

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2024

Barbora Štěchová

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

Barbora Štěchová

Studijní obor: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví

**SLEDOVÁNÍ POSTVAKCINAČNÍ ODPOVĚDI U
PACIENTŮ S IMUNOSUPRESÍ**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Ing. Bc. Tomáš Vlas

PLZEŇ 2024

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a samostatně a všechny použité prameny jsem uvedl/a v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 28. 3. 2024.

.....

vlastnoruční podpis

Abstrakt

Příjmení a jméno: Barbora Štěchová

Katedra: Záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Sledování postvakcinační odpovědi u pacientů s imunosupresí

Vedoucí práce: Ing. Bc. Tomáš Vlas

Počet stran – číslované: 59

Počet stran – nečíslované: 33

Počet příloh: 3

Počet titulů použité literatury: 80

Klíčová slova: T-lymfocyty, imunosuprese, postvakcinační odpověď, průtoková cytometrie, covid-19

Souhrn:

Tato bakalářská práce je rozdělena na teoretickou a praktickou část. V teoretické části jsou sumarizovány metody, jimiž lze v klinické praxi hodnotit reakce imunitního systému navozené po proběhlém očkování. Tyto metody jsou rozděleny podle toho, jestli sledují humorální nebo buněčnou složku specifické imunitní odpovědi. Praktická část je zaměřena zejména na buněčnou složku specifické imunity. Tato práce porovnává postvakcinační imunitní odpověď T-lymfocytů zdravých a imunosuprimovaných jedinců.

Abstract

Surname and name: Barbora Štěchová

Department: Department of Rescue Services, Diagnostic Fields and Public Health

Title of thesis: Post-vaccination response monitoring in immunosuppressed patients

Consultant: Ing. Bc. Tomáš Vlas

Number of pages – numbered: 59

Number of pages – unnumbered: 33

Number of appendices: 3

Number of literature items used: 80

Keywords: T-lymphocytes, immunosuppression, post-vaccination response, flow cytometry, covid-19

Summary:

This bachelor thesis is divided into theoretical and practical parts. The theoretical part summarizes the methods that can be used in clinical practice to evaluate the immune system reactions induced after vaccination. These methods are divided according to whether they monitor the humoral or cellular component of the specific immune response. The practical part focuses mainly on the cellular component of specific immunity. This work compares the post-vaccination immune response of T-lymphocytes from healthy and immunosuppressed individuals.

Předmluva

Při rozhodování o tématu mé bakalářské práce jsem se snažila najít oblast, která by byla nejen zajímavá, ale i aktuální, a ne zcela probádaná. Ještě před nedávnou dobou světem zmítala pandemie covidu-19, kterou způsobil nový lidský virus SARS-CoV-2. Tato situace vyvolala ve světě spousty otázek a značné obavy. Asi nejvíce obav a otázek panovalo kolem očkování a rychle vyvinutých vakcín proti tomuto onemocnění. Diskutovalo se, zda je očkování bezpečné a zda má nějaký smysl. Nejdříve jsem chtěla svou práci zaměřit na sledování nežádoucích reakcí po očkování těmito vakcínami, avšak po konzultaci s mým vedoucím bakalářské práce Ing. Bc. Tomášem Vlasem jsme se rozhodli téma zaměřit jiným směrem. Stále se zabýváme otázkou, zda má vakcinace proti SARS-CoV-2 smysl, avšak nikoli po stránce bezpečnosti, ale po stránce účinnosti, a to zejména u pacientů jejichž imunitní systém je oslaben, a proto tvoří nejrizikovější skupinu, kterou je třeba chránit.

Poděkování

Tímto bych chtěla velmi poděkovat svému vedoucímu Ing. Bc. Tomáši Vlasovi, který mi pomohl s výběrem tématu a dával mi cenné rady. Zároveň bych mu ráda poděkovala i za jeho ochotu, trpělivost a čas, který mi věnoval po dobu zpracovávání této práce. Dále bych ráda poděkovala Ústavu imunologie a alergologie FN Plzeň za umožnění vypracování praktické části. Nakonec bych svůj dík chtěla věnovat i své rodině, přátelům a partnerovi za jejich podporu při psaní této práce.

OBSAH

SEZNAM GRAFŮ	11
SEZNAM OBRÁZKŮ	12
SEZNAM TABULEK	13
SEZNAM ZKRATEK	14
ÚVOD.....	18
TEORETICKÁ ČÁST	19
1 OČKOVÁNÍ A POSTVAKCINAČNÍ ODPOVĚĎ	19
1.1 Imunitní reakce	19
1.2 Typy očkovacích vakcín	20
1.3 Vnější projev postvakcinační odpovědi a možné nežádoucí účinky	22
2 IMUNOSUPRESE.....	23
2.1 Imunosupresiva	23
2.2 Očkování u imunosuprimovaných pacientů	24
2.3 Význam vyšetření postvakcinační odpovědi	24
3 COVID-19	25
3.1 Původce.....	25
3.2 Klinický průběh	25
3.3 Přenos.....	26
3.4 Princip očkování a typy očkovacích vakcín	26
4 METODY SLEDOVÁNÍ POSTVAKCINAČNÍ ODPOVĚDI HUMORÁLNÍ SLOŽKY IMUNITY	28
4.1 ELFO	28
4.2 Aglutinace	29
4.3 Radiální imunodifúze.....	29
4.4 Nefelometrie a turbidimetrie.....	29
4.5 Imunoanalýza se značenými protilátkami – RIA a EIA	30
4.6 Imunoanalýza se značenými protilátkami – ELISA	31
4.7 Imunoanalýza se značenými protilátkami – LIA	32
4.8 Imunoanalýza se značenými protilátkami – ECLIA.....	32
4.9 Imunoanalýza se značenými protilátkami – FIA	33
4.10 Průtoková cytometrie	34
4.11 Virus neutralizační test a test neutralizace pseudoviru	35
4.12 Komplement fixační test	36
4.13 Multiplexové metody	36
4.13.1 Planární mikroarray – proteinové čipy	37
4.13.2 Multiplexové reakce na mikrokuličkách – Bead Arrays	37

4.13.3	Microblot-Array	38
4.14	Biosenzorové metody	39
4.14.1	LFIA	39
4.14.2	Elektrochemické imunosenzory	40
4.15	Interpretace výsledků	40
5	METODY SLEDOVÁNÍ POSTVAKCINAČNÍ ODPOVĚDI BUNĚČNÉ SLOŽKY IMUNITY	41
5.1	Separace a izolace buněk	41
5.1.1	Gradientová centrifugace.....	41
5.1.2	Izolace lymfocytů a monocytů	42
5.1.3	Imunodenzní separace T-lymfocytů	42
5.1.4	Sedimentace.....	42
5.1.5	Imunomagnetická separace (MACS).....	42
5.1.6	Separace pomocí průtokové cytometrie (FASC).....	43
5.2	Průtoková cytometrie	43
5.2.1	Stanovení povrchových znaků – Imunofenotypizace	45
5.2.2	Detekce intracelulárních cytokinů	45
5.2.3	Blastická transformace	45
5.3	Test blastické transformace bez využití průtokové cytometrie	46
5.4	Cytotoxické testy	46
5.5	ELISPOT	47
5.6	IGRA testy	48
5.7	Multiplexní stanovení cytokinů a chemokinů.....	48
5.8	PCR.....	49
5.8.1	RT-PCR	49
5.8.2	qPCR.....	49
5.9	Interpretace výsledků	50
	PRAKTICKÁ ČÁST	51
6	CÍL A ÚKOLY PRÁCE	51
6.1	Hlavní cíl.....	51
6.2	Dílčí cíle.....	51
7	VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY	52
8	CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU	53
9	METODIKA PRÁCE	54
9.1	Příprava vzorků ke kryokonzervaci	54
9.1.1	Separace na hustotním gradientu.....	54
9.1.2	Zamrazení	54

9.2	Rozmražení kryokonzervovaných vzorků	54
9.3	Test buněčnosti a životnosti.....	55
9.4	Kultivace	55
9.5	Značení antigenních determinant po nespecifické stimulaci	55
9.6	Značení antigenních determinant po specifické stimulaci	56
9.7	Stanovení vzorků sledovaného souboru před a po očkování	57
9.7.1	Rozmražení kryokonzervovaných vzorků	57
9.7.2	Test buněčnosti a životnosti	58
9.7.3	Kultivace.....	58
9.7.4	Značení antigenních determinant.....	58
9.8	Pomůcky a reagentie využívané během stanovení.....	59
9.8.1	Přístroje.....	59
9.8.2	Reagentie.....	60
9.8.3	Spotřební materiál	61
10	ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ	62
10.1	Stanovení na průtokovém cytometru.....	62
10.1.1	Gatovací strategie	62
10.2	Statistické zhodnocení.....	64
10.2.1	Výsledky stanovení exprese znaku CD3	64
10.2.2	Výsledky stanovení exprese znaku CD4	65
10.2.3	Výsledky stanovení exprese znaku CD8	66
10.2.4	Výsledky stanovení exprese znaků CD 4 a CD 45RO	67
10.2.5	Výsledky stanovení exprese znaků CD8 a CD45RO	68
10.2.6	Výsledky stanovení exprese znaků CD3 a IFN γ	69
10.2.7	Výsledky stanovení exprese znaků CD 3 a CD 69	70
10.2.8	Výsledky stanovení exprese znaků CD3 a CD 45RO, C27, CD107a	71
10.2.9	Výsledky stanovení exprese znaků CD3 a Ki67	72
10.2.10	Výsledky stanovení exprese znaků CD3 a CD137	73
	DISKUZE	74
	ZÁVĚR.....	77
	SEZNAM LITERATURY	78
	SEZNAM PŘÍLOH	88
	PŘÍLOHY	89
	Příloha 1 – Povolení sběru informací ve FN Plzeň	89
	Příloha 2 – Gatovací strategie analýzy proliferačního profilu	90
	Příloha 3 – Gatovací strategie analýzy cytokinového profilu	92

SEZNAM GRAFŮ

Graf č. 1: Stanovení T-lymfocytární populace pomocí exprese znaku CD3.....	64
Graf č. 2: Stanovení subpopulace pomocných T-lymfocytů.....	65
Graf č. 3: Stanovení subpopulace cytotoxických T-lymfocytů.....	66
Graf č. 4: Stanovení subpopulace pomocných paměťových T-lymfocytů.....	67
Graf č. 5: Stanovení subpopulace cytotoxických paměťových T-lymfocytů.....	68
Graf č. 6: Stanovení populace T-lymfocytů produkujících INF- γ	69
Graf č. 7: Stanovení populace T-lymfocytů exprimujících aktivační znak CD 69	70
Graf č. 8: Stanovení populace funkčně vyvrálých T-lymfocytů exprimujících znak CD107a	71
Graf č. 9: Stanovení populace T-lymfocytů produkujících proliferační faktor Ki67.....	72
Graf č. 10: Stanovení populace antigenně specifických T-lymfocytů	73

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č. 1: Gatování populace lymfocytů při analýze proliferačního panelu.....	62
Obrázek č. 2: Gatování populace lymfocytů při analýze cytokinového panelu.....	62
Obrázek č. 3: Gatování populace T-lymfocytů při analýze proliferačního panelu	63
Obrázek č. 4: Gatování populace T-lymfocytů při analýze cytokinového panelu.....	63
Obrázek č. 5: Gatování CD4+ a CD8+ subpopulace T-lymfocytů při analýze proliferačního panelu	63
Obrázek č. 6 : Gatování CD4+ a CD8+ subpopulace T-lymfocytů při analýze cytokinového panelu	63

SEZNAM TABULEK

Tabulka č. 1: Monoklonální protilátky využité při značení antigenních determinant po nespecifické stimulaci.....	56
Tabulka č. 2: Monoklonální protilátky využité při značení antigenních determinant po specifické stimulaci – proliferační profil.....	57
Tabulka č. 3: Monoklonální protilátky využité při značení antigenních determinant po specifické stimulaci – cytokinový profil	57
Tabulka č. 4: Monoklonální protilátky využité při značení antigenních determinant při stanovení vzorků sledovaného souboru – proliferační profil	58
Tabulka č. 5: Monoklonální protilátky využité při značení antigenních determinant při stanovení vzorků sledovaného souboru – cytokinový profil	59

