navázaná na plazmidové vektory. Tyto vektory pochází z bakterie *Escherichia coli*, které obsahují replikační a selekční markery pro množení této bakterie. Tyto elementy lze nahradit klonováním za extrachromozom transgenní exprese. Polymeráza II je nejúčinnějším promotorem exprese genu ve vakcíně. Tento promotor je odvozen z cytomegaloviru nebo z opičího viru 40. Jiný typ promotoru HIV-1 Env trimer DNA podněcuje vyšší expresi a imunogenicitu. Avšak další skupiny promotorů účinnost vakcín naopak snižují a jsou náchylné na přítomnost zánětlivých cytokinů – TNF a IFN- $\gamma$ . Bakteriální úseky mohou být i úplně odstraněny pomocí technologie minikruhové DNA nebo systému Mini-Intronic Plasmid *in vivo* i *in vitro*. Obě technologie vykazují silnější odpověď u antigen specifických CD8+ T lymfocytů [39].

Moderní DNA vakcíny obsahují rekombinantní proteiny, které mohou vykazovat nižší účinnost ve srovnání s antigeny odvozenými od původního viru. A z tohoto důvodu adjuvans tvoří významnou součást vakcín [40]. Hlavní úlohou adjuvans je zesílení imunitní odpovědi u populace s imunodeficiencí. Adjuvans se dělí na chemické a molekulární. V běžných licencovaných vakcínách se používá chemické adjuvans. Existuje mnoho podtypů adjuvans. Pro chřipkový virus je používán podtyp AS03 (imunitní odpověď je zvyšována zejména u pacientů při hemodialýze a také u starších osob), dále pak MF59 zvyšující titr protilátek hlavně u dětí [40,41] a podtyp CAF01. MF59 s chřipkovým antigenem vyvolávají silnou reakci protilátek třídy IgG produkované T-lymfocyty IL-5 za pomoci Th2. Zatímco typ CAF01 podněcuje vznik odpovědi pomocných T-lymfocytů Th1 a Th17 pomocí CD4 znaku. Adjuvans CAF01 vzniká variací hemaglutininu s lipozomálním kationtem [41,40]. Dodáním adjuvans do vakcíny se zvyšuje i odezva B lymfocytů a CD8+ cytotoxických lymfocytů. Současně dochází ke změně protilátky na neutralizační závisující na cytotoxické protilátce nebo na buněčné fagocytóze [40]. Nejběžněji používané a současně nejstarší adjuvans ve vakcínách je Alum, neboli kamenec (KAl(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>)[41].

V DNA vakcínách je používáno zejména Molekulární adjuvans. Tento typ adjuvans je vytvořen z plazmidových signálních molekul, jako jsou cytokiny, chemokiny a toll-like

receptory [42,43]. Jedním z typů molekulárních adjuvans je cytosin fosfoguanosin (CpG) z bakteriální DNA. Nemethylovaný CpG se synteticky upravuje a reaguje s fosforothiátovým řetězcem za vzniku adjuvans CpG oligodeoxynukleotid. Vyvolává Th1 odpověď a současně tvorbu Tc lymfocytů a IFN-c (interferon typu C). Při imunizaci dochází k aktivaci buněčné i humorální imunity [42,44]. Dalším typem molekulárních adjuvans je dvouvláknová RNA (dsRNA) a plazmidová DNA s IL-12. ds-RNA je využívána zejména u chřipkových vakcín a funguje na základě vylučování cytokinů včetně IFN-a i IFN-c [42]. Plazmidová DNA s IL-12 jako adjuvans je testována u vakcín proti HIV [43]. Vakcínu je důležité spolehlivě dopravit do cílové buňky hostitele. Toto má na starosti příslušný vektor. Jednou z technologií zajišťující usnadnění vstupu přes buněčnou membránu DNA vakcín je elektroporace vyvolávající elektrické impulzy, čímž dochází k dočasné změně permeability membrány. Mezi jiné metody dopravení DNA vakcín spadají bezjehlové metody, tryskové injektory s využitím tlakové komory pro vstřík vakcinační látky s plazmidovou DNA nebo genová zbraň, jejíž principem je dodání plazmidu obklopující těžké kovové částice pomocí stlačeného plynu. Výhodou této metody je snadný transport DNA přímo do cytosolu buněk, avšak nevýhodou může nastat poškození buněk. Bezpečnější a efektivnější způsob dodání DNA je využití nanočástic (NP), jejichž velikost je 10-500 nm a proto mohou být snadno absorbovány do buňky i do jádra a dochází k celkovému zlepšení specifity antigen prezentujících buněk (APC – buňka předkládající antigen). Existuje mnoho typu NP a jedním z nich je polymerní NP, jejichž struktura je založena na chitosanu, kyselině poly (mléčné) (PLA), kyselině poly (glutamové) (PGA) a kyselině poly (mléčné a glykolové) (PLGA). K povrchové ochraně náboje NP je ve struktuře zabudován polyethylenglykol. Lze tak zabránit nespecifickým reakcím se sérovými proteiny. Dalším typem NP jsou lipidové nanočástice, hybridní nanočástice lipidů a polymerů, anorganické částice, virové částice a NP na bázi bílkovin [45].

#### **5.4 Působení DNA vakcín na organismus**

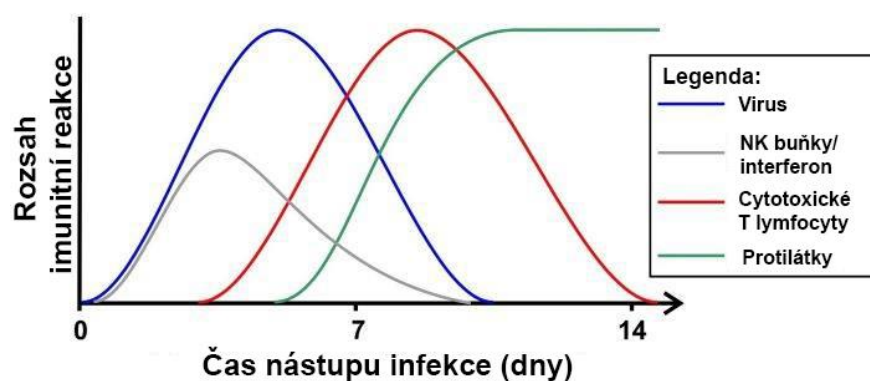
Dlouhodobým očkováním lze dosáhnout kvalitní specifickou imunitní reakci na konkrétní patogen a tak poskytnutí dlouhodobé ochrany [25]. Vakcíny založené na nukleových kyselinách (DNA, RNA, mRNA) jsou univerzální díky snadné změně genů kódujících antigeny. Vakcíny tak dokáží nasimulovat průběh virové infekce a navodit humorální i buněčnou imunitní odpověď. Jsou schopné produkovat široké spektrum infekčních produktů [36]. DNA nesoucí geny chřipkového viru typu A i B exprimují monoklonální protilátky [37].

Během primární imunitní odpovědi se v místě identifikace patogenu shromažďují fagocyty za účelem rozložení patogenu. Následně se shluky fagocytů, antigen prezentujících

buněk, přemísťují do nejbližších lymfatických uzlin a předkládají pohlcené antigeny T-lymfocytům. Výsledkem reakce je tvorba protilátek proti určitému antigenu. Protilátky uvolněné do cirkulace vyhledají zdroj infekce a naváží se na antigenní determinanty patogenu. Při první infekci trvá necelý týden, než vznikne protilátková odpověď. Protilátky tohoto typu mohou v těle přetrvávat i několik měsíců [50]. U každého dalšího rozpoznání stejného virového genu dojde přímo k tvorbě IgG protilátek. Tato reakce je označována jako sekundární imunitní odpověď. Potlačení infekce je tak rychlejší, pružnější, výrazně se snižují symptomy typické infekce. Cílem vakcinace je vytvoření paměťových buněk a rychlejší tvorba protilátek proti specifickému antigenu. Celková imunitní reakce bude rychlejší s mírnějšími příznaky [49].