SEZNAM ZKRATEK

°C	Stupeň Celsia
Ab	Protilátka
ACE	Angiotensin-konvertující enzym 2
Ag	Antigen
Ag-Ab	Imunokomplex Antigen-Protilátka
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
Al(OH) ₃	Hydroxid hlinitý
AlPO ₄	Fosforečnan hlinitý
APC	Antigen prezentující buňka
BCIP/NBT	5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate/nitro blue tetrazolium
BCR	B-buněčný receptor
CD.....	Cluster of differentiation
cDNA.....	Komplementární DNA
CFSE.....	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CLIA.....	Chemiluminiscenční imunoanalýza
CO ₂	Oxid uhličitý
COVID-19	Coronavirus disease 2019
CRP.....	C reaktivní protein
DELFLIA	Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluoroimmunoassay
DMSO.....	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EIA	Enzymoimunoanalýza

ELFO Elektroforéza

ELISA..... Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

ELISpot..... Enzyme Linked Immuno Spot Assay

FASC Fluorescent Activated Cell Separation

FBS Fetal bovine serum

FIA..... Fluorescenční imunoanalýza

FITC Fluorescein isothiocyanate

FLUOROSpot..... Fluorescenční ELISpot

FPIA Fluorescence Polarization Immunoassay

FSc..... Forward scatter

HLA Hlavní histokompatibilní komplex

Ig Immunoglobulin

IGRA Interferon- γ Release Assay

IL Interleukin

INF γ Interferon gama

LFIA Lateral Flow Immunoassay

LIA Luminiscenční imunoanalýza

MACS..... Magnetic Activated Cell Sorting

ml Mililitr

mol/l..... Jednotka molární koncentrace

mRNA..... Messenger RNA

NTD N-terminal domain

PBMC..... Peripheral Blood Mononuclear Cells

PBS..... Phosphate Buffered Saline

PC Průtoková cytometrie

PCR..... Polymerázová řetězová reakce

PE Fykoerythrin

PFA..... Paraformaldehyd

PHA Phytohemaglutinin

PMA Phorbol-12myristate-13acetat

POC Point of care testing

PRNT 50..... Neutralizační schopnost protilátky snižující aktivitu viru na 50 %

PRR..... Pattern Recognition Receptors

PVDF..... Polyvinylidene fluorid

qPCR..... Kvantitativní polymerázová řetězová reakce

RIA Radioimunoanalýza

RNA..... Ribonukleová kyselina

RPMI Médium Roswell Park Memorial Institute

RT-PCR Real Time polymerázová řetězová reakce

S1; S2..... Podjednotky glykoproteinu S

SARS-Cov-2..... Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus

SI..... Stimulační index

S-RBD S receptor binding domain of the spike antigen

SSc..... Side scatter

TBC Tuberkulóza

TCM Central memory T cell

TCR T-buněčný receptor

TEM..... Effector memory T cell

TGF- π Transforming growth factor π

Th..... T helper cell

TNF α Tumor Necrosis Factor alpha

TR fluorescence..... Časově modulovaná detekce fluorescence

TRACE Time Resolved Amplified Cryptate Emission

TRM Tissue-resident memory T cell

WHO..... World Health Organization

μ l..... Mikrolitr

μ s Mikrosekunda

ÚVOD

Metod, kterými lze v imunologii sledovat postvakcinační odpověď, je nepřehledné množství. V dnešní době jsme schopni laboratorně diagnostikovat jak humorální, tak i buněčné složky specifické imunity. V teoretické části této bakalářské práce jsou popsány jednotlivé metody, kterými lze sledovat obě tyto složky, větší pozornost je věnována těm, které se v nedávné době uplatnily ke sledování odpovědi po očkování proti onemocnění covid-19. Praktická část této práce se zabývá stanovením buněčné imunitní odpovědi pomocí průtokové cytometrie. Ke stanovení byly použity kryokonzervované vzorky pacientů s imunosupresivní léčbou a jejich výsledky byly porovnány se zdravou kontrolní skupinou.

Imunosupresivní léčbou je potlačena funkce imunitního systému. Pacienti s imunosupresivní léčbou jsou tedy mnohem více náchylní k infekcím a průběh nemocí bývá častěji doprovázen řadou komplikací. Z tohoto důvodu je nutné zvyšovat obranyschopnost těchto pacientů. I přes to, že vakcinace pacientů s imunosupresivní léčbou je spojena s řadou možných rizik, v konečném důsledku přínosy vakcinace značně převyšují tato rizika. Očkování je tedy neodmyslitelnou součástí jejich léčby, jakožto preventivní opatření před vznikem chorob nebo alespoň snížení pravděpodobnosti rozvoje závažného průběhu nemoci.

TEORETICKÁ ČÁST

1 OČKOVÁNÍ A POSTVAKCINAČNÍ ODPOVĚĎ

Očkování představuje umělou aktivní antigeně specifickou imunostimulaci. Princip očkování spočívá v navození ochrany organismu vůči škodlivému patogenu napodobením interakce, ke které by došlo v případě infekce. V očkovací látce je obsažen antigen nebo alespoň jeho část, která vede k navození imunitní reakce a vytvoření imunologické paměti vůči jednomu určitému antigenu (Krejsek, 2016).

1.1 Imunitní reakce

V případě zdravého imunitního systému dojde po každém setkání s cizorodým antigenem k rozpoznání a následně k aktivaci složek specifické imunity. K rozpoznání může dojít buď po náhodném setkání, např. v případě infekce, nebo dojde k cílené konfrontaci organismu s patogenem v podobě vakcinace. Po prvním kontaktu antigenu s imunitním systémem dojde k tzv. primární imunitní odpovědi (Fajfrlík, Amlerová, 2019). Díky spolupráci s antigen-prezentujícími buňkami (APC) je lymfocytárním receptorům (TCR a BCR) představen antigen kolující v plazmě. Po rozpoznání následuje aktivace naivních lymfocytů do efektorové formy. Zralé T-lymfocyty jsou následně schopny likvidovat buňky zasažené příslušným patogenem. B-lymfocyty jsou schopny antigen rozpoznat nejen prostřednictvím APC, ale i volně v solubilní formě v plazmě. Po aktivaci se B-lymfocyty přesouvají do lymfatických uzlin, kde dále proliferují a maturují do plazmatických buněk. Plazmatické buňky jsou schopné bojovat s patogenem prostřednictvím vysokoafinitních specifických protilátek, tzv. imunoglobulinů (Ig) (Krejsek, 2016).

U obou skupin lymfocytů v průběhu imunitní reakce vzniká speciální frakce těchto buněk, která následně při reinfekci výrazně pomáhá k navození mnohem rychlejší imunitní odpovědi. Jedná se o paměťové buňky. Paměťové buňky lze dělit nejen podle typu lymfocytu, ze kterého vzešly, ale i podle místa, ve kterém působí. Centrální paměťové buňky (TCM) nalezneme kolující v lymfě a v sekundárních lymfatických orgánech. Jejich úkolem je spuštění sekundární imunitní odpovědi. Efektorové paměťové buňky (TEM) vznikají z aktivovaných lymfocytů během první reakce s patogenem a následně kolují po celém těle. V případě spuštění sekundární imunitní odpovědi začnou znovu proliferovat a změní se zpět na výkonný lymfocyt, který je schopen likvidace patogenů. A nakonec rezidentní paměťové

buněk (TRM). Jsou usídleny ve tkáních, zejména v kůži, plicích a v okolí gastrointestinálního traktu, kde hlídají danou oblast a v případě infekce jsou připraveny zasáhnout (Paul, 2013).

Cílem vakcinace je vytvoření dostatečného množství paměťových buněk, které zajistí dlouhotrvající imunologickou paměť a následně zajistí rychlou odpověď při dalším setkání s daným antigenem. Rozsah, kvalita a přetrvávání získané specifické odpovědi jsou významně ovlivněny jak typem vakcíny, tak i neadaptivní složkou imunity, věkem, pohlavím a zdravotním stavem očkovaného (Krejsek, 2016).

Průběh imunitní reakce po podání očkovací látky je závislý i na použitém adjuvantním systému. Adjuvans je součástí očkovací látky, jež podporuje vznik imunitní odpovědi a tvorbu paměti. Ve většině případů se jedná o hlinité soli $Al(OH)_3$ či $AlPO_4$. Setkáváme se však i s adjuvans na bázi emulzí, mikropatrikulí, antagonistů receptorů PRR (*Pattern Recognition Receptor*) nebo s kombinacemi různých adjuvans. Pouze u živých atenuovaných vakcín není potřeba adjuvans přidávat (Krejsek, 2016).

1.2 Typy očkovacích vakcín

Vakcíny můžeme rozdělit do několika skupin. Základní dělení je na vakcíny živé a inaktivované. Živé vakcíny vždy obsahují celé mikroorganismy. Inaktivované vakcíny je mohou obsahovat také, nebo obsahují jen jejich složky (Fajfrlík, Amlerová, 2019).

Živé vakcíny obsahují oslabené kmeny laboratorně kultivovaných a upravených bakterií a virů (Fajfrlík, Amrellová, 2019). Tyto kmeny mají omezené faktory patogenity a virulence, díky tomu jsou schopny u zdravého člověka vyvolat imunitní odpověď bez propuknutí infekce. Tyto vakcíny zajišťují humorální i buněčnou odpověď. Jejich výhodou je tedy kompletní ochranná odpověď T i B-lymfocytů a navození dlouhodobé paměti. Nevýhodné jsou zejména pro pacienty s oslabenou imunitou, jelikož u oslabeného patogenu hrozí zvrát zpátky do virulentní formy. Těmito vakcínami lze očkovat proti spalničkám, zarděnkám, příušnicím, mykobakteriím či rotavirům (Krejsek, 2016).

Inaktivované vakcíny obsahují chemicky či tepelně usmrcené patogeny. Usmrcené viry se nejčastěji používají jako prevence dětské přenosné obrny či klíšťové encefalidity. Tento typ vakcín již nepředstavuje hrozbu pro imunosuprimované či imunodeficitní pacienty. Nevýhodou je však nízká stimulace buněčné odpovědi, proto je nutné opakovaně přeočkovávat (Krejsek, 2016; Fajfrlík, Amlerová, 2019).

Dále se pro výrobu vakcín využívají bakteriální toxiny, tzv. anatoxiny, které v těle indukují tvorbu protilátek. Stejně jako u usmrcených celotělových vakcín i zde je potřeba přeočkování. Typickým příkladem mohou být vakcíny proti tetanu nebo záškrtu, neboť patogenita původců těchto onemocnění je založena na tvorbě toxinu (Krejsek, 2016; Fajfrlík, Amlerová, 2019).

V subjednotkových vakcínách je obsažena pouze ta část patogenu, nejčastěji viru, která v těle podněcuje tvorbu protilátek. Takové vakcíny jsou namířeny např. proti viru chřipky (Fajfrlík, Amlerová, 2019).

Před invazivní meningokokovou, hemofilovou a pneumokokovou infekcí chrání polysacharidové a konjugované vakcíny. Polysacharidové vakcíny obsahují pouze koncentrované složky polysacharidového pouzdra bakterie. Konjugované vakcíny mají část polysacharidového pouzdra navázaný na antigenní nosič (Fajfrlík, Amlerová, 2019).

Dalším typem jsou rekombinované vakcíny. Jejich výroba spočívá v zavedení genů, které kódují tvorbu účinných struktur vakcíny do genomu kvasinek, bakterií nebo tkáňových kultur. Ty pak tyto částice samy produkují. Takovou vakcínou je např. vakcína proti hepatitidě B (Fajfrlík, Amlerová, 2019).

V dnešní době je možné se setkat i s vektorovými vakcínami. U těchto vakcín je gen pro daný antigen vložen do nepatogenního mikroorganismu. Ten pak spolu s příslušným adjuvans tvoří danou očkovací látku. Vektorovým vakcínám jsou velmi podobné DNA vakcíny, u kterých je nosičem genu právě molekula DNA. Chemické vakcíny jsou připravené syntézou potřebných komponent a mají velký potenciál do budoucnosti (Fajfrlík, Amlerová, 2019).

Očkovací látky dále rozdělujeme podle počtu patogenů, proti kterým jsou namířeny. Monovalentní vakcíny účinkují pouze na jednoho původce. Bivalentní vakcína působí proti dvěma původcům stejného druhu. Dále jsou vakcíny proti třem patogenům stejného druhu, tedy trivalentní atd. Polyvalentní jsou účinné proti několika subtypům jednoho infekčního původce. Polyvalentní vakcíny je třeba odlišovat od kombinovaných vakcín, které zajišťují ochranu proti dvěma a více původcům různého druhu. Kombinované vakcíny jsou z finančního a časového hlediska výhodnější variantou (Fajfrlík, Amlerová, 2019).

Jak již bylo zmíněno výše, očkovací látku netvoří jen samotný patogen nebo jeho část, ale přidávají se i různá adjuvancia, stabilizátory, minerální nosiče a další látky, které zvyšují imunitní odpověď nebo stabilizují očkovací látku (Fajfrlík, Amlerová, 2019).

1.3 Vnější projev postvakcinační odpovědi a možné nežádoucí účinky

Termínem postvakcinační odpověď se rozumí reakce organismu na aplikovanou očkovací látku. K vnější reakci na danou očkovací látku může dojít i za fyziologických podmínek, jako projev navození imunitní odpovědi a stimulace imunitního systému (Křupka, 2017).

Obecně lze reakce rozdělit podle typu imunitních změn v těle očkované osoby a místa výskytu. Na základě imunitních změn rozdělujeme postvakcinační reakce do čtyř skupin, a to na fyziologické, vystupňované fyziologické reakce (hyperreakce), alergické a neurologické. K fyziologickým změnám, jak již bylo popsáno v předešlém odstavci patří změny v souvislosti s aktivací imunitního systému. K hyperreakci již musí mít daný pacient určité predispozice, nebo tuto reakci mohou vyvolat protilátky, které si organismus vytvořil ještě před vakcinací. Z alergických reakcí se v tomto případě uplatňuje imunopatologická reakce I. typu čili anafylaktická, III. typu zprostředkovaná imunitními komplexy a IV. typu buňkami zprostředkovaná opožděná reakce. Poslední zmiňovanou formou reakcí dle typu imunitních změn jsou neurologické reakce, které se mohou projevit jako encefalopatie, poliomyelitidy či neuritidy (Petráš, 2008).

Podle místa výskytu jde o reakce lokální či celkové. Lokální reakce ještě můžeme rozdělit podle závažnosti na lehké a vážné. Lehká reakce nastupuje během 12 až 48 hodin po očkování v podobě otoku, zarudnutí, bolestivosti místa vpichu, a v průběhu jednoho až dvou dnů odezní. Závažné lokální reakce se vyskytují jen zřídka. Zpravidla se jedná o nervosvalové tony. Celkové reakce lze taktéž rozdělit podle závažnosti. Klinické projevy záleží na typu aplikované vakcíny. K nejčastějším projevům lehkých reakcí však řadíme zvýšenou teplotu nepřevyšující 39 °C, bolesti hlavy, svalů, gastrointestinální potíže, exantém či zduření mízních uzlin. Tato reakce se může objevit do 72 hodin nebo až po 7-10 dnech po podání vakcíny (Petráš, 2008).

Za zmínku ještě stojí alergické reakce způsobené přecitlivělostí na látky přidávané do vakcín jakožto adjuvans. Tento typ reakcí bývá někdy opravdu velmi závažný, avšak objevuje se jen ojediněle. Nicméně každou reakci na očkování je třeba hlásit Státnímu ústavu pro kontrolu léčiv (Petráš, 2008).

2 IMUNOSUPRESE

Cílem imunomodulační léčby je usměrnit zánět, který poškozuje organismus, a to buď stimulací nebo potlačením funkcí imunitního systému. Právě imunosuprese usiluje o potlačení imunitního systému. Jejím vlivem dojde ke ztrátě schopnosti bojovat s cizorodými činiteli. V současnosti se imunosupresivní léčba nasazuje v souvislosti s transplantacemi, aby se zabránilo odvržení darované tkáně. Imunosupresiva dále nacházejí své uplatnění jako jedna z možných variant léčby autoimunitních chorob. K potlačení imunitního systému však může dojít i vlivem patologických procesů v těle. V tomto případě se jedná o důsledek některých onemocnění. Takovým onemocněním je například AIDS neboli syndrom získaného imunodeficitu, dále se může deficit imunitního systému projevit u řady lymfomů a jiných nádorových onemocnění (Krejsek, 2016; Rice et al., 2019).

2.1 Imunosupresiva

Imunosupresiva jsou skupinou léků, které se používají k potlačení imunitního systému. Používáme je v případech, v nichž příliš intenzivní imunitní reakce organismus poškozuje, jako je tomu u autoimunitních a jiných chronických zánětlivých onemocnění, a k potlačení imunitní reakce příjemce proti dárcovským antigenům po transplantacích. V současné době má většina imunosupresiv nescifický účinek. Kromě potlačení funkce autoreaktivních i aloreaktivních lymfocytů dochází i k zasažení funkce dalších složek imunity včetně těch, které fungují fyziologicky. To má za následek utlumení imunitních reakcí, které by za normálních okolností chránily organismus před patogeny. Z tohoto důvodu je nejčastější komplikací této léčby zvýšené riziko vzniku infekčních chorob a nádorových onemocnění. Velkým pokrokem v tomto směru je tzv. biologická léčba. I přesto, že jde stále o nescifickou léčbu, tak je mnohem více cílená, a proto je spojena s mnohem menšími vedlejšími účinky. Mezi biologická imunosupresivní léčiva řadíme monoklonální protilátky, fúzní proteiny a analoga cytokinů (Sobotková, Bartůňková, 2018). Komplikací, ke které v průběhu biologické léčby dochází, je tvorba vlastních neutralizačních protilátek proti protilátkám léčebně podávaným. To po čase vede ke snížení účinku léčby (Wood, Morris, 1995).

V dnešní době existuje široké spektrum imunosupresiv lišících se chemickou strukturou i mechanismem účinku. Podle mechanismu účinku se dají rozdělit na imunosupresiva ovlivňující genovou expresi (glukokortikoidy), imunosupresiva ovlivňující metabolismus DNA (cyklofosamid, antifolika), imunosupresiva vázající se na imunofiliny (cyklosporin),

imunosupresiva inhibující kinázy, imunoglobuliny, fúzní proteiny a analogy cytokinů a další (Sobotková, Bartůňková, 2018).

2.2 Očkování u imunosuprimovaných pacientů

O tom, že je vakcinace pro pacienty s oslabenou imunitou přínosná není sporu. Tím nejzásadnějším přínosem vakcinace této části populace je signifikantní snížení výskytu infekčních chorob nebo alespoň snížení výskytu komplikovaných případů dané infekce. Dalším možným benefitem pro ně může být i zamezení dekompenzace základního chronického onemocnění, což můžeme vidět například při očkování proti chřipce v souvislosti s astma bronchiale (Rumlarová, Kosina, 2014).

Důležité je očkování správně načasovat a případně upravit imunosupresivní léčbu, aby imunitní odpověď po očkování byla co nejvyšší a snížilo se tak riziko selhání vakcinace (Lewis et al., 2023).

Existují i možná rizika vakcinace imunosuprimovaných pacientů, a to zejména v případě aplikace živých oslabených vakcín. V oslabeném organismu může dojít k jejich oživení (diseminaci). Další možnou nežádoucí příhodou může být patoimunologická reakce na očkování nebo dekompenzace autoimunitních chorob na základě stimulace imunitního systému vakcínou. Nejčastěji se však setkáváme se selháním vakcinace nebo nízkou postvakcinační odpovědí. Proto je důležité sledovat postvakcinační odpověď u imunosuprimovaných pacientů. Včasná diagnostika umožní postupovat dalšími kroky, které vedou k ochraně oslabeného pacienta (Rumlarová, Kosina, 2014). Takovým krokem může být pasivní protilátková profylaxe podáním monoklonálních protilátek nebo antivirových činidel, které inhibují replikaci viru (Corey et al., 2021).

2.3 Význam vyšetření postvakcinační odpovědi

Sledováním postvakcinační odpovědi můžeme zjistit, zda byla skutečně dosažena imunita vůči požadovanému agens a zdali i po určité době tato imunita přetrvává. Díky tomu pak můžeme sestavit vhodné očkovací schéma a určit správný čas k přeočkování. Diagnostika postvakcinační odpovědi je zejména důležitá při sledování imunitní reakce rizikových skupin pacientů (Vlas, 2022).

3 COVID-19

Onemocnění známé jako covid-19 se poprvé objevilo na konci roku 2019 v čínském městě Wu-chan. Počátkem roku 2020 se nákaza covidem-19 masově rozšířila do celého světa a 11. 3. 2020 byla Světovou zdravotnickou organizací označena za pandemii (WHO, 2020).

3.1 Původce

Za onemocněním covid-19 stojí virus SARS-CoV-2. Jedná se o obalený RNA virus z rodiny Coronaviridae. Zkratka SARS-CoV-2 označuje mezinárodní taxonomický název *Severe acute respiratory syndrome*, tedy v překladu Těžký akutní respirační syndrom (Gorbalenia, 2020).

RNA kóduje hlavní strukturní proteiny viru. Z obalu vyčnívají na povrch glykoproteiny S, známé též jako Spike protein. V membráně se dále nacházejí proteiny E a M a nukleokapsidu tvoří protein N. Protein S hraje hlavní roli při vzniku infekce, neboť umožňuje průnik viru do buňky po interakci s buněčným membránovým enzymem ACE2 (*Angiotensin konvertující enzym 2*). Vazba glykoproteinu S a ACE2 je umožněna membránovými proteolytickými enzymy, které glykoprotein S aktivují. Po navázání dochází k průniku viru do buňky, kde je zbaven obalů. Po viru v buňce zůstává jeho nukleová kyselina. RNA se přesune z cytoplazmy do ribozomů, kde dochází k tvorbě virových proteinů nezbytných pro replikaci a sestavení virionu. Virion je pak schopen opustit hostitelskou buňku a sám infikovat další (Krejsek, 2021). Zároveň Spike protein blokuje opravné mechanismy buněčné DNA, což následně vede k jejímu zániku (Lenz, 2021).

Virus SARS-CoV-2 je poměrně geneticky proměnlivý. Vlivem mutací v genech pro Spike protein dochází k tvorbě nových variant viru, což je důležitý poznatek pro tvorbu vakcín. (Krejsek, 2021).

3.2 Klinický průběh

U většiny infikovaných jedinců se jednalo o mírné až středně těžké respirační onemocnění, jejichž údrava nevyžadovala zvláštní léčbu. Mezi nejčastější příznaky onemocnění patří horečka, kašel, únava, ztráta chuti nebo čichu. V menší míře se může projevit i bolest hlavy, krku, kožní vyrážka či gastrointestinální potíže. Délka onemocnění se pohybuje v průměru kolem 5-6 dnů ode dne nákazy. Inkubační doba je však u každého jedince variabilní, může trvat dva dny až dva týdny (European Centre for Disease Prevention and

Control, 2021). Tento fakt značně zjednodušuje šíření viru v populaci, jelikož v inkubační době je nakažená osoba nejvíce infekční (Krejsek, 2021).

Někteří virem nakažení jedinci prodělali onemocnění covid-19 asymptomaticky, tedy bez klinických příznaků onemocnění. U některých však mělo onemocnění vážný průběh vyžadující odbornou lékařskou péči. K příznakům těžké formy onemocnění můžeme zařadit potíže s dýcháním, bolest na hrudi, ztrátu řeči, ztrátu mobility či zmatenost. Rizikové faktory, které zvyšovaly pravděpodobnost těžkého průběhu, byly v souvislosti s vyšším věkem, těhotenstvím, hypertenzí, kardiovaskulárním onemocněním, diabetem či s chronickým respiračním onemocněním (European Centre for Disease Prevention and Control, 2021).

3.3 Přenos

Virus se přenáší kapénkami z úst či nosu infikované osoby prostřednictvím kašle, kýchnutí, mluvení, zpívání a dýchání (WHO, 2020).

3.4 Princip očkování a typy očkovacích vakcín

11. 1. 2020 započaly snahy o vývoj vakcíny proti onemocnění covid-19. Toho dne byla totiž dekodována a zveřejněna genetická sekvence viru SARS-CoV-2. Vznikly celkem čtyři varianty vakcín na základě rozdílného způsobu účinku. Jednalo se o vakcíny na bázi mRNA, inaktivované vakcíny, vektorové vakcíny a peptidové vakcíny (Ochani et al., 2021).