Z grafu na obr. 6 je patrné, že nejprve vznikají protilátky třídy IgM (NK buňky, interferony) a až v pozdějším stádiu infekce dochází k produkci IgG protilátek cytotoxickými T - lymfocyty.

NK buňky jsou dle morfologie přiřazované ke granulárním lymfocytům a jsou charakteristické znakem CD56. Jsou schopné navodit přirozenou cytotoxicitu a usmrtit tak nádorové buňky nebo buňky napadené virem. Podstatou cytotoxicity NK buněk je exocytóza perforinů a granzymů uvolněných z granulí NK buněk. Perforiny vytváří v membráně infikované buňky otvory, kudy uniká buněčný obsah a granzymy jsou spouštěči apoptózy, tedy buněčné smrti [57]. Interferony, které se účastní zánětlivé reakce během infekce, jsou INF- $\alpha$  a INF- $\beta$ . Jsou produkovány virem napadenými buňkami.



Obrázek 6 Graf 2: Časová osa imunitní odpovědi, převzato a upraveno z [50].

### 5.4.1 Reakce B-lymfocytů

Po podání vakcíny se do organismu dostane konkrétní patogen prezentující se jako antigen schopný vyvolat imunitní odpověď. Tato reakce může být rychlá nebo pomalá. U očkování se nejprve uplatňuje rychlá vrozená imunitní reakce a až následně dochází k aktivaci pomalejší získané imunitní reakce a tvorbě protilátek [25]. Tvorba protilátek neboli vznik humorální odpovědi po očkování začíná kontaktem imunogenu s B-lymfocytem (viz obrázek číslo 7) a dochází k tzv. antigen závislé fázi zrání B-lymfocytu. B-lymfocyty mají několikadenní životnost a neustále vznikají a zanikají. Jejich imunoglobuliny jsou nejčastěji typu IgM vázající se na odpovídající strukturu imunogenu. Vakcinační imunogen je selektivně navázán přes receptory na B-lymfocyt. Po vazbě imunogenu s imunoglobulinem dochází k aktivaci B-lymfocytu (nebo i za přítomnosti T-lymfocytů a jiných faktorů např. interleukinů IL-1, IL-2, IL-4 atd.). Takto aktivovaný B-lymfocyt se zvětšuje a nazývá se blastocyt. Blastická buňka se velmi rychle dělí, zvětšuje se její cytoplazma a endoplazmatické retikulum a dozrává až v plazmatickou buňku s velkou produkcí sekretovaných imunoglobulinů (IgG, IgM, IgA). Plazmatická buňka se po několika dnech rozpadá a uvolňuje tak velké množství specifických imunoglobulinů. Jednoduché vakcíny vždy vyvolávají protilátkovou imunitní odpověď a zároveň jsou schopné vyvolat i buněčnou odpověď zprostředkovanou pomocnými T-lymfocyty. T-lymfocyty jsou imunogenem specificky selektovány díky vazbě TCR receptorem podobně jako B-lymfocyty. Během proliferace pak dochází k tvorbě interleukinů, vazbě k B-lymfocytům a jejich následné aktivaci [15].

Protilátková ochrana spočívá hlavně v rozpoznání infekční částice, která je následně protilátkami neutralizována nebo opsonizována. Dále je pak důležitá aktivace komplementu, mechanismus ADCC (buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách) a v neposlední řadě nespecifické mechanismy imunitního systému mezi které se řadí fagocytóza, apoptóza a membránová léze a další [15].

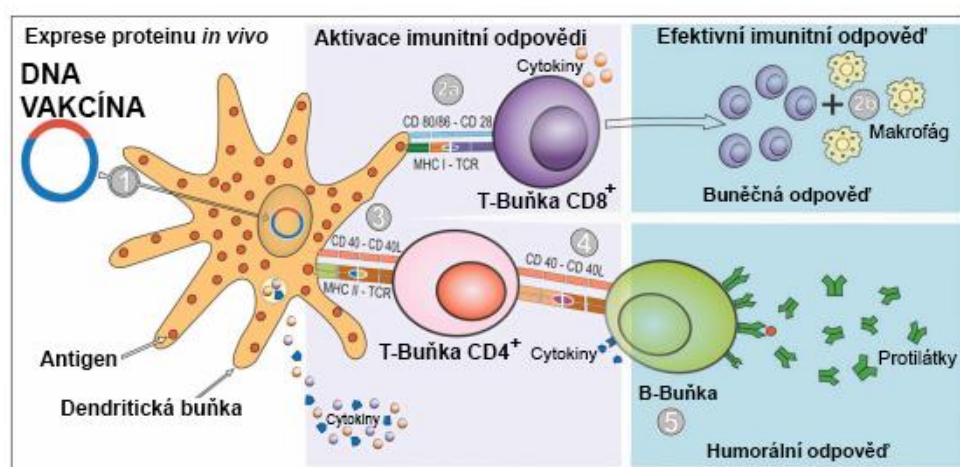
### 5.4.2 Reakce T-lymfocytů

Po transkripci a translaci DNA vakcíny na proteiny jsou tyto antigeny pohlceny dendritickými buňkami (DC). DC pohlcují virové antigeny z periferie fagocytózou nebo endocytózou. Poté je zahájena prezentace antigenu T-lymfocytům (viz obrázek číslo 7)[82]. T-buněčný receptor pro antigen (TCR) společně s MHC I. třídy a MHC II. třídy (hlavní histokompatibilní komplex) jsou struktury, které také zprostředkovávají vazbu s antigenem vakcín. Vážou peptidové fragmenty antigenu a prezentují je na povrchu buněčné membrány T-lymfocytům. Komplex peptidu a MHC I. třídy je typickým receptorem pro cytotoxické

CTL buňky (cytotoxický T-lymfocyt) a komplex peptidu a MHC II. třídy je receptorem pro T-helper lymfocyty. MHC I. třídy prezentuje endogenní antigeny. Takto prezentovaný antigen strukturně odpovídá peptidovým fragmentům, které vznikly štěpením intracelulárních bílkovin v cytosolu buňky. Proteolytické enzymy produkují peptidové fragmenty, které se na membráně mohou vyskytovat i v menším množství závislých na ATP a ubiquitinu. K vazbě MHC I. a prezentovaného peptidu dochází na endoplazmatickém retikulu. Po vazbě je komplex přemístěn přes transportéry (TAB = transportéry spojené se zpracování antigenu) na povrch buněčné stěny. Komplex peptidu je následně vystavován molekulou HLA I. třídy cytotoxickým T-lymfocytům CD8<sup>+</sup> (diferenciační antigen) [26].

MHC II. prezentují cizorodé antigeny exogenním mechanismem tzn., že váží fragmenty peptidů extracelulárního původu. Ty následně putují do endosomu buňky a dochází k jejich degradaci působením kyselého prostředí. K vazbě MHC II. a peptidu dochází právě v endosomu. Na povrchu buňky pak vystavují antigen prezentující antigen (APC) pro buňky, jako jsou: B-lymfocyty, T-lymfocyty CD4<sup>+</sup>, dendritické buňky a makrofágy [26]. Inaktivované vakcíny obsahují pouze usmrcené proteiny nebo peptidy, které jsou vázány přes receptory MHC II. třídy. Tento typ vakcín CTL buňky nestimuluje, protože vazba s receptory MHC II. třídy vede jen k aktivaci T-helper buněk [15].