Na bázi mRNA fungují dvě nepoužívanější varianty vakcín a to Pfizer/BioNTech a Moderna. Tyto mRNA vakcíny obsahují zakódovanou plnou délku genetické informace Spike proteinu SARS-CoV-2 (Ochani et al., 2021). To znamená, že nás chrání před onemocněním covid-19, aniž by nás vystavily viru na rozdíl od oslabených či usmrcených vakcín, které obsahují samotný virus. Namísto toho vakcína obsahuje určitý typ genetické informace, konkrétně tedy již zmíněnou mRNA, která nese sekvenci kódující tvorbu Spike proteinu (Lenz, 2021). Vakcína na bázi mRNA dá tělu pokyn k tvorbě těchto proteinů. Díky tomu se imunitní systém s těmito proteiny seznámí a dokáže proti nim vytvořit specifickou odpověď, která může být po vakcinaci okamžitě využita v případě kontaktu s koronavirem SARS-CoV-2 a dojde k likvidaci patogenu bez vzniku onemocnění. Vakcíny na této bázi vykazují až 95% účinnost (Evropská rada, Rada Evropské unie, 2021).

Dále se poměrně často využívá ruská vakcína Sputnik V. Jde o vakcínu s virovým vektorem. Ve dvou dávkách využívá dva různé upravené adenoviry (DNA viry), jež v těle

nezpůsobí vznik infekce, nýbrž navodí syntézu Spike proteinu, proti kterému si lidský organismus vytvoří obranyschopnost. Na stejném principu je založena i vakcína společnosti AstraZeneca a společnosti Janssen (Brunclíková, 2021).

Vakcína EpiVacCorona spadá do vakcín na bázi peptidových antigenů. Jedná se o syntetickou peptidovou vakcínu. Tato vakcína napodobuje proteiny patogenů. Výroba spočívá ve vytvoření ochranných peptidových fragmentů proteinu S, v chemické syntéze peptidů a konjugace syntetických peptidů s nosným nukleokapsidovým proteinem SARSCoV-2. Jako adjuvans se u této vakcíny využívá hydroxid hlinitý (Ryzhikov et al., 2023). Na této bázi je i vakcína Nuvaxovid od společnosti Novavax (Klika, Hanáček, 2022).

U oslabené nebo inaktivované celovirové vakcíny je virus SARS-CoV-2 v očkovací látce, jak už název napovídá, buď oslabený, nebo usmrcený. To znamená, že nezpůsobí onemocnění, ale je stále schopný vyvolat imunitní reakci. Živé oslabené vakcíny mají velmi zdoluhavý vývoj a existuje u nich jistá pravděpodobnost, že oslabený původce znovu nabude svých schopností vyvolat onemocnění. Právě proto se častěji používají inaktivované vakcíny. Inaktivace probíhá zpravidla vysokou teplotou, chemicky nebo ozařováním. U obou vakcín je třeba uvážit riziko nadměrné stimulace imunitního systému, která může vést k poškození určitého orgánu. Vakcíny tohoto druhu vyvíjejí společnosti Sinopharm, Sinovac, nebo Bharat Biotech International a na trhu můžeme jejich vakcíny najít pod názvy Vero Cell, Coronavac a Covaxis. Tyto vakcíny jsou schválené WHO jen v krajním případě, kdy dojde k markantnímu nárůstu nemocných a k nedostatku jiných vakcín (Klika, Hanáček, 2022).

U všech typů vakcín je důležité, aby příslušná vakcína vyvolala silnou imunitní odpověď proti Spike proteinu, zejména pak proti její RBD doméně (*receptor-binding-domain*). RBD spolu s NTD (*N-terminal domain*) vytvářejí podjednotku S1 glykoproteinu. Podjednotka S2 je pak zodpovědná za fúzi viru do hostitelské buňky. RBD doména je ta část glykoproteinu S, která se váže na hostitelskou buňku a interaguje s ní. Zároveň je to také hlavní cíl neutralizačních protilátek, i když už byly zjištěny i neutralizační protilátky namířené proti NTD (Chen et al., 2023).

4 METODY SLEDOVÁNÍ POSTVAKCINAČNÍ ODPOVĚDI HUMORÁLNÍ SLOŽKY IMUNITY

Existuje celá škála metod, které v současné době využíváme k vyšetření humorálních složek imunity. Těmito metodami se snažíme objasnit řadu markerů imunitní reakce, které se nacházejí rozpuštěné v plazmě a tkáních (Bartůňková, Paulík, 2011). Získáváme informace o reakci těla po nákaze patologickým agens nebo po aplikaci vakcíny proti tomuto patogenu. Jelikož se z velké části jedná o průkaz látek obsažených v plazmě, resp. v séru, nazýváme tyto metody jako serologické (Mayo Clinic, 2022).

Základní složkou humorální specifické imunity jsou protilátky vytvořené po antigenní stimulaci B-lymfocyty. Z nespecifických složek sem řadíme proteiny akutní fáze a komplement (Bartůňková, Paulík, 2011). Právě vyšetření hladiny protilátek vůči specifickému antigenu dané nemoci či vakcíny je jedním z nejčastějších imunologických rutinních vyšetření (Vlas, 2022). Kvalitativním stanovením protilátek můžeme rozlišit jednotlivé třídy tzv. izotypy. Kvantitativním stanovením určíme koncentraci daného imunoglobulinu. Dnes se hladiny imunoglobulinů stanovují zpravidla nefelometricky či turbidimetricky. Antigenní specifitu dané protilátky lze prokázat metodami jako jsou ELISA, nepřímá fluorescence, aglutinace, Western blot apod. (Bartůňková, Paulík, 2011).

4.1 ELFO

Elektroforézou jsme schopni rozdělit plazmatické proteiny na základě jejich rozdílné pohyblivosti v elektrickém poli. Používá se ke stanovení rozložení spektra plazmatických bílkovin nebo k rozdělení antigenů pro imunoblotové techniky. V imunologii nás nejvíce zajímá tzv. gama frakce elektroforetické křivky, která reprezentuje množství imunoglobulinů v plazmě. Pomocí ELFO jsme schopni zachytit jen výrazné změny hyper nebo naopak hypogamaglobulinemie a monoklonální gamapatii. Pro přesnější diagnostiku monoklonálních gamapatií se začala využívat imunoelektroforéza nebo její modifikace tzv. imunofixace, která představuje kombinaci klasické ELFO a specifické interakce antigenu s protilátkou (Ag-Ab) v agarózovém prostředí. (Bartůňková, Paulík, 2011).

Vyšetření lze provádět jak z plazmy, tak ze séra, případně z moči. Klasická ELFO poskytne výsledky stanovení ještě ten den, imunoelektroforéza a imunofixace potřebují čas na zreagování antigenů s protilátkami, a proto jsou výsledky dostupné zpravidla až druhý

den. Krom vstupní investice do elektroforetické vany a reagenčních činidel jsou elektroforetické metody poměrně levné a jejich provedení nepříliš pracné (Bartůňková, Paulík, 2011).

4.2 Aglutinace

Aglutinace je metoda založená na principu shlukování a tvorby sraženiny v důsledku reakce Ag-Ab. Jde o klasickou sérologickou metodu, která má své využití i v jiných oborech, jako je např. transfúzní lékařství. Aglutinací lze detekovat jak antigen, tak i protilátky. Je ale potřeba pamatovat, že aglutinují jen protilátky třídy IgG a IgM. Tato metoda je snadná, rychlá, levná, ale poměrně málo citlivá (Bartůňková, Paulík, 2011).

4.3 Radiální imunodifúze

Radiální imunodifúze byla ještě koncem minulého století zlatým standardem při stanovení sérových bílkovin, zejména pak imunoglobulinů a složek komplementu. Dnes se využívá k měření humorálních složek imunity, u nichž nelze využít nefelometrické či turbidimetrické stanovení. Jedná se o metodu poměrně pracnou, zdlouhavou a s omezenou možností kvantifikace (Bartůňková, Paulík, 2011).

Radiální imunodifúze je založena na tvorbě imunokomplexů Ag-Ab v agarovém gelu. Do vytemperovaného agarózového gelu je vmíchána specifická protilátka. Gelová směs je následně rovnoměrně vylita na sklo a nechá se zatuhnout. Do zatuhlého gelu jsou následně pomocí duté jehly vykrojeny otvory, do nichž se aplikuje sérum obsahující zkoumaný antigen a kalibrátor. V průběhu inkubace antigen difunduje z jamky do gelu a dochází k reakci s protilátkou. V místě, kde se vyrovnají koncentrace antigenu a protilátek dojde k vytvoření precipitačního prstence, který lze po obarvení změřit. Průměr prstence je přímo úměrný množství antigenu, přesnou koncentraci lze vypočítat z průměrů prstenců vzorků a kalibrátoru (Bartůňková, Paulík, 2011).

4.4 Nefelometrie a turbidimetrie

Obě tyto zákalové metody se dají v imunologii využít na měření koncentrace imunitních komplexů, které vznikly po interakci specifických protilátek s antigenem. Koncentrace stanovovaného antigenu je přímo úměrná rychlosti tvorby zákalu nebo jeho hustotě (Bartůňková, Paulík, 2011)

V obou případech se jedná o specificky modifikované spektrofotometrické stanovení (Dastych et al., 2014). Obě metody mohou probíhat jak kinetickým, tak end-point stanovením. Zásadní rozdíl mezi nefelometrií a turbidimetrií je v poloze detektoru. U nefelometrie

není detektor umístěn přímo proti zdroji světla, nýbrž pod úhlem 30 až 90 stupňů. Měří tedy intenzitu světla, které bylo odraženo od vznikajících komplexů Ag-Ab. Jedná se o tzv. Tyndalův jev (Bartůňková, Paulík, 2011).

Při turbidimetrickém stanovení je detektor přímo proti zdroji světla a měří se úbytek intenzity světla, které prošlo roztokem v kyvetě. K úbytku světla došlo vlivem odrazu na vytvořených imunokomplexech. Obě tyto metody jsou prováděny v měřící kyvetě, která obsahuje naředěný antigen, vhodnou protilátku a pufr, který urychluje a stabilizuje reakci (Bartůňková, Paulík, 2011).

Výhodou těchto metod v současné době je vysoká možnost automatizace a obzvláště u turbidimetrie nízká cena stanovení. Nevýhodou turbidimetrie oproti nefelometrii je nižší, avšak stále dostačující citlivost. Citlivost nefelometrie lze ještě zvýšit přidáním látek, které zvýrazní tvorbu imunokomplexů, jako jsou např. upravené latexové partikule. Těmito metodami lze laboratorně stanovovat základní bílkoviny séra, zejména imunoglobuliny všech tříd a jejich volné řetězce kappa a lambda, dále složky komplementu, kde nás zejména zajímají složky C3 a C4 a v neposlední řadě nacházejí své uplatnění i ve stanovení ostatních proteinů, jako jsou CRP, albumin, alfa kyselý glykoprotein, transferin atd. (Bartůňková, Paulík, 2011).

4.5 Imunoanalýza se značenými protilátkami – RIA a EIA

Principem těchto metod je vytvoření imunokomplexu po reakci antigenu s protilátkou, který je následně na základě specifického typu značení vizualizován a jeho množství kvantifikováno. V minulosti se ke značení jako první začal využívat radioaktivní prvek a vzniklé precipitáty se detekovaly pomocí gama či beta záření. Z hlediska citlivosti a reprodukovatelnosti by byla i dnes tato metoda požadována za velmi výkonnou, avšak dnešní legislativa a nutnost speciálních opatření týkajících se jak pracoviště, tak personálu vedla k řadě modifikací a vzniku dalších variant značení (Bartůňková, Paulík, 2011).

Vlastní stanovení dnes probíhá v mikrotitračních destičkách zpravidla o 96 jamkách. Na stěnách jamek je navázána protilátka proti vyšetřovanému antigenu. Zde si musíme dát pozor na správnou interpretaci, neboť touto metodou lze stanovovat jak antigeny jako takové, tak i množství protilátek proti nim namířených, které však do reakce vstupují jako antigeny, které budou následně reagovat s protilátkami navázanými na stěnách jamek (Bartůňková, Paulík, 2011).

Využití enzymu jako způsobu značení vedlo ke vzniku řady testů dnes známých pod zkratkou EIA (*enzymoimunoanalýza*). Jako enzym se začala využívat křenová peroxidáza a alkalická fosfatáza. EIA metody lze rozdělit na heterogenní a homogenní. Heterogenní metody vyžadují v průběhu stanovení separaci volné a vázané frakce analytu, narozdíl od homogenních metod, které tuto separaci nevyžadují (Bartůňková, Paulík, 2011). Heterogenní metody pak lze ještě dělit na kompetitivní neboli soutěživé a nekompetitivní neboli sendvičové. Rozdíl je v uspořádání reakce. U kompetitivní metody stanovený antigen soutěží se značeným antigenem o vazbu na protilátce v jamce mikrotitrační destičky za vzniku oněch imunokomplexů. Vznikají komplexy jak značené, tak neznačené. Zpravidla v soutěži o vazbu vítězí ten antigen, jehož koncentrace je v dané směsi vyšší. Výsledná intenzita měřeného signálu rozhoduje o množství stanovené látky. V tomto případě lze říct, že se jedná o nepřímou úměru, neboť čím více je stanovené neznačené protilátky ve vzorku, tím méně značených antigenů se mohlo navázat, a tedy měřený signál bude minimální. Nesoutěživé metody využívají k vizualizaci sekundární značenou protilátku, která se do reakční směsi přidá až po proběhnutí reakce antigenu s protilátkou v jamce. Zde se naopak jedná o přímou úměru, neboť čím více je stanoveného analytu ve vzorku, tím více se vytvoří imunitních komplexů v jamce, a tím více značených protilátek se bude moci navázat, což způsobí větší sílu měřeného signálu (Dastyh, Breinek, et al., 2015).