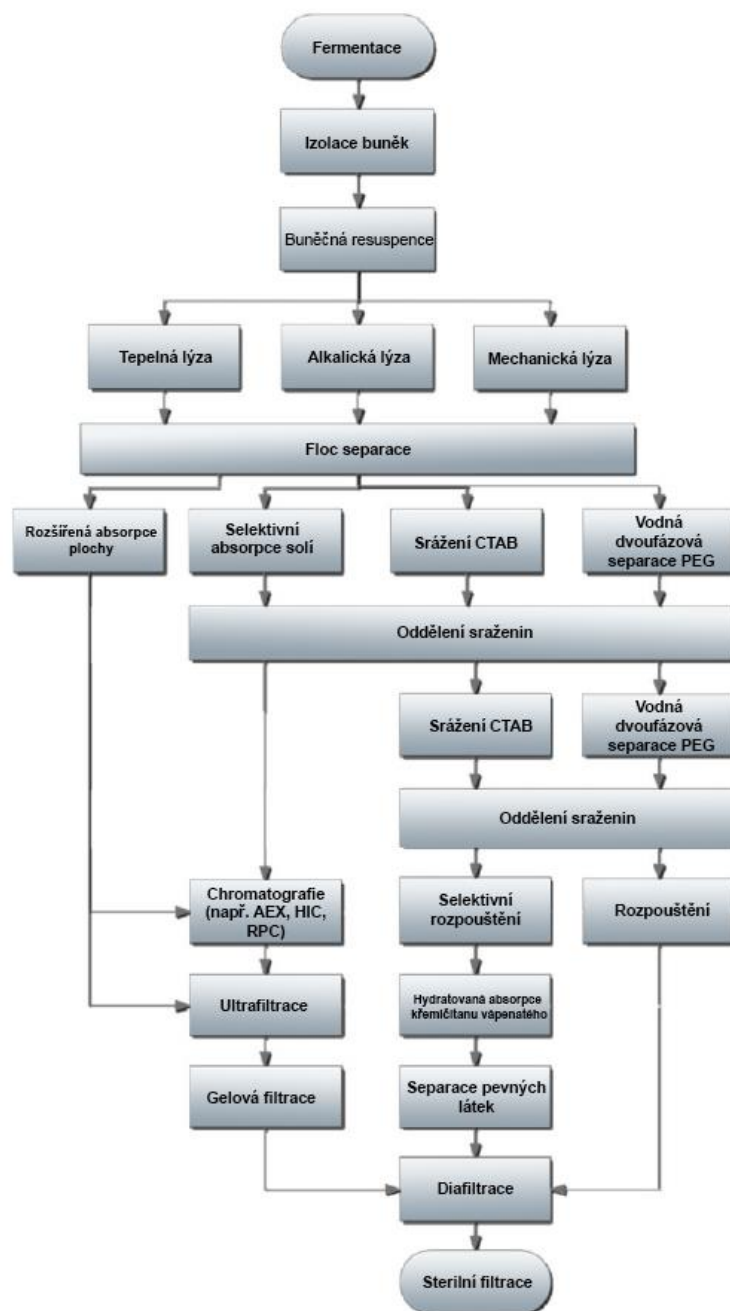
Pokud je antigen prezentován neaktivními DC, dochází k indukci periferní tolerance. Na antigen není vytvořena adekvátní imunitní odpověď, ale je imunitním systémem tolerován. Periferní tolerance je následně udržována regulačními T-lymfocyty. Aktivace DC je tedy velice důležitá. DNA vakcíny záměrně kódují antigeny, které cílí na DC typu 205 z toho důvodu, že jsou vědecky dobře pochopeny [82].



Obrázek 7 Vznik buněčné a humorální odpovědi po imunizaci DNA vakcínou, převzato a upraveno z [53].

## 5.5 Příprava DNA vakcín

Základem úspěchu imunizace proti chřipce je dodání virového nebo nevirového vektoru do jádra buňky. DNA vakcíny obsahují nevirový vektor, který je ve formě kruhové plazmidové DNA nadšroubovice. V cílové buňce je znemožněná replikace vektoru, tudíž je zaznamenána nižší toxicita, zároveň i levnější výroba a vysoká stabilita vektoru. Výrobu předchází složitý proces čištění plazmidové DNA, který je znázorněn na obrázku číslo 8 [35,46].



Obrázek 8 Procesy čištění plazmidové DNA pro přípravu DNA vakcín, převzato a upraveno z [35].

Po čištění následuje samotná příprava vakcíny. Prvním krokem přípravy je teoretický návrh a sestavení struktury vektoru plazmidové DNA (pDNA) k expresi do buňky. Následuje vhodný výběr bakteriálního kmene nejčastěji *Escherichia coli*. Je zhotovena optimalizace kultivačního média a fermentace. Pro fermentaci jsou vybírány ty geny *E. coli*, které se podílí na centrálním metabolismu uhlíku a udržují integritu plazmidu. Kultivace probíhá v bioreaktoru, kde se využívá různých metod např. kultivace s vysokou hustotou buněk, pro co nejvyšší výtěžnost. Vysokou hustotu buněk lze zajistit optimalizací fermentačního média, a použitím speciální fermentační technologie (fed-batch). Fermentační médium se optimalizuje na základě poznatků o replikaci DNA a zvýšení tak produkce plazmidů. Maximální výtěžnost izolace musí být 1 mg pDNA/l kultivačního média nebo pro specifické výtěžky 1 mg pDNA/g hmotnosti suché buňky. Během integrity primární sekvence pDNA jsou sledovány parametry, které lze využít pro zdokonalení vývoje vakcín např. absence delecí a inzertních sekvencí nebo nadbytek nadšroubovicové topologie [46, 47].

DNA musí mít vysokou čistotu, kterou lze dosáhnout nákladným procesem čištění, purifikace. Čištění DNA je zahájeno lyzí buněk za účelem uvolnění genetického materiálu. Lýze lze provádět alkalickou, tepelnou nebo mechanickou cestou. Nejlevnější je použití tepelné metody využitím tepelných výměníků. Výtěžnost bez lysozymů je porovnatelná s alkalickou metodou. Dalším krokem je centrifugace nebo filtrace buněčného materiálu. Nedostatečné odstranění zbytku buněčného materiálu znečišťuje chromatografické kolony. Následuje precipitace pro rozdělení pevných látek od kapalin. K oddělení plazmidové DNA z původních struktur jako jsou proteiny, hostitelská genomová DNA a denaturované formy plazmidu. Jako další se aplikuje kationtový detergent cetyltrimethylamonium bromid. Dojde ke srážení neboli separaci pevných částí z roztoku. Následně je DNA rozpuštěna na určitou koncentraci a zároveň dochází k rozpuštění zbylých nečistot [35].

Genová kazeta obsahuje pDNA, v níž jsou začleněny geny izolovaného viru. Virus před začleněním do DNA pochází opakovaným pasážováním z myši. Po aplikaci vakcíny obsahující pouze jeden izolovaný typ viru, dochází v hostiteli k produkci monoklonálních protilátek třídy IgG2a (jedná se o podtřídu protilátky IgG2 produkované u myši). Po podání očkovací látky u člověka 25-300 mg je zjištěna koncentrace monoklonálních protilátek 3-5mg/l [48].

## **5.6 Další klinické využití DNA vakcín a srovnání s RNA vakcínami**

V současné době se od DNA vakcín očekává, že budou běžně používány jako prevence proti nejrůznějším onemocněním [19]. Z důvodu špatné imunogenicity nejsou tyto vakcíny



schváleny pro humánní použití [56]. Příkladem testovaných onemocnění je rakovina, alergie, autoimunitní a infekční nemoci. V současné době se věda zabývá především vývoje vakcinace proti rakovině a virovým infekcím (HIV, chřipka). Virus HIV byl využíván pro zkvalitnění vektoru vakcíny a pozitivní účinek byl prokázán silnou reakcí cytokinu produkovaného CD8+ T-lymfocytů [56]. První vakcína proti nádoru byla aplikována v roce 1998. Ve svém složení obsahovala nádorový antigen, který byl izolovaný z membrány specifického antigenu buněk prostaty. Pro transport bylo využito adeninového vektoru a jako adjuvans byl použit faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů. Následné snahy o vylepšení účinnosti vakcín se zaměřovaly především na funkčnost adjuvans [19].

Jak už bylo zmíněno v předešlých kapitolách, DNA vakcíny představují revoluční skupinu vakcín a to v principu imunizace, snadné a rychlé výroby, nenáročného skladování a bezpečnosti. Tyto vakcíny mají ale také své nedostatky a to především v aktivaci onkogenů a vyvolání tvorby protilátek anti-DNA včleněním plazmidové DNA do genomu vakcinovaného organismu. Jedná se tak o riziko vzniku autoimunitního anebo nádorového onemocnění. Dále může u pacientů neustále docházet ke stimulaci humorální imunitní odpovědi či intolerance imunologické tolerance k antigenu kódovaného v DNA. Další značná nevýhoda vakcín této skupiny je nízká imunologická odpověď, kterou je snaha zvýšit vývojem nových adjuvans a vektorů vakcín [51,52].

DNA vakcíny byly v roce 2020 testovány na případnou celosvětovou výrobu proti infekci virem koronaviru [53]. Geny vakcíny kodovaly antigenní determinantu tzv. spike protein [55]. Během testů bylo zjištěno, že u rizikových pacientů s perikarditidou se zvyšují hladiny cytokinů CD8+ T-lymfocytů a zároveň dochází ke snížení cytokinů regulačních T-lymfocytů, CD14+, HLA-DR+ a monocytů. V průběhu onemocnění tak dochází k nerovnováze imunitní odpovědi a zhoršení infekce. Mimo jiné může docházet u nemetylované sekvence plazmidové DNA k zesílené adaptivní imunitní odpovědi vůči exprimovaným antigenům [53]. Sekvence DNA ve vakcínách se na konkrétních místech upravují methylací. Jedná se o genetickou modifikaci za účelem zvýšení stability genomu. Té je dosaženo navázáním methylové skupiny do genomu a zhuštěním chromatinového vlákna [83].

V jiných studiích, zabývajících se využitím DNA vakcín proti infekci COVID-19, byly zaznamenány vedlejší účinky 1. stupně srovnatelné s povolenými vakcínami. Testy u pacientů prokázaly vyrovnanou buněčnou i humorální odpověď a současně došlo ke zvýšení titrů protilátek u zotavených pacientů [55].

Kromě DNA vakcín jsou momentálně na trhu dostupné také mRNA vakcíny a to především jako vakcinace proti infekci virem koronaviru. Jedná se o nově vznikající odvětví technologie přinášející mnoho výhod oproti DNA vakcínám. Jsou bezpečné a to i díky tomu, že genom RNA se nevčleňuje do DNA genomu buněk. Jedná se o strukturu RNA a zároveň vektory mRNA jsou biologicky odstranitelné. Studie ukázaly, že mRNA je schopná vyvolat silnou buněčnou i humorální odpověď [51,53]. Další nespornou výhodou je, že RNA nemusí putovat až do jádra buňky a váže se v cytosolu na ribozomech [53]. I výroba vakcíny jednodušší a časově nenáročná. Jedním z největších problémů je nestálost a degradace mRNA ubikvitními RNázami *in vitro* i *in vivo*. Zároveň i díky její nestabilitě jsou vakcíny náročné na distribuci. V podmínkách *in vivo* je další nevýhodou nedostatečný transport mRNA do cytosolu buňky, protože se mRNA nedostatečně rozpouští v buněčné membráně [51]. Účinnost mRNA vakcín byla testována i proti alergenům. RNA kódující určitý alergen prokazatelně vyvolala imunitní reakci pomocí pomahačských T-lymfocytů Th1, zatímco reakce na DNA vakcínu je vyvolána přes cytotoxické T-lymfocyty [52].

U vakcinace proti alergiím se používají jak plazmidové DNA vakcíny, tak i mRNA vakcíny, které kódují daný alergen. Nukleová kyselina alergenu je transkribována a prezentována T-lymfocytům. Využívá se imunitní odpovědi založené na pomocných Th1-lymfocytech a INF- $\gamma$  produkovaném CD4+ a CD8+ T-lymfocyty. Vakcínou lze aktivovat Th2-lymfocyty a zajistit tak tvorbu IL-4, IL-5, a IL-13. Cílem vakcinace je vytvoření specifické protilátky IgE proti alergenu [80].

Vývoj vakcín mRNA prochází rychlým vývojem. Existuje již několik prototypů vakcín proti nádorům a infekčním onemocněním podobně jako u DNA vakcín, avšak mRNA vykazuje lepší výsledky testů. Testy v USA během vakcinace populace proti COVID-19 ukázaly vysokou koncentraci protilátek již po první vyšší dávce vakcíny a po druhé dávce byly detekovány neutralizující protilátky v séru pacientů. Celkovou snahou je však zajistit dostatek účinných DNA i mRNA vakcín, potřebných pro další pandemie jako je COVID-19 [53].

DNA vakcíny obdržely certifikaci pro veterinární účely. Příkladem je vakcína proti infekční hematopoetické nekróze u ryb v roce 2005. Dále pak ve stejném roce přibyla licencovaná vakcína pro prevenci proti západonilskému viru u koní a později v roce 2010 v USA se mezi tyto vakcíny zařadila imunoterapeutická vakcína proti rakovině u psů. Poslední DNA vakcína byla licencovaná v roce 2016 proti virovému onemocnění slinivky břišní u lososů (virus lososího pankreatu) [54].

## ZÁVĚR

Tato bakalářská práce je věnována virům chřipky a DNA vakcíně proti chřipce. Chřipkové viry se obecně řadí mezi nebuněčné mikroorganismy spadající do čeledi *Orthomyxoviridae*. Způsobují onemocnění horních i dolních cest dýchacích, které může vyústit do stavu s těžkým průběhem a v některých případech končí i smrtí. Těžký průběh chřipky každoročně prodělá 3-5 milionů celosvětové populace. Rozlišují se dva typy chřipky v závislosti na množství mutací virových částic, na chřipku sezónní a pandemickou. Pandemická chřipka je obzvláště nebezpečná z důvodu její nepředvídatelnosti. Jedná o soubor hromadných mutací viru prostřednictvím antigenního shiftu a driftu. V minulosti se světem prohnalo hned několik chřipkových pandemií a vždy skončily tragicky. Jako nejúčinnější prevence vůči chřipkovým epidemiím a částečně i pandemiím je vakcinace.

Očkování si klade za cíl stimulovat imunitní systém člověka. Vakcinační dávka, dle povahy typu vakcíny, obsahuje specifický antigen viru, na který imunitní systém reaguje. Je tak spuštěna imunitní odpověď končící imunitní pamětí. Při opakovaném setkání se stejným antigenem dojde paměťovými buňkami k tvorbě specifické imunitní odpovědi, která je rychlejší a efektivnější než v případě prvního setkání antigenu s protilátkou. Vakcíny aplikované proti sezónní chřipce musí být pravidelně obnovovány v závislosti na konkrétním výskytu cirkulujícího chřipkového kmene. Výsledkem pak je sezónní ochrana populace před nadcházející chřipkovou epidemií. Aby však došlo ke změně účinné vakcíny, musí se daný virový kmen kultivovat a následně izolovat, než je zhotovena vakcinační látka. Tyto kroky odpadají v případě využití DNA vakcín.