Měřený signál lze detekovat spektrofotometricky, nefelometricky, fluorimetricky či luminometricky, vždy záleží na povaze použitého substrátu, jehož přeměna na detekovatelný produkt bude katalyzována právě enzymem použitým ke značení (Bartůňková, Paulík, 2011).

4.6 Imunoanalýza se značenými protilátkami – ELISA

ELISA neboli *Enzyme-linked immunosorbent assay* (*enzymem indukovaná imunoanalýza*) je jednou z neizotopových heterogenních imunoanalytických metod. Jedná se o speciální variantu EIA metody. V podstatě se jedná o heterogenní kompetitivní EIA se značenou protilátkou (Bartůňková, Paulík, 2011).

Stanovení probíhá tak, že do jamek v mikrotitrační destičce napipetujeme určité množství naředěného roztoku vzorku séra obsahující příslušné protilátky, které chceme stanovit. Po přidání séra začne probíhat reakce naší protilátky, která zde vstupuje do reakce jako antigen s protilátkou, která je na povrchu destičky, vzorky necháme určitou dobu inkubovat. Po inkubaci je třeba odstranit nenavázané složky promytím a následně se přidá druhá

protilátka s navázaným enzymem. Ta vytváří konjugát. Následuje další inkubace a promytí nenavázaných složek a vizualizace reakce přidávkem substrátu. Enzym zde katalyzuje přeměnu chromogenního substrátu na barevný produkt vhodný k fotometrickému stanovení na modifikovaném spektrofotometru, tzv. ELISA-readeru. Množství vzniklého produktu je přímo úměrné koncentraci stanovované látky ve vzorku (Bartůňková, Paulík, 2011).

Tato metoda je velice citlivá, specifická a reprodukovatelná. Mezi další výhody můžeme zařadit cenovou dostupnost a možnost automatizace (Bartůňková, Paulík, 2011).

4.7 Imunoanalýza se značenými protilátkami – LIA

Další neizotopovou metodou je luminiscenční imunoanalýza. U tohoto typu metod se využívá značení imunochemické reakce pomocí luminoforu, zároveň mezi luminiscenční metody můžeme zahrnout i enzymové imunoanalýzy s luminometrickou detekcí. Na základě použitého luminoforu lze tyto metody rozdělit na bioluminiscenční a chemiluminiscenční (Šafarčík et al., 2018).

Bioluminofory se využívají převážně u chemických reakcí, které jsou zahájeny působením enzymu a dochází k přeměně luminogenního substrátu na produkt. Produkt pak krátce vyzařuje světelné záření, které je možno detekovat (Bartoš et al., 2013).

Mezi chemiluminofory řadíme látky jako již výše zmíněný luminol, dále pak izololuminol, lucigenin, sulfonamidy, či estery akridinových barviv (Bartoš et al., 2013). Jak už název napovídá, chemiluminiscence probíhá na základě chemické reakce, která po velmi krátkém časovém období iniciuje produkci světelného záření. Výhodou této metody je možnost detekce látek o velmi nízké koncentraci (až do koncentrace 10^{-18} mol/l) (Šafarčík et al., 2018).

4.8 Imunoanalýza se značenými protilátkami – ECLIA

Elektrochemiluminiscenční imunoanalýza je kombinací elektrochemie a chemiluminiscence. Chemiluminiscenční signály se získávají excitací luminoforu, který je generován na povrchu elektrody během elektrochemické reakce. V podstatě jde o přeměnu elektrochemické energie na energii zářivou. Měříme intenzitu luminiscence, která byla vyvolána elektrickým impulzem (Metrohm, 2022).

Hledaná protilátka se váže na magnetické mikročástice s navázaným streptavidinem. Detekční protilátka je označena nejčastěji dvojmocnými ionty ruthenia vázanými na tripropylamin, které jsou schopné luminiscence. V měřící buňce jsou po proběhlé imunochemické reakci magnetem vychytávány komplexy s navázanými magnetickými částicemi. Přivedením napětí na elektrodu uvnitř měřící buňky je zahájena elektrochemická reakce, při které dochází k oxidaci a následně k redukci rutheniových iontů. Po redukci se ionty zbavují přebytečné energie emisí chemiluminiscenčního záření, jehož intenzita je přímo úměrná koncentraci analytu (Bartoš et al., 2013). K detekci vazby protilátek lze využít i multiplexní a biosenzorové metody (Skládal, 2002).

4.9 Imunoanalýza se značenými protilátkami – FIA

Fluorescence nastává tehdy, když daná látka (fluorofor) je schopna absorbovat elektromagnetické záření o určité vlnové délce a přeměnit ho na záření o jiné, zpravidla vyšší vlnové délce. Tato změna maxim vlnových délek excitovaného a emisního záření se nazývá Stokesův posun. Poměr emitovaných a absorbovaných fotonů v průběhu reakce udává kvantový výtěžek fluorescence (Šafarčík et al., 2018).

Imunoanalýzy, ve kterých dochází k detekci fluorescenčního záření, můžeme rozdělit opět do dvou skupin. První skupinu tvoří enzymové imunoanalýzy, jejichž substrát produkuje fluorescenční záření, jedná se tedy o modifikaci EIA. Využití fluorometrické detekce zvyšuje citlivost dané metody, je ale limitována interferencí pozadí. Druhou skupinu představují vlastní fluorescenční imunoanalýzy, využívající na místo enzymu fluorescenční indikátor, kterým je nejčastěji fluorescein. Takový indikátor by měl mít vysokou hodnotu absorpance, v průběhu reakce by mělo dojít k velkému posunu vlnových délek, a tedy i hodnoty kvantového výtěžku by se měli přibližovat k maximu, tedy k číslu 1 (Bartoš et al., 2013).

Jak již bylo výše zmíněno, měření fluorescence může být značně ovlivněno prostředím. Látky obsažené v lidském séru mohou interferovat s fluorofory, může docházet k rozptylu světla, či k zhášení fluorescence. Klíčový je při stanovení i čas, jelikož fluorescenční signál je detekovatelný jen několik málo nanosekund. Zavedením techniky časově modulované detekce fluorescence (*TR-fluorescence*) a aplikací nových fluorescenčních indikátorů na bázi chelátových lanthanoidů (nejčastěji Europia) se povedlo vyřešit problém s interferujícím pozadím. Jelikož tyto indikátory mají dosvit mezi 10-1000 μ s, je umožněno měření provádět po časové prodlevě 400 až 800 μ s po osvitu a detekce je časově modulována. Osvit

z xenonové výbojky či laseru, který způsobuje excitaci, je tisíckrát za sekundu zopakován. Tím se oddělí fluorescence sérových komponent jejichž dosvit, jak už bylo zmíněno, se pohybuje v řádech jednotek až desítek nanosekund. Pro aplikaci do imunoanalýz byl vyvinut systém DELFIA (*Dissociation Enhanced Lanthanoide Fluorescent Immuno Assay*), který se následně povedlo plně zautomatizovat (Šafarčík et al., 2018).

Obecně FIA může probíhat v kompetitivní i nekompetitivní variantě, homogenní i heterogenní. V případě DELFIA se jedná o heterogenní metodu. Všeobecně heterogenní metody FIA mají tu výhodu, že v průběhu stanovení dochází k odstraňování nadbytečných komponent, zvláště zásadní je odstranění nadbytečného zbytku séra, což jak vyplývá z předchozího odstavce, minimalizuje vliv pozadí a zvýší se tím citlivost metody. Další zvýšení citlivosti přineslo i právě využití chelátových indikátorů a časové modulace. Bez časové modulace se detekční mez pohybuje okolo 10^{-12} mol/l. S využitím časové modulace lze detekovat koncentrace 10^{-17} mol/l (Bartoš et al., 2013).

Jednou z variant homogenní fluoroimunoanalýzy je FPIA (*Fluorescence Polarization Immuno Assay*), kde po kompetitivní reakci je měřené emitované vertikálně polarizované fluorescenční záření po excitaci vzorku polarizovaným světlem. Tato metoda je optimální pro stanovení malých analytů, neboť využívá rychlosti otáčení molekul v polarizovaném světle. Malé molekuly analytu označeného fluoreceinem se otáčejí velkou rychlostí, velké molekuly (imunokomplexy) mají rychlost podstatně nižší, díky čemuž je fluorescence déle detekovatelná. Další možnou variantou je metoda TRACE (*Time Resolved Amplified Cryptate Emission*), která je obdobou metody DELFIA. Místo chelátových lanthanoidů se využívá kryptátová struktura s iontem Europia v centru. Dochází k přenosu energie z donoru, kterým je kryptát na akceptor, chemicky modifikovaný protein. Opět se s časovým odstupem měří emitované záření po ozáření vzorku dusíkovým laserem (Bartoš et al., 2013).

4.10 Průtoková cytometrie

Klasická průtoková cytometrie má své využití v diagnostice buněčné imunity. Existuje však i alternativa pro stanovení specifických protilátek. Principiálně jsou techniky podobné, proto je bližší popis této metody uveden níže u podkapitoly, která se zabývá buněčnou imunitou (Bartůňková, Paulík, 2011).

Tato alternativa na stanovení specifických protilátek a antigenů vyžaduje na rozdíl od klasické PC speciální nosiče pro navázání stanovovaných struktur. Místo buněk jsou tak

do cytometru vhnány kuličky o přesně definované velikosti. Na kuličkách je navázaný antigen, který umožní vazbu se specifickou protilátkou z patientského séra a vzniknou tak opět komplexy Ag-Ab. Každá kulička je potažena jedním typem antigenu, ale v jedné zkumavce může být směs kuliček s různými antigeny. Výhodou tohoto stanovení je možnost většího počtu stanovení v jednom vzorku. Vizualizace tohoto komplexu je umožněna druhou protilátkou s navázaným fluorochromem (FITC nebo PE). Vyhodnocení výsledků je založeno na rozdílné velikosti kuliček a intenzitě jejich fluorescence (Bartůňková, Paulík, 2011).

4.11 Virus neutralizační test a test neutralizace pseudoviru

Test se využívá ke zjištění neutralizační aktivity protilátek v séru pacienta. Naředěné patientské sérum se nechá inkubovat spolu s příslušným virem. Po inkubaci v termostatu při 37 °C a s 5 % CO₂ se do směsi přidají živé buňky. Pokud došlo po vakcinaci k vytvoření dostatečného množství účinných protilátek, budou tyto protilátky mít schopnost neutralizovat vir, který nebude moci infikovat přidané buňky. V případě napadení buněk virem se tzv. vytvoří plak. Podle velikosti plaku lze odvodit i počet infikovaných buněk. Povrch se pokryje vrstvou agaru nebo karboxymethylcelulózy, aby se zabránilo volnému šíření viru. Po uplynutí další inkubace v termostatu při 37 °C s 5 % CO₂ se vhodnou metodou změří množství napadených buněk a vypočítá se případný pokles virové aktivity. Počty napadených buněk lze stanovit mikroskopicky, fluorescenčně (FIA), chemiluminiscenčně (CLIA) či enzymaticky (ELISA) (Devi et al., 2022; Barnes et al., 2023).

Aby se dal tento test považovat za pozitivní, tedy aby bylo možné říci, zda mají protilátky dostatečnou neutralizační schopnost, musí se aktivita tohoto viru snížit na 50 % (PRNT 50) (Devi et al., 2022).

Test není vhodný pro rozsáhlé testování, má poměrně nízkou výkonnost a jeho provedení trvá relativně dlouho (2-4 dny). Zároveň nesmíme zapomenout, že pracujeme s živými viry, takže personál je ohrožen vznikem nákazy. Dalším faktorem hrající roli ve stanovení jsou použité buňky. Použití nesprávné kolonie může vést k falešným výsledkům. Nejčastěji se v praxi využívají buňky Vero E6. I přes řadu nevýhod má tato metoda vysokou výpovědní hodnotu, je specifitější než řada jiných sérologických metod. V dnešní době se ale mnohem více než jako rutinní metoda využívá jako metoda srovnávací (Devi et al., 2022; Barnes et al., 2023).

Test neutralizace pseudovirů je velmi obdobný. Místo živých virů se zde využívají pouze virové částice, jež mají v genomu změněné sekvence nukleové kyseliny tak, aby se

staly nepatogenní a ztratily schopnost replikace, zároveň si však musí zachovat schopnost exprese klíčových proteinů, jež hrají roli v jejich patogenitě. Z tohoto důvodu se jedná o biologicky bezpečnější variantu virus neutralizačního testu (ACROBiosystems, 2017).

4.12 Komplement fixační test

Reakce antigenu s protilátkou a následné vytvoření komplexu Ag-Ab vede k aktivaci komplementu. Během první fáze testu dojde k reakci antigenu s protilátkou a následné aktivaci a případné spotřebě definovaného množství komplementu. V druhé fázi stanovujeme hemolytickou aktivitu komplementu. Tato aktivita je úměrná množství hledané protilátky v reakční směsi. Aktivita volného komplementu zbývajícího na konci reakce antigenu s protilátkou se stanovuje hemolytickým testem (Bartůňková, Paulík, 2011). Do zkumavky se přidají beraní erythrocyty a amboceptor, který slouží jako protilátka proti jejich povrchu. Pokud jsou v séru pacienta hledané protilátky, tak v předchozím kroku testu došlo ke spotřebování komplementu na imunitní komplexy a erythrocyty tak sedimentují v nezměněné formě na dno zkumavky. Pokud vzorek neobsahoval příslušné protilátky, komplement se nespotřeboval a aktivuje se až nyní, což způsobí rozpad erythrocytů (Bednář, 2009). Při stanovení protilátek výsledky interpretujeme jako nejvyšší možné ředění séra, ve kterém je ještě prokazatelná aktivita (Bartůňková, Paulík, 2011).

Výhodné jsou tyto metody zejména z ekonomického úhlu pohledu, jinak jsou ale poměrně pracné, méně citlivé oproti jiným sérologickým metodám, a jejich výsledek může být ovlivněn antikomplementovou aktivitou séra (Bartůňková, Paulík, 2011).

4.13 Multiplexové metody

Multiplexové metody umožňují v průběhu jednoho stanovení proměřit více analytů zároveň. Jedná se tedy o komplexní stanovení, jehož cílem je zjistit zastoupení jednotlivých proteinů a různých biomarkerů a jejich vzájemný vztah, zároveň i vyhledání vhodné terapie a klinická diagnostika. Multiplexové metody jsou velkým přínosem hlavně díky snížení potřebného času na provedení stanovení a objemu vzorku. Zároveň se jedná o metody dostatečně citlivé a finančně výhodné (Šafarčík et al., 2018).

Principů, na kterých pracují jednotlivé systémy, je hned několik a mohou se i navzájem kombinovat. Ke stanovení proteinů lze krom imunoanalytických postupů využít technologii separačních metod či hmotnostní spektrometrie. Všechny níže popsané varianty multiplexových metod jsou založené na principu imunoanalýz (Šafarčík et al., 2018).

4.13.1 Planární mikroarray – proteinové čipy

Proteinové čipy jsou jednou z multiplexních proteomických technologií. Vznikly na základě DNA čipů a principiálně fungují podobně. V dnešní době rozeznáváme tři typy proteinových čipů, a to analytické, funkční a čipy s reverzní fází (Bartoš et al., 2013; Creative Biolabs, 2023).

Základem je pevná fáze, nejčastěji skleněná destička s nitrocelulózovou membránou, která slouží jako nosič proteinových, nejčastěji protilátkových sond. Tato destička je rozdělena do několika polí, a každé pole neboli spot může obsahovat různé imobilizované sondy. To určí typ, jaký analyt bude v daném místě stanoven. Sondy následně reagují se vzorkem a vytvářejí se mezi nimi vazby (sonda-cílová molekula). Vytvořené komplexy následně kvalitativně, popř. semikvantitativně analyzujeme. Způsoby detekce lze rozdělit podle toho, zda využívají značení či nikoli. V tomto případě lze využít značení pomocí enzymu, fluorescence, chemiluminiscence nebo dnes již ojediněle pomocí radioizotopu. Mezi metody bez chemického značení řadíme elipsometrii, hmotnostní spektrometrii či rezonanci povrchového plasmonu (Bartoš et al., 2013; Creative Biolabs, 2023).

Pro imunoanalýzu existuje multiplexní modifikace metody ELISA. Jedná se o array na mikrotitrační destičce, která je založená na sendvičovém uspořádání s fluorescenční nebo chemiluminiscenční detekcí. V destičce je nasportováno až 16 protilátek, které mohou detekovat 16 analytů ve vzorku (Bartoš et al., 2013). I přesto, že multiplexními metodami lze stanovit až stovky analytů, je tato metoda omezena jen na desítky z toho důvodu, aby se zamezilo zkřížené reaktivitě mezi jednotlivými protilátkami (Sutandy et al., 2013).

4.13.2 Multiplexové reakce na mikrokuličkách – Bead Arrays

Tato metoda využívá k detekci průtokovou cytometrii a umožňuje kvantitativní stanovení koncentrace sledovaných proteinů. Zde na rozdíl od proteinových čipů sledujeme užší spektrum proteinů, stanovení je tedy více cílené. Polystyrenové mikrokuličky jsou alternativou planárního čipu (Šafarčík et al., 2018).

V praxi je možné se setkat s více technologiemi, které jsou založeny na tomto principu. Rozdíl jednotlivých technologií spočívá právě v již zmiňovaných mikrokuličkách. Existují systémy, které jsou schopné stanovit naráz koncentrace 20 analytů na základě dvou rozdílných velikostí kuliček a různých intenzit fluorescenčního barviva na jednotlivých kuličkách (Flow Cytomix). Jsou ale i metody schopné stanovit 100-500 analytů v jedné mikrotitrační destičce, což pro využití destiček s 96 jamkami činí až 64000 testů během 45 minut

(xMAP, FlexMAP). Tyto metody využívají kuličky, které se uvnitř liší kombinací dvou fluorescenčních barviv v různém poměru, což následně vytváří rozdílné spektrum. Jelikož má každá mikrokulička rozdílné spektrum, může jedna reakční jamka obsahovat více rozdílných kuliček. Koncentrace hledaného proteinu se stanoví druhou fluorescenčně značenou protilátkou. Z reakční jamky jsou mikrokuličky nasávy do speciálního průtokového cytometru (Luminexu), kde jsou po hydrodynamické fokusaci vystaveny dvěma laserovým paprskům. Fluorescence po excitaci prvním paprskem definuje spektrum mikrokuličky a určuje tak druh analytu. Intenzita fluorescence po průchodu druhým laserem určuje množství stanovované látky. Výsledná koncentrace je pak vypočtena z kalibrační křivky daného proteinu (Šafarčík et al., 2018).

4.13.3 Microblot-Array

Tato metoda je kombinací klasického Imunoblotu (Western blotu) a ELISA metody (TestLine Clinical Diagnostics s.r.o., 2023). Klasický Imunoblot už je sám o sobě kombinací dvou laboratorních metod. V prvním kroku dojde k separaci proteinů (antigenů) pomocí gelové ELFO či Izoelektrické fokusace na základě rozdílné hybnosti v elektrickém poli. Dalším krokem je otisk na nitrocelulosovou membránu tzv. blotting který, umožní přesun pomocí difúze či jednosměrného elektrického proudu, rozdělených proteinů do pevné fáze, kde jsou fixovány. Tyto kroky provádí výrobce komerčně dodávaného setu. V laboratoři se provádí druhá část stanovení, a to přidání patientského séra k antigenům na nitrocelulózové stripy, vytváření imunokomplexů během inkubace v případě, že sérum obsahuje příslušné protilátky a následná vizualizace pomocí EIA či fluorescenčně (Bartůňková, Paulík, 2011).

V případě Microblotu je nitrocelulózový strip nahrazen mikrotitrační destičkou s jamkami a specifické protilátky se tak vážou na antigeny v jamce, stejně jako u metody ELISA. Po navázání protilátek na antigeny v jamce a promytí nenavázaných částí se protilátky konjugují se sekundární protilátkou, která je značena alkalickou fosfatázou. Následuje další promytí a inkubace enzymu se substrátem, což vede ke vzniku nerozpustného barevného produktu. Intenzita zbarvení je přímo úměrná množství protilátek v séru. Tato intenzita je měřena pomocí ELISA analyzátoru se speciálním Microblot-Array Readerem. Speciálním softwarem jsou následně naměřené hodnoty zpracovány a vyhodnoceny (TestLine Clinical Diagnostics s.r.o., 2023).

4.14 Biosenzorové metody

Biosenzor je specifický druh analytického zařízení, které se skládá z biologického indikačního prvku a fyzikálně-chemického převaděče (Dastyh et al., 2014). Tato zařízení lze rozdělit do několika skupin, a to podle druhu biologického prvku nebo převaděče. Biologické prvky neboli bioreceptory mají za úkol rozpoznat daný analyt, který je následně převodníkem zpracován na detekovatelné měřitelné parametry. Takovým parametrem je nejčastěji elektrický signál, jehož intenzita je přímo úměrná koncentraci hledané látky ve vzorku (Lazcka et al., 2007).

Jako bioreceptory nejčastěji vystupují protilátky, enzymy, buňky, nukleové kyseliny, či bakteriofágy (Lazcka et al., 2007). Bioreceptory lze rozdělit na biokatalytické (enzymy, buňky), u kterých je analyt přeměněn v průběhu chemické reakce a bioafinitní (protilátky, nukleové kyseliny), kdy je analyt vázán ve vznikajícím komplexu (Skládal, 2002).

Biosenzor, který má na svém povrchu navázanou protilátku nebo antigen, se nazývá imunosenzor. Daná složka pak reaguje se svým protějškem za tvorby imunokomplexu Ag-Ab, který je následně detekován (Skládal, 2002).

Detekce je nejčastěji založena na optickém (povrchová plasmatická rezonance, optické vlákno, Ramanova spektroskopie), hmotnostním (piezoelektrické, magnetoelastické) či elektrochemickém principu (amperometrie, potenciometrie, konduktometrie, impedimetrie) (Lazcka et al., 2007).

Co se výhod využití v klinické praxi týče, jde o metody levné, snadné, přesné, specifické a velmi citlivé (Devi et al., 2022).

4.14.1 LFIA

Jednou z možných forem biosenzorových metod vhodných pro sledování postvakcinační odpovědi může v budoucnu být i LFIA (*laterární průtoková analýza*). Tato metoda našla své využití především u POC (*Point Of Control*) diagnostiky, neboť zajišťuje oproti sérologickým metodám rychlou detekci vytvořených protilátek. Principem LFIA je tenkovrstvá chromatografie. Test se provádí z kapky lidské plné krve. Z aplikační zóny je kapka krve kapilární silou nasáta až k místu, kde probíhá konjugace. Zde jsou specifické IgG a IgM protilátky ze vzorku zachyceny imobilizovanými antihumálními protilátkami. K rozpoznání protilátek ve vzorku dojde díky nanočásticím koloidního zlata označenými antigenem patogena. Vzniklé komplexy se kumulují v testovací zóně, která se v případě pozitivity zbarví.

Proužek obsahuje i kontrolní zónu. Tato kontrolní zóna by se měla zbarvit pokaždé, jelikož vypovídá o funkčnosti testu a správnosti provedení stanovení. Jelikož se jedná o diagnostický test prováděný u lůžka pacienta, tak odečet a interpretace výsledku testu jsou závislé na osobě, která test opticky zhodnotí. V tomto případě je test do jisté míry zatížen chybou v subjektivním způsobu odečtu. Existují varianty, jak tuto chybu eliminovat a zvýšit citlivost testu, např. externími čtečkami nebo spektrofotometrickým hodnocením, ale to všechno vyžaduje další přístroje, které by ztížily POC analýzu. Citlivost testu lze zvýšit i využitím jiných variant nanočástic. Například lze využít fluorescenční polovodivé nanokrystalky, tzv. kvantové tečky, dále latexové, magnetové, uhlíkové či křemíkové částice (Spicuzza et al., 2023).