DNA vakcíny jsou intenzivně vyvíjeny a je do nich vkládána velká naděje v rozsahu použití a snadnému aplikaci. Jedná se o vakcíny, jejichž základem je genetická informace daného viru navázaná na plazmidové vektory. Vakcína tak neobsahuje žádnou část patogenu, pouze jeho nukleovou kyselinu, která v příjemci vakcíny nevyvolá žádnou potencionální infekci. Z toho důvodu je prezentována jako bezpečnější a to i pro imunodeficientní jedince. Otázkou však zůstává, zdali se během replikace v jádře buňky člověka virová DNA nezačlení do lidské DNA a nenamnoží se. DNA vakcíny musí projít replikací, transkripcí i translací za účelem vytvoření antigenů, na které následně bude reagovat imunitní systém. DNA vakcíny byly testovány na infekční, nádorové a autoimunitní onemocnění a alergie. V budoucnu by ale společně s RNA vakcínami měly zcela nahradit dosavadní vakcíny.

## POUŽITÁ LITERATURA

- [1] KILBOURNE, EDWIN D. Influenza Pandemics of the 20th Century. *Emerging Infectious Diseases* [online]. 2006, 12.1.2006, 12(1), 9-14 [cit. 2021-02-17]. ISSN 1080-6040. Dostupné z: doi:10.3201/eid1201.051254
- [2] ROBERT A. SCHWARTZ, MD, MPH, DSc (HON), FRCP EDIN a RAJENDRA KAPILA. Pandemics throughout the centuries. *Clinics in Dermatology* [online]. New Jersey, USA, 2020, 12.6.2020, 2020(8,4), 4 [cit. 2021-02-17]. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2020.12.006
- [3] I. BARBERIS, P. MYLES, S.K. AULT, N.L. BRAGAZZI a M. MARTINI. History and evolution of influenza control through vaccination: from the first monovalent vaccine to universal vaccines. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene* [online]. Sep 2016, 2016(57(3), E115-E120 [cit. 2021-02-18]. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5139605/
- [4] R. GASPARINI, D. AMICIZIA, P.L. LAI a D. PANATTO. Influenza vaccination: from epidemiological aspects and advances in research to dissent and vaccination policies. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene* [online]. Mar 2016, 2016(57(1), E1-E4 [cit. 2021-02-18]. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4910436/
- [5] XIANGJIE SUN, JESSICA A.BELSERA, HUA YANG, et al. Identification of key hemagglutinin residues responsible for cleavage, acid stability, and virulence of fifth-wave highly pathogenic avian influenza A(H7N9) viruses. *Virology* [online]. 2019. Atlanta, GA, USA: Browse journal, 2019, s. 232-240 [cit. 2021-02-25]. ISSN 0042-6822. Dostupné z: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682219301874#fig6
- [6] KRAMMER, FLORIAN, GAVIN J. D. SMITH, RON A. M. FOUCHIER, et al. Influenza. *Nature Reviews Disease Primers* [online]. 2018, 4(1) [cit. 2021-02-28]. ISSN 2056-676X. Dostupné z: doi:10.1038/s41572-018-0002-y
- [7] LUO, MING. Influenza Virus Entry. *Viral Molecular Machines* [online]. Boston, MA: Springer US, 2012, 2012-11-8, s. 201-221 [cit. 2021-03-06]. Advances in Experimental Medicine and Biology. ISBN 978-1-4614-0979-3. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4614-0980-9\_9
- [8] CAULDWELL, ANNA V., JASON S. LONG, OLIVIER MONCORGÉ a WENDY S. BARCLAY. Viral determinants of influenza A virus host range. *Journal of General Virology* [online]. 2014, **95**(6), 1193-1210 [cit. 2021-03-06]. ISSN 0022-1317. Dostupné z: doi:10.1099/vir.0.062836-0
- [9] LONG, JASON S., BHAKTI MISTRY, STUART M. HASLAM a WENDY S. BARCLAY. Host and viral determinants of influenza A virus species specificity. *Nature Reviews Microbiology* [online]. 2019, **17**(2), 67-81 [cit. 2021-03-06]. ISSN 1740-1526. Dostupné z: doi:10.1038/s41579-018-0115-z

- [10] DUAN, Susu a Paul G. THOMAS. Balancing Immune Protection and Immune Pathology by CD8 T-Cell Responses to Influenza Infection. *Frontiers in Immunology* [online]. 2016, 7 [cit. 8.3. 2021n. 1.]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2016.00025
- [11] WEBSTER, ROBERT G. A ELENA A. GOVORKOVA. Continuing challenges in influenza. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. 2014, 1323(1), 115-139 [cit. 2021-03-11]. ISSN 00778923. Dostupné z: doi:10.1111/nyas.12462
- [12] KIM, HYUNSUH, ROBERT G. WEBSTER a RICHARD J. WEBBY. Influenza Virus: Dealing with a Drifting and Shifting Pathogen. *Viral Immunology* [online]. 2018, 31(2), 174-183 [cit. 2021-03-12]. ISSN 0882-8245. Dostupné z: doi:10.1089/vim.2017.0141
- [13] VEMULA, SAI, JIANGQIN ZHAO, JIKUN LIU, Xue WANG, SANTANU BISWAS a INDIRA HEWLETT. Current Approaches for Diagnosis of Influenza Virus Infections in Humans. *Viruses* [online]. 2016, 8(4) [cit. 2021-03-17]. ISSN 1999-4915. Dostupné z: doi:10.3390/v8040096
- [14] STUART HARRIS, C, WILSON SMITH a C. H. ANDREWES. THE INFLUENZA EPIDEMIC OF JANUARY-MARCH, 1939. *The Lancet* [online]. 1940, 235(6075), 205-211 [cit. 2021-03-28]. ISSN 01406736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(00)61133-9
- [15] M. PETRÁŠ. Očkovací látky. *Vakciny.net* [online]. M. Petráš, 2016, 27. 9. 2016 [cit. 2020-11-24]. Dostupné z: [https://www.vakciny.net/principy\\_ockovani/pr\\_02.html](https://www.vakciny.net/principy_ockovani/pr_02.html)
- [16] TROMBETTA, CLAUDIA MARIA, ELENA GIANCIECCHI a EMANUELE MONTOMOLI. *Influenza vaccines: Evaluation of the safety profile* [online]. 2017, 14(3), 657-670 [cit. 2021-04-02]. ISSN 2164-5515. Dostupné z: doi:10.1080/21645515.2017.1423153
- [17] WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Overview of technologies for the treatment of infectious and sharp waste from health care facilities* [online]. World Health Organization, 2019 [cit. 2021-04-02]. ISBN 978-92-4-151622-8. Dostupné z: [https://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/publications/technologies-for-the-treatment-of-infectious-and-sharp-waste/en/](https://www.who.int/water_sanitation_health/publications/technologies-for-the-treatment-of-infectious-and-sharp-waste/en/)
- [18] WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Influenza surveillance report* [online]. Geneva: World Health Organization, 2021 [cit. 2021-04-03]. Dostupné z: <https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoiYWU4YjUyN2YtMDBkOC00MGI1LTlhN2UtZGE5NTljY2E1ZThhIiwidCI6ImY2MTBjMGI3LWJkMjQtNGIzOS04MTBiLTNkYzI4MGFmYjU5MCI6ImMiOjh9>
- [19] HOBERNIK, DOMINIKA a MATTHIAS BROS. DNA Vaccines—How Far From Clinical Use? *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2018, 19(11) [cit. 2021-04-11]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms19113605
- [20] ANNA STACHYRA, ANNA GÓRA-SOCHACKA a AGNIESZKA SIRKO. DNA vaccines against influenza. *Acta Biochimica Polonica* [online]. 2014, 61(3), 515-522 [cit. 2021-04-12]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25210719/>