4.14.2 Elektrochemické imunosenzory

Tato zařízení jsou založena na přeměně biologického signálu na elektrický proud, nebo lze detekovat změnu potenciálu způsobenou interakcemi na rozhraní senzor-vzorekmatrice. Ve srovnání s optickými metodami umožňují elektrochemické metody analyzovat i zakalené vzorky. I z finančního hlediska jsou tyto metody mnohem výhodnější. Na druhou stranu elektrochemické metody mají nižší citlivost a selektivitu (Lazcka et al., 2007). Selektivní kvantitativní analýzu protilátek lze vylepšit modifikovanými nanočásticemi (např. hydroxidu nikelnatého). Využití nanočástic zlepšuje výkon, stabilitu, citlivost a rychlost, proto je možné do 20 minut detekovat hladiny IgM a IgG protilátek (Devi et al., 2022).

4.15 Interpretace výsledků

Způsob interpretace výsledků záleží na metodě. Hladiny imunoglobulinů musíme vždy interpretovat v rámci celého obrazu a v souvislosti se všemi aspekty u daného pacienta v průběhu nemoci. Zvláštní interpretaci vyžadují nálezy u imunodeficitních a autoimunitních osob či u osob, jejichž patologický náleznepřímou poruše imunitního systému, ale je důsledkem onemocnění jater či ledvin (Bartůňková, Paulík, 2011).

Dále v interpretaci, zejména z časového hlediska, hraje roli tzv. izotopový přesmyk, který nám umožňuje sledovat dynamiku tvorby protilátek. Na začátku zánětu čili v první fázi imunitní odpovědi, jsou typické IgM. Pro sekundární imunitní odpověď je specifická sekrece specifických IgG protilátek (Bartůňková, Paulík, 2011).

5 METODY SLEDOVÁNÍ POSTVAKCINAČNÍ ODPOVĚDI BUNĚČNÉ SLOŽKY IMUNITY

Buněčná imunita je zprostředkována leukocyty. Buněčnou složku, stejně tak jako tu humorální, můžeme rozdělit na nespecifickou (neutrofilů, eozinofilů, bazofilů, monocytů a NK buňky) a specifickou (T-lymfocyty) (Bartůňková, Paulík, 2011). Aktivní imunizace vede u T-lymfocytů k aktivaci, diferenciaci a klonální expanzi, zároveň dochází k tvorbě imunologické paměti (Jílková, 2012).

Po aktivaci T-lymfocytů dochází k produkci cytokinů. Cytokiny jsou látky glykoproteinové povahy, které fungují jako regulátory imunitní odpovědi a zprostředkovávají komunikaci mezi imunitním systémem, jeho jednotlivými částmi a zbytkem organismu. Způsob působení se u každého cytokinu liší. Jejich účinky mohou být pleiotropní, vzájemně překrývající, zesilující či naopak, mohou působit proti sobě. I vzdálenost, na kterou působí je rozdílná. Rozeznáváme autokrinní, parakrinní a endokrinní působení. Podle funkce je dále dělíme na interleukiny, ovlivňující vývoj a aktivaci lymfocytů, chemokiny, molekuly s chemotaktickou aktivitou a interferony, složky neadaptivních antivirových mechanismů a regulátory imunity. Společně pak vytvářejí tzv. cytokinovou síť (Ferenčík et al., 2005).

5.1 Separace a izolace buněk

Separace buněk z plné krve je nezbytným základem pro testování buněčné imunity. Způsobů, kterými lze buňky separovat je hned několik, liší se zejména čistotou získané populace. Od toho se následně odvíjí i cena přístroje (Bartůňková, Paulík, 2011).

5.1.1 Gradientová centrifugace

Nejčastějším způsobem izolace je separování buněčných struktur gradientovou centrifugací, která rozdělí buňky podle jejich hustoty. Vzorek plné krve je centrifugován ve vhodném gradientním médiu při určité rychlosti (Bartůňková, Paulík, 2011). Buňky lze separovat pomocí kontinuálního či diskontinuálního gradientu. Po centrifugaci s kontinuálním gradientem jsou částice rozdělené rovnoměrně. Ve zkumavce vidíme plynulé přechody podle změny hustoty. Separace s diskontinuálním gradientem způsobí jasné přechody mezi jednotlivými liniemi. Tím je ulehčena i jejich následná izolace (Beckman Coulter, Inc., 2023). K tomuto způsobu separace se nejčastěji jako gradientové médium využívá roztok Ficoll. Ten plnou krev rozdělí tak, že po centrifugaci vidíme na povrchu oddělenou plazmu s trombocyty, pod nimi je vrstva lymfocytů a monocytů, ty jsou od erytrocytů odděleny vrstvou gradientového média (Bartůňková, Paulík, 2011). Vrstva lymfocytů a monocytů tvoří

populaci mononukleárních buněk, která se v praxi označuje zkratkou PBMC (*Peripheral blood mononuclear cells*) (Kleiveland, 2015). Optimální teplota centrifugace je 18-20 °C. Při vyšších teplotách se snižuje životnost separovaných buněk a dochází k agregaci erytrocytů. Při nižších teplotách se snižuje úspěšnost separace. Tuto metodu lze použít pro přípravu buněk k funkčním testům jako je test proliferace, průtoková cytometrie či ELISpot (Bartůňková, Paulík, 2011).

5.1.2 Izolace lymfocytů a monocytů

Pokud ještě potřebujeme oddělit lymfocyty od monocytů, musíme přidat další krok izolace. K izolaci monocytů se nejčastěji využívá jejich schopnosti adherence na plastový povrch kultivační misky (lymfocyty pak zůstávají v supernatantu) (Bartůňková, Paulík, 2011).

5.1.3 Imunodenzní separace T-lymfocytů

Izolace T-lymfocytů byla umožněna díky jejich interakci s ovčími erytrocyty. Molekula CD2 na povrchu lymfocytů funguje jako receptor pro ovčí erytrocyty a T-lymfocyty s nimi poté vytvářejí rozety. Pro izolaci lymfocytů inkubujeme plnou krev s ovčími erytrocyty a neuramidázou, která rozdělí krevní elementy na ty, jež vytvářejí rozety a na ty, které ne. Obě populace jsou pak odseparovány gradientovou centrifugací. T-lymfocyty a erytrocyty jsou od sebe následně odděleny osmotickou lýzou. Dnes se tato metoda moc často nevyužívá, neboť v průběhu dochází často k aktivaci buněk, což následně ovlivní další stanovení (Bartůňková, Paulík, 2011).

5.1.4 Sedimentace

Principem sedimentace je prostá gravitace. Zkumavka plné krve se nechá určitou dobu odstát, větší a kondenzovanější částice začnou pomalu klesat ke dnu. Sedimentaci lze urychlit centrifugací nebo přidáním erytrocytárních agregačních činidel. Po ustálení sedimentace jsou lymfocyty součástí tzv. buffy coatu, což je směs leukocytů a trombocytů usazená mezi sérem a erytrocyty (STEMCELL Technologies, 2023).

5.1.5 Imunomagnetická separace (MACS)

Magnetické partikule jsou potaženy protilátkou. Po inkubaci dojde k navázání těchto partikulí na buňky, jež exprimují příslušné antigeny. Populace je vložena do magnetického pole, v němž jsou zachyceny buňky s navázanou protilátkou a ostatní volně procházejí. V tuto chvíli záleží, která část buněk nás zajímá. V případě, že jsou naším středem pozornosti buňky s navázanou protilátkou, jedná se o tzv. pozitivní selekci, v opačném případě se jedná o selekci negativní. Vhodnější je využívat negativní selekci, neboť získaná populace

není doposud nikterak dotčena. Jediná limitace, která zde hraje roli, je dostupnost protilátek. Způsob stanovení se může u jednotlivých výrobců lišit (Bartůňková, Paulík, 2011).

5.1.6 Separace pomocí průtokové cytometrie (FACS)

Fluorescencí aktivované třídění buněk (FACS) využívá principu průtokové cytometrie s fluorescenčním značením. Fluorescenčně značené protilátky se vážou na antigeny cílových buněk. Buňky jsou následně změřeny na průtokovém cytometru. Na základě rozptylu laserových paprsků, se kterými se buňky v průběhu měření střetnou, a intenzitě fluorescenčního záření, jsou rozděleny do sběrných zkumavek (Bartůňková, Paulík, 2011). Takto dokážeme izolovat buňky nejen podle velikosti či hustoty, ale i na základě intracelulárních markerů a hladin exprese povrchových markerů. I přesto, že je imunomagnetické třídění buněk rychlejší a levnější, není zdaleka tak přesné (STEMCELL Technologies, 2023).

5.2 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je standartní metodou pro kvalitativní a kvantitativní cytomorfologické vyšetření krevních elementů (Dastych et al., 2014). Jedná se o techniku, kterou je možné provádět počítání buněk, fenotypizaci, hodnotit buněčný cyklus a životaschopnost buněk. Stanovení probíhá v průtokových cytometrech, které se skládají ze tří systémů. Fluidní systém představuje kapalinu, nejčastěji pufrovaný fyziologický roztok, která pod tlakem vhání buňky do optického systému. Optický systém se skládá z excitační (lasery) a sběrné (fotonásobiče, fotodiody) optiky. Tradiční průtokový cytometr obsahuje jeden laser, v dnešní době již existují i cytometry s větším množstvím laserů. V optickém systému dochází k produkci viditelného a fluorescenčního světla, které je následně analyzováno elektronickým systémem. K detektorům světlo putuje přes systém filtrů. Fluorescenční světlo přechází přes filtry dichroické, viditelné světlo přes filtry pásmové. Detektor zaznamená signál, který je následně převeden elektronickým systémem a počítačově vyhodnocen (McKinnon, 2018).

Buněčná populace se nejprve označí specifickými monoklonálními protilátkami s navázaným fluorochromem. Protilátky se mohou vázat na povrchové i intracelulární struktury buněk. Označené buňky jsou nasány do průtokového cytometru. Přetlakem je buněčná suspenze fluidním systémem vháněna do malého otvoru, čímž dojde k tzv. hydrodynamické fokusaci. To znamená, že se buňky seřadí za sebe a následně může jedna po druhé procházet měřicím systémem. Buňka v určitém bodě přetne paprsek laseru, to vede k odrazu a rozptylu světla (Bartůňková, Paulík, 2011). Velikost rozptylu v přímém směru (*Forward*

Scatter – FSc) závisí na velikosti buňky. Velikost odrazu paprsku do stran (*Side Scatter – SSc*) záleží na vnitřní struktuře a granularitě buňky (McKinnon, 2018). Vlivem ozáření fluorochromů laserem dojde k excitaci a vyzáření fluorescenčního světla. Díky využití více různých fluorochromů lze vyšetřit více antigenů v každé buňce v průběhu jednoho měření. Tímto způsobem získáváme primární data (Bartůňková, Paulík, 2011).

Analýza umožňuje hledat vztah mezi libovolnými měřenými parametry. Pomocí softwaru lze výsledky převést do grafické podoby. Histogramy nám zobrazují procenta pozitivních buněk pro daný parametr a intenzitu fluorescence určité populace. Vzájemný vztah mezi dvěma parametry lze vyčíst z dvojrozměrných bodových grafů v praxi známými pod názvem dot-ploty. Každá buňka je v nich na základě svých parametrů zobrazena tečkou v příslušném sektoru. Pro vztah tří a více parametrů se využívá tzv. gatovací strategie. Na základě jednoho či dvou znaků je vybrána subpopulace buněk, z jejichž výsledků je zhotoven graf. Z vytvořeného grafu se následně vybere další část té samé subpopulace, na základě dalších parametrů se vytvoří druhý graf (Bartůňková, Paulík, 2011).

Jedním z problémů multiparametrové průtokové cytometrie je překryv spekter jednotlivých fluorochromů. Z toho důvodu je naprosto nezbytná kompenzace. Ke kompenzaci se používají pozitivní a negativní kompenzační kontroly a speciální software využívající matematické algoritmy, kterým jsme schopni od sebe oddělit jednotlivé signály fluorochromů (Bio-Rad Laboratories, 2023). Spektrální analyzátoři jsou speciální průtokové cytometry, které umějí s tímto problémem pracovat. Namísto maximální emise proměří celé fluorescenční emisní spektrum každého fluorochromu, který je ve vzorku obsažen, a vytvoří si knihovnu spekter, která následně během analýzy umožní rozlišení jednotlivých spekter a spektra se pak během analýzy nemíchají (McKinnon, 2018). Další problémy mohou nastat při výběru vhodných informací o buňkách, které mají klinický význam. Důležitá je též správná interpretace výsledků (Bartůňková, Paulík, 2011).