- [21] NOGALES, AITOR a LUIS MARTÍNEZ-SOBRIDO. Reverse Genetics Approaches for the Development of Influenza Vaccines. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2017, **18**(1) [cit. 2021-04-15]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms18010020
- [22] ELDERFIELD, RUTH A., MARIOS KOUTSAKOS, REBECCA FRISE, KONRAD BRADLEY, JONATHAN ASHCROFT, SHANHJAHAN MIAH, ANGIE LACKENBY a WENDY S. BARCLAY. NB protein does not affect influenza B virus replication in vitro and is not required for replication in or transmission between ferrets. *Journal of General Virology* [online]. 2016, **97**(3), 593-601 [cit. 2021-04-16]. ISSN 0022-1317. Dostupné z: doi:10.1099/jgv.0.000386
- [23] CHEN, H., M. ANGEL, W. LI, C. FINCH, A. S. GONZALEZ, T. SUTTON, J. SANTOS a D. R. PEREZ. All-in-One Bacmids: an Efficient Reverse Genetics Strategy for Influenza A Virus Vaccines. *Journal of Virology* [online]. 2014, **88**(17), 10013-10025 [cit. 2021-04-16]. ISSN 0022-538X. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.01468-14
- [24] ZHANG, NARU, BO-JIAN ZHENG, LU LU, YUSEN ZHOU, SHIBO JIANG a LANYING DU. Advancements in the development of subunit influenza vaccines. *Microbes and Infection* [online]. 2015, **17**(2), 123-134 [cit. 2021-04-17]. ISSN 12864579. Dostupné z: doi:10.1016/j.micinf.2014.12.006
- [25] BASTOLA, RAKESH, GYUBIN NOH, TAEKWANG KEUM, SANTOST BASHYAL, SEO, JAEWOONG a YEONSU OH. *Archives of Pharmacal Research* [online]. 2017, **40**(11) [cit. 2021-04-17]. ISSN 0253-6269. Dostupné z: doi:10.1007/s12272-017-0969-z
- [26] MILENA VRANÁ. Polymorphism of Major Histocompatibility System of Man - Its Function, Indication, Detection and Interpretation. *Chemické listy* [online]. 2014, January 2015, 2015(109), 45-50 [cit. 2021-03-02]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2015\\_01\\_45-50.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2015_01_45-50.pdf)
- [27] STACHYRA, ANNA, PATRYCJA REDKIEWICZ, PIOTR KOSSON, ANNA PROTASIUK, Anna GÓRA-SOCHACKA, GRZEGORZ KUDLA a AGNIESZKA SIRKO. Codon optimization of antigen coding sequences improves the immune potential of DNA vaccines against avian influenza virus H5N1 in mice and chickens. *Virology Journal* [online]. 2016, **13**(1) [cit. 2021-04-21]. ISSN 1743-422X. Dostupné z: doi:10.1186/s12985-016-0599-y
- [28] MAURO, VINCENT P. a STEPHEN A. CHAPPELL. A critical analysis of codon optimization in human therapeutics. *Trends in Molecular Medicine* [online]. 2014, **20**(11), 604-613 [cit. 2021-04-21]. ISSN 14714914. Dostupné z: doi:10.1016/j.molmed.2014.09.003
- [29] BOHLIN, JON a JOHN H.-O. PETERSSON. Evolution of Genomic Base Composition: From Single Cell Microbes to Multicellular Animals. *Computational and Structural Biotechnology Journal* [online]. 2019, **17**, 362-370 [cit. 2021-04-23]. ISSN 20010370. Dostupné z: doi:10.1016/j.csbj.2019.03.001

- [30] DEWAR, JAMES M. a JOHANNES C. WALTER. Mechanisms of DNA replication termination. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. 2017, **18**(8), 507-516 [cit. 2021-04-23]. ISSN 1471-0072. Dostupné z: doi:10.1038/nrm.2017.42
- [31] DEVER, THOMAS E., JONATHAN D. DINMAN a RACHEL GREEN. Translation Elongation and Recoding in Eukaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. 2018, **10**(8) [cit. 2021-04-23]. ISSN 1943-0264. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a032649
- [32] SHANDILYA, JAYASHA a STEFAN G.E. ROBERTS. The transcription cycle in eukaryotes: From productive initiation to RNA polymerase II recycling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* [online]. 2012, **1819**(5), 391-400 [cit. 2021-04-23]. ISSN 18749399. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbagr.2012.01.010
- [33] RICHARDS, ADAIR D. a ALSON RODGER. Synthetic metallomolecules as agents for the control of DNA structure. *Chem. Soc. Rev* [online]. 2007, **36**(3), 471-483 [cit. 2021-4-26]. ISSN 0306-0012. Dostupné z: doi:10.1039/B609495C
- [35] JOSEFSBERG, JESSICA O. a BARRY BUCKLAND. Vaccine process technology. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. 2012, **109**(6), 1443-1460 [cit. 2021-4-26]. ISSN 00063592. Dostupné z: doi:10.1002/bit.24493
- [36] RAUCH, SUSANNE, EDITH JASNY, KIM E. SCHMIDT a BENJAMIN PETSCH. New Vaccine Technologies to Combat Outbreak Situations. *Frontiers in Immunology* [online]. 2018, **9** [cit. 2021-4-26]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2018.01963
- [37] ELLIOTT, SARAH T. C., NICOLE L. KALLEWAARD, EBONY BENJAMIN, et al. DmAb inoculation of synthetic cross reactive antibodies protects against lethal influenza A and B infections. *Npj Vaccines* [online]. 2017, **2**(1) [cit. 2021-4-27]. ISSN 2059-0105. Dostupné z: doi:10.1038/s41541-017-0020-x
- [38] SUSCHAK, JOHN J., JAMES A. WILLIAMS a CONNIE S. SCHMALJOHN. *Advancements in DNA vaccine vectors, non-mechanical delivery methods, and molecular adjuvants to increase immunogenicity* [online]. 2017, **13**(12), 2837-2848 [cit. 2021-4-27]. ISSN 2164-5515. Dostupné z: doi:10.1080/21645515.2017.1330236
- [39] LI, LEI a NIKOLAI PETROVSKY. Molecular mechanisms for enhanced DNA vaccine immunogenicity. *Expert Review of Vaccines* [online]. 2015, **15**(3), 313-329 [cit. 2021-5-5]. ISSN 1476-0584. Dostupné z: doi:10.1586/14760584.2016.1124762
- [40] TREGONING, JOHN S., RYAN F. RUSSELL a EKATERINA KINNEAR. *Adjuvanted influenza vaccines* [online]. 2017, **14**(3), 550-564 [cit. 2021-5-6]. ISSN 2164-5515. Dostupné z: doi:10.1080/21645515.2017.1415684
- [41] APOSTÓLICO, JULIANA DE SOUZA, VICTÓRIA ALVES SANTOS LUNARDELLI, FERNANDA CAROLINE COIRADA, SILVIA BEATRIZ BOSCARDIN a DANIELA SANTORO ROSA. Adjuvants: Classification, Modus Operandi and Licensing. *Journal of Immunology Research* [online]. 2016, **2016**, 1-16 [cit. 2021-5-6]. ISSN 2314-8861. Dostupné z: doi:10.1155/2016/1459394

- [42] SHI, SHUTING, HAORU ZHU, XINYU XIA, ZHIHUI LIANG, XUEHU MA a BINGBING SUN. Vaccine adjuvants: Understanding the structure and mechanism of adjuvanticity. *Vaccine* [online]. 2019, 37(24), 3167-3178 [cit. 2021-5-7]. ISSN 0264410X. Dostupné z: doi:10.1016/j.vaccine.2019.04.055
- [43] JALAH, RASHMI, VAINAV PATEL, VIRAJ KULKARNI, et al. *IL-12 DNA as molecular vaccine adjuvant increases the cytotoxic T cell responses and breadth of humoral immune responses in SIV DNA vaccinated macaques* [online]. 2014, 8(11), 1620-1629 [cit. 2021-5-7]. ISSN 2164-5515. Dostupné z: doi:10.4161/hv.21407
- [44] SICARD, TAYLOR, AUDREY KASSARDJIAN a JEAN-PHILIPPE JULIEN. B cell targeting by molecular adjuvants for enhanced immunogenicity. *Expert Review of Vaccines* [online]. 2020, 19(11), 1023-1039 [cit. 2021-5-7]. ISSN 1476-0584. Dostupné z: doi:10.1080/14760584.2020.1857736
- [45] LIM, MICHAEL, ABU ZAYED Md BADRUDDOZA, JANNATUL FIRDOUS, MOHAMMAD AZAD, ADNAN MANNAN, TASLIM AHMED AL-HILAL, CHONG-SU CHO a MOHAMMAD ARIFUL ISLAM. Engineered Nanodelivery Systems to Improve DNA Vaccine Technologies. *Pharmaceutics* [online]. 2020, 12(1) [cit. 2021-5-5]. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics12010030
- [46] GONÇALVES, GEISA A.L., KRISTALA L.J. PRATHER, GABRIEL A. MONTEIRO, AARON E. CARNES a DUARTE M.F. PRAZERES. Plasmid DNA production with *Escherichia coli* GALG20, a *pgi*-gene knockout strain: Fermentation strategies and impact on downstream processing. *Journal of Biotechnology* [online]. 2014, 186, 119-127 [cit. 2021-5-13]. ISSN 01681656. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbiotec.2014.06.008
- [47] WANG, YU, LIANG ZHANG, WEI ZHANG, HAO WU, XIAO MING ZHU, YUAN JI XU, JIN QI YAN a JI YUN YU. *Increasing plasmid-based DNA vaccine construct (16 kb pSVK-HBVA) production in Escherichia coli XL10-Gold through optimization of media component* [online]. 2014, 29(1), 164-174 [cit. 2021-5-13]. ISSN 1310-2818. Dostupné z: doi:10.1080/13102818.2014.989103
- [48] ANDREWS, CHASITY D., YANG LUO, MING SUN, et al. *In Vivo Production of Monoclonal Antibodies by Gene Transfer via Electroporation Protects against Lethal Influenza and Ebola Infections* [online]. 2017, 7, 74-82 [cit. 2021-5-14]. ISSN 23290501. Dostupné z: doi:10.1016/j.omtm.2017.09.003
- [49] The immune system and immunisation. *The immunisation Advisory Centre* [online]. The University of Auckland: Kodaweb, 2020, 2020 [cit. 2021-5-19]. Dostupné z: <https://www.immune.org.nz/immunisation/immune-system-vaccination>
- [50] How does the human body fight a viral infection? *OpenLearn: Free Learning from The Open University* [online]. United Kingdom: OpenLearn, 2020, 25.9. 2020 [cit. 2021-5-19]. Dostupné z: <https://www.open.edu/openlearn/science-maths-technology/biology/how-does-the-human-body-fight-viral-infection>
- [51] PARK, KYUNG SOO, XIAQI SUN, MARISA E. AIKINS a JAMES J. MOON. Non-viral COVID-19 vaccine delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online].



2021, **169**, 137-151 [cit. 2021-5-24]. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2020.12.008

[52] ULMER, JEFFREY B., PETER W. MASON, ANDREW GEALL a CHRISTIAN W. MANDL. RNA-based vaccines. *Vaccine* [online]. 2012, **30**(30), 4414-4418 [cit. 2021-5-24]. ISSN 0264410X. Dostupné z: doi:10.1016/j.vaccine.2012.04.060

[53] SILVEIRA, MARCELLE MOURA, Gustavo Marçal Schmidt Garcia MOREIRA a Marcelo MENDONÇA. DNA vaccines against COVID-19: Perspectives and challenges. *Life Sciences* [online]. 2021, **267** [cit. 2021-5-24]. ISSN 00243205. Dostupné z: doi:10.1016/j.lfs.2020.118919

[54] LIU. A Comparison of Plasmid DNA and mRNA as Vaccine Technologies. *Vaccines* [online]. 2019, **7**(2) [cit. 2021-5-24]. ISSN 2076-393X. Dostupné z: doi:10.3390/vaccines7020037

[55] TEBAS, PABLO, SHUPING YANG, JEAN D. BOYER, et al. Safety and immunogenicity of INO-4800 DNA vaccine against SARS-CoV-2: A preliminary report of an open-label, Phase 1 clinical trial. *EClinicalMedicine* [online]. 2021, **31** [cit. 2021-5-25]. ISSN 25895370. Dostupné z: doi:10.1016/j.eclinm.2020.100689

[56] CHAPMAN, ROSAMUND a EDWARD P. RYBICKI. Use of a Novel Enhanced DNA Vaccine Vector for Preclinical Virus Vaccine Investigation. *Vaccines* [online]. 2019, **7**(2) [cit. 2021-5-25]. ISSN 2076-393X. Dostupné z: doi:10.3390/vaccines7020050

[57] CAMPBELL, KERRY S. a JUN HASEGAWA. Natural killer cell biology: An update and future directions. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [online]. 2013, **132**(3), 536-544 [cit. 2021-6-23]. ISSN 00916749. Dostupné z: doi:10.1016/j.jaci.2013.07.006

[58] XING, ZHOU, SAM AFKHAMI, JEGARUBEE BAVANANTHASIVAM, DOMINIK K. FRITZ, MICHAEL R. D'AGOSTINO, MARYAM VASEGHI-SHANJANI, YUSHI YAO a MANGALAKUMARI JEYANATHAN. Innate immune memory of tissue-resident macrophages and trained innate immunity: Re-vamping vaccine concept and strategies. *Journal of Leukocyte Biology* [online]. 2020, **108**(3), 825-834 [cit. 2021-6-23]. ISSN 0741-5400. Dostupné z: doi:10.1002/JLB.4MR0220-446R

[59] HEMANN, EMILY A., SANG-MOO KANG a KEVIN L. LEGGE. Protective CD8 T Cell-Mediated Immunity against Influenza A Virus Infection following Influenza Virus-like Particle Vaccination. *The Journal of Immunology* [online]. 2013, **191**(5), 2486-2494 [cit. 2021-3-80]. ISSN 0022-1767. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.1300954

[60] NÜSSING, SIMONE, SNEHA SANT, MARIOS KOUTSAKOS, KANTA SUBBARAO, THI H. O. NGUYEN a KATHERINE KEDZIERSKA. Innate and adaptive T cells in influenza disease. *Frontiers of Medicine* [online]. 2018, **12**(1), 34-47 [cit. 2021-3-80]. ISSN 2095-0217. Dostupné z: doi:10.1007/s11684-017-0606-8

[61] DOTIWALA, FAROKH, SACHIN MULIK, RAFAEL B POLIDORO, JAMES A ANSARA, BARBARA A BURLEIGH, MICHAEL WALCH, RICARDO T GAZZINELLI a JUDY LIEBERMAN. Killer lymphocytes use granulysin, perforin and granzymes to kill

intracellular parasites. *Nature Medicine* [online]. 2016, **22**(2), 210-216 [cit. 2021-3-80]. ISSN 1078-8956. Dostupné z: doi:10.1038/nm.4023

[62] TAKAKI, HIROMI, SHINGO ICHIMIYA, MISAKO MATSUMOTO a TSUKASA SEYA. Mucosal Immune Response in Nasal-Associated Lymphoid Tissue upon Intranasal Administration by Adjuvants. *Journal of Innate Immunity* [online]. 2018, **10**(5-6), 515-521 [cit. 2021-3-90]. ISSN 1662-811X. Dostupné z: doi:10.1159/000489405

[63] EDINGER, THOMAS O., MARIE O. POHL a SILKE STERTZ. Entry of influenza A virus: host factors and antiviral targets. *Journal of General Virology* [online]. 2014, **95**(2), 263-277 [cit. 2021-3-90]. ISSN 0022-1317. Dostupné z: doi:10.1099/vir.0.059477-0

[64] COETZER, ANDRE, CLAUDE T. SABETA, WANDA MARKOTTER, CHARLES E. RUPPRECHT, LOUIS H. NEL a JAKOB ZINSSTAG. Comparison of Biotinylated Monoclonal and Polyclonal Antibodies in an Evaluation of a Direct Rapid Immunohistochemical Test for the Routine Diagnosis of Rabies in Southern Africa. *PLoS Neglected Tropical Diseases* [online]. 2014, **8**(9) [cit. 2021-3-17]. ISSN 1935-2735. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pntd.0003189

[65] MORRISON, BRIAN J., NICHOLAS J. MARTIN, TAUSEEF REHMAN, et al. Influence of sample collection tube method, anticoagulant-containing plasma versus serum, on influenza virus hemagglutination inhibition titer and microneutralization titer serological assays. *BMC Health Services Research* [online]. 2018, **18**(1) [cit. 2021-3-17]. ISSN 1472-6963. Dostupné z: doi:10.1186/s12913-018-3465-3

[66] LIU, JIKUN, JIANGQIN ZHAO, PETER PETROCHENKO, JIWEN ZHENG a INDIRA HEWLETT. Sensitive detection of influenza viruses with Europium nanoparticles on an epoxy silica sol-gel functionalized polycarbonate-polydimethylsiloxane hybrid microchip. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2016, **86**, 150-155 [cit. 2021-3-17]. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2016.06.044

[67] HENRITZI, DINAH, BERND HOFFMANN, SILKE WACHECK, STEFAN PESCH, GEORG HERRLER, MARTIN BEER a TIMM C. HARDER. A newly developed tetraplex real-time RT-PCR for simultaneous screening of influenza virus types A, B, C and D. *Influenza and Other Respiratory Viruses* [online]. 2019, **13**(1), 71-82 [cit. 2021-3-17]. ISSN 17502640. Dostupné z: doi:10.1111/irv.12613

[68] BOONHAM, NEIL, JAN KREUZE, STEPHAN WINTER, RENÉ VAN DER VLUGT, JAN BERGERVOET, JENNY TOMLINSON a RICK MUMFORD. Methods in virus diagnostics: From ELISA to next generation sequencing. *Virus Research* [online]. 2014, **186**, 20-31 [cit. 2021-3-17]. ISSN 01681702. Dostupné z: doi:10.1016/j.virusres.2013.12.007

[69] GHEBREHEWET, SAM, PETER MACPHERSON a ANTONIA HO. Influenza. *BMJ* [online]. [cit. 2021-3-19]. ISSN 1756-1833. Dostupné z: doi:10.1136/bmj.i6258

[70] ISON, MICHAEL G. Antiviral Treatments. *Clinics in Chest Medicine* [online]. 2017, **38**(1), 139-153 [cit. 2021-3-19]. ISSN 02725231. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccm.2016.11.008

- [71] BENTON, DONALD J., ANDREA NANS, LESLEY J. CALDER, et al. Influenza hemagglutinin membrane anchor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2018, **115**(40), 10112-10117 [cit. 2021-3-6]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1810927115
- [72] BYRD-LEOTIS, LAUREN, RICHARD D. CUMMINGS a DAVID A. STEINHAEUER. The Interplay between the Host Receptor and Influenza Virus Hemagglutinin and Neuraminidase. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2017, **18**(7) [cit. 2021-3-6]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms18071541
- [73] KRUG, ROBERT M. Functions of the influenza A virus NS1 protein in antiviral defense. *Current Opinion in Virology* [online]. 2015, **12**, 1-6 [cit. 2021-3-7]. ISSN 18796257. Dostupné z: doi:10.1016/j.coviro.2015.01.007
- [74] WANG, RUIFANG, YINXING ZHU, CHENWEI REN, SHUAIKE YANG, SHAN TIAN, HUANCHUN CHEN, MEILIN JIN a HONGBO ZHOU. Influenza A virus protein PB1-F2 impairs innate immunity by inducing mitophagy. *Autophagy* [online]. 2021, **17**(2), 496-511 [cit. 2021-3-7]. ISSN 1554-8627. Dostupné z: doi:10.1080/15548627.2020.1725375
- [75] TE VELTHUIS, AARTJAN J. W. a ERVIN FODOR. Influenza virus RNA polymerase: insights into the mechanisms of viral RNA synthesis. *Nature Reviews Microbiology* [online]. 2016, **14**(8), 479-493 [cit. 2021-3-19]. ISSN 1740-1526. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro.2016.87
- [76] EISFELD, AMIE J., GABRIELE NEUMANN a YOSHIHIRO KAWAOKA. At the centre: influenza A virus ribonucleoproteins. *Nature Reviews Microbiology* [online]. 2015, **13**(1), 28-41 [cit. 2021-3-19]. ISSN 1740-1526. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro3367
- [77] ROOT, J. JEFFREY, ANGELA M. BOSCO-LAUTH, HELLE BIELEFELDT-OHMANN a RICHARD A. BOWEN. Experimental infection of peridomestic mammals with emergent H7N9 (A/Anhui/1/2013) influenza A virus: Implications for biosecurity and wet markets. *Virology* [online]. 2016, **487**, 242-248 [cit. 2021-3-20]. ISSN 00426822. Dostupné z: doi:10.1016/j.virol.2015.10.020
- [78] LI, JUAN, MIN GU, KAITUO LIU, et al. Amino acid substitutions in antigenic region B of hemagglutinin play a critical role in the antigenic drift of subclade 2.3.4.4 highly pathogenic H5NX influenza viruses. *Transboundary and Emerging Diseases* [online]. 2019, **67**(1), 263-275 [cit. 2021-3-11]. ISSN 1865-1674. Dostupné z: doi:10.1111/tbed.13347
- [79] PARK, JI-EUN a YEONHEE RYU. Transmissibility and severity of influenza virus by subtype. *Infection, Genetics and Evolution* [online]. 2018, **65**, 288-292 [cit. 2021-3-11]. ISSN 15671348. Dostupné z: doi:10.1016/j.meegid.2018.08.007
- [80] SCHEIBLHOFER, SANDRA, JOSEF THALHAMER a RICHARD WEISS. DNA and mRNA vaccination against allergies. *Pediatric Allergy and Immunology* [online]. 2018, **29**(7), 679-688 [cit. 2021-7-1]. ISSN 09056157. Dostupné z: doi:10.1111/pai.12964
- [81] KODÍČEK, MILAN, OLGA VALENTOVÁ a RADOVAN HYNEK. Biochemie chemický pohled na biologický svět. *Biochemie chemický pohled na biologický svět*. 2. přepracované vydání. Praha: VUT, 2018, s. 177-180. ISBN 978-80-7592-013-3.

[82] NIEZOLD, THOMAS, MICHAEL STORCKSDIECK GENANNT BONSMANN, ANDRÉ MAASKE, et al. DNA vaccines encoding DEC205-targeted antigens: immunity or tolerance? *Immunology* [online]. 2015, **145**(4), 519-533 [cit. 2021-7-1]. ISSN 00192805. Dostupné z: doi:10.1111/imm.12467

[83] HANNON, EILIS, OLIVIA KNOX, KAREN SUGDEN, et al. Characterizing genetic and environmental influences on variable DNA methylation using monozygotic and dizygotic twins. *PLOS Genetics* [online]. 2018, **14**(8) [cit. 2021-7-1]. ISSN 1553-7404. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pgen.1007544