Své uplatnění nachází zejména při stanovení lymfocytárních subpopulací, stanovení exprese specifických molekul, detekce HLA haplotypu, při detekci cytokinů, oxidačního vzplanutí neutrofilů, cytotoxické aktivity lymfocytů, fagocytózy, intracelulárního vápníku a k určení zastoupení hematopoetických progenitorů. Průtoková cytometrie není využívána jen v imunologii, ale v hematologii, onkologii a výzkumu (Bartůňková, Paulík, 2011).

5.2.1 Stanovení povrchových znaků – Imunofenotypizace

Jedná se o nejpoužívanější aplikaci průtokové cytometrie. Fluorescenční protilátky se váží na povrchové antigeny buněk. Většina těchto antigenů jsou označovány jako tzv. CD znaky (*Cluster of Differentiation*). Zkratka CD a příslušné číslo označuje diferenciační skupinu, do které daná buňka spadá. CD znaky nejčastěji charakterizují příslušnou populaci dané buňky, krom toho lze CD znaky označovat i aktivační, proliferační, paměťové a antigeně specifické markery, markery chemokinových receptorů, které charakterizují danou populaci (McKinnon, 2018).

5.2.2 Detekce intracelulárních cytokinů

Využívá se k rozlišení Th1 a Th2 populace T-lymfocytů. Nejčastěji detekujeme hladiny interferonu gama a interleukinu 4 u stimulovaných a nestimulovaných buněk. Stimulace je vyvolána PMA (*phorbol-myristoyl acetát*), inoforem, či specifickým antigenem. Po stimulaci probíhá inkubace v monensinu nebo brefeldinu A, které zabraňují transportu cytokinů z buněk (Bartůňková, Paulík, 2011). Cytokiny se tak v buňce kumulují, což umožňuje jejich detekci. Po inkubaci jsou buňky označeny protilátkami na imunofenotypizaci. Pro detekci intracelulárních struktur je třeba buňky v dalším kroku nechat fixovat a následně permeabilizačním činidlem narušit membránu tak, aby přes ni mohlo vstoupit intracelulární barvení s anticytokinovými protilátkami do buňky (McKinnon, 2018).

5.2.3 Blastická transformace

K blastické transformaci lymfocytů dochází po stimulaci specifickým antigenem či mitogenem. Lymfocyt následně prolifereje a maturuje do aktivní efektorové formy. Své uplatnění nachází zejména v diagnostice imunodeficiencí a jiných poruch imunitního systému, zároveň je vhodný i k hodnocení imunosupresivní léčby (Vlas et al., 2018).

Test proliferace lymfocytů založený na průtokové cytometrii má několik variant, vždy ale využívá značení proliferujících buněk. Fluorescenčním barvením propidium bromidem lze obarvit jadernou DNA a po odstranění interferující RNA lze detekovat změny v množství DNA během buněčného cyklu. Druhou variantou je barvení intracelulárních proteinů a detekce změn jejich množství v průběhu dělení. Nejčastěji využívané barvivo cytoplazmatických proteinů je CFSE (*carboxyfluorescein succinimidyl ester*). Pomocí monoklonálních protilátek s intracelulárním značením lze stanovovat hladiny proteinů, které buňka začne produkovat po aktivaci buněčného dělení. Tímto způsobem nejčastěji detekujeme znak buněčné proliferace Ki-67 (Vlas et al., 2018).

5.3 Test blastické transformace bez využití průtokové cytometrie

Jedná se o radioizotopovou metodu a během stanovení se využívá beta záření, proto musí laboratoř odpovídat kritériím atomového zákona. V dnešní době je však tendence tuto metodu nahrazovat alternativou bez využití radioaktivního záření, kterou je výše popsaná průtoková cytometrie (Vlas et al., 2018).

Test lze provádět z nesrážlivé plné krve či z izolovaných lymfocytů, jejichž koncentrace je upravena na požadovanou hodnotu. Upravení koncentrace lymfocytů test standardizuje. Stimulace se specifickým antigenem je poměrně zdlouhavá, vyžaduje přibližně týdenní kultivaci v inkubátoru s 5 % CO₂. Po uplynutí této doby je k buňkám přidán ³H-thymidin, po další inkubaci, během které došlo k inkorporaci ³H-thymidinu do DNA nově vytvořených buněk, je možné pomocí detektoru beta záření, tzv. β-countrem, kvantifikovat proliferační aktivitu zkoumaných lymfocytů. Referenční hodnoty jsou v populaci velmi variabilní, a proto je důležité data hodnotit na základě souboru dat získaných měření vzorků zdravých jedinců za stejných podmínek (Bartůňková, Paulík, 2011).

K vyhodnocení se používá stimulační index (SI), jedná se o poměr aktivity stimulovaných a nestimulovaných buněk. Pro jednotlivé antigeny se za pozitivní považuje SI > 5. v případě využití mitogenů, či polyklonálních aktivátorů je za pozitivní považovaná hodnota SI > 100 (Bartůňková, Paulík, 2011).

5.4 Cytotoxické testy

Variant cytotoxických testů je celá řada, všechny však sledují schopnost cytotoxických T-lymfocytů a NK buněk ničit virem napadené, nebo nádorové buňky. Buněčná cytotoxicita je zprostředkována systémem Perforin/Gramzym B, které po aktivaci lymfocytu migrují k povrchu cytoplazmatické membrány a uvolňují se do mezibuněčného prostoru. Perforin naruší membránu infikované buňky a umožní vstup Gramzimu B, který pak aktivací prokaspázy 3 aktivuje apoptózu cílové buňky. V případě, že je tato schopnost leukocytů narušena, jedná se o onemocnění zvané hemofagocytující lymfohistiocytóza. V důsledku tohoto onemocnění může být pacient ohrožen na životě, neboť dochází jak k progresi infekce, tak také k aktivaci buněk a produkci cytokinů, což může mít za následek multiorgánové selhání až smrt (Bartůňková, Paulík, 2011).

Zlatým standardem mezi cytotoxickými testy je metoda založená na produkci radioizotopu ⁵¹Cr cílovými buňkami. Po inkubaci cílových buněk označených ⁵¹Cr s aktivovanou

populací efektorových buněk stanovujeme pomocí přístroje gama-counteru aktivitu záření gama. Samotný test trvá 6-8 hodin, ale příprava efektorových buněk, které opakovaně stimuluje určitým antigenem, může trvat i několik týdnů (Bartůňková, Paulík, 2011).

5.5 ELISPOT

Enzyme-linked Immuno Spot Assay byla metoda původně určená k detekci protilátek B-lymfocytů. Později došlo k modifikaci a metoda se začala hojně využívat k detekci aktivovaných T-lymfocytů (Bartůňková, Paulík, 2011).

Princip metody je založen na interakci specifické anticytokinové protilátky s cytokinem, který je produkován aktivovaným antigeně specifickým T-lymfocytem. Anticytokinové protilátky jsou navázány na dně jamky na membránu z nitrocelulosity či PVDF (*polyvinylidenefluorid*). Tato metoda využívá sendvičové uspořádání. Prvním krokem stanovení je primoinkubace vzorku plné krve či PBMC v jamkách mikrotitrační destičky s primární anticytokinovou protilátkou v termostatu nastaveném na teplotu 37 °C a 5 % CO₂. Doba inkubace se může u jednotlivých typů buněk a cytokinů lišit. Obvykle se pohybuje mezi 6-24 hodinami. Po inkubaci se odstraní nenavázané složky a do jamky se přidá biotinylovaná polyklonální protilátka specifická pro daný analyt. Po druhé inkubaci je opět odstraněna přebytečná nenavázaná protilátka. Dále se přidá enzym, nejčastěji alkalická fosfatáza konjugovaná se streptavidinem a po opětovném promytí se přidá substrát BCIP/NBT (*5-brom-4-chlor-3-indolylfosfát/nitrotetrazolium*). Vyhodnocení pak probíhá na speciálním readeru či pod mikroskopem, kde jsou detekovány barevné skvrny. Každá skvrna reprezentuje jednu buňku secernující příslušný cytokin (R&D Systems, Inc., 2023).

Základem úspěchu této metody jsou aktivované T-lymfocyty. Pro zvýšení pravděpodobnosti dostatečné aktivace buněk lze PBMC preinkubovat s příslušným antigenem, vůči kterému by měly být buňky specifické. Další možností je preinkubace s mitogeny, ale tato varianta je poměrně riskantní, neboť může vést k nadměrné stimulaci, která vede ke vzniku velkého počtu skvrn na jamku, skvrny se pak mohou překrývat, což znesnadní kvantifikaci (Bartůňková, Paulík, 2011).

V laboratorní praxi se setkáme s ELISpoty pro detekci INF γ , Gramzymu B, TGF- π , IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12a, IL-17a, TNF α a chemokinů (Slota et al., 2011).

Speciální modifikací je FLUOROSpot, kdy je detekční protilátka značená fluoroforem. Tato modifikace umožňuje stanovení více cytokinů v jedné buňce. Důležitá je však

optimalizace stanovení, aby nedocházelo ke zkřížené reaktivitě mezi jednotlivými protilátkami (Slota et al., 2011).

ELISpot se uplatní při detekci a kvantifikaci antigenně specifických T-lymfocytů, zejména při detekci postvakcinační odpovědi, a při sledování frekvence antigenně specifických T-lymfocytů v průběhu infekčních chorob. Tuto metodu je možné využít také ke sledování průběhu nemoci, kde můžeme nalézt změny ve frekvenci buněk produkujících cytokiny. Další uplatnění nachází při monitoraci léčiv ovlivňujících produkci cytokinů, během klinických studií zkoumajících nádorovou imunoterapii či alergenovou imunoterapii (Bartůňková, Paulík, 2011).

Největší výhodou, kterou ELISpot přináší, je vysoká citlivost, která mnohonásobně převyšuje citlivost imunoanalytické metody. Příznivá je i cena a rychlost stanovení (Slota et al., 2011).

Při stanovení má největší vliv kvalita a životaschopnost vyšetřovaných buněk, proto je velmi důležitá správná manipulace s buňkami, zejména při jejich obnově ze zmrazených vzorků. Další významnou roli zde hraje i zručnost a kvalifikovanost personálu. Vliv na stanovení mají i použitá činidla, která se v závislosti na výrobci liší, a způsob odečtu (Slota et al., 2011).

5.6 IGRA testy

Tato skupina testů je založena na produkci IFN γ aktivovanými antigenně specifickými T-lymfocyty. Odtud také pramení zkratka IGRA (*Interfero Gama Release Assay*). V rutinní praxi se tyto testy využívají především k diagnostice tuberkulózy. IGRA testy lze provést v podobě ELISpotu či jako ELISA (Banaei et al., 2023).

5.7 Multiplexní stanovení cytokinů a chemokinů

Princip multiplexových metod byl již popsán v kapitole o metodách zaměřených na humorální imunitu. Jelikož cytokiny jsou stejně jako protilátky produkované aktivovanými B-lymfocyty bílkovinné povahy, je možné u nich aplikovat velmi podobný způsob stanovení. Při aplikaci multiplexových metod na stanovení cytokinů, využíváme zejména reakce na mikrokuličkách (Bead Arrays), díky které jsme schopni z malého objemu vzorku rychle stanovit celý cytokinový profil (CUSABIO TECHNOLOGY LLC, 2023).

5.8 PCR

Polymerázová řetězová reakce je molekulárně biologická metoda založena na principu enzymatické amplifikace určité sekvence DNA in vitro. Cyklus probíhá ve třech teplotních fázích. První fází je denaturace, kdy při teplotě 95 °C dojde k rozložení dvoušroubovice DNA na dvě samostatná vlákna. Další fází je hybridizace neboli také annealing, kdy při teplotě 50-60 °C nasednou specifické komplementární primery na jednotlivá vlákna DNA. Třetí fází je elongace, kdy při teplotě 72 °C termostabilní DNA polymeráza napomáhá syntéze nových vláken. Po dokončení syntézy jsou ve zkumavce dva identické řetězce DNA. Celý cyklus se mnohonásobně opakuje. Po dokončení každého cyklu je počet dvoušroubovic DNA ve zkumavce dvojnásobný (Bartůňková, Paulík, 2011).

PCR technologie se v současné době staly zlatým standardem ve výzkumu i v diagnostice infekčních patogenů, zejména virového původu, genetických mutací a genových produktů (Bartůňková, Paulík, 2011).

Pro analýzu produktů PCR se často využívá gelová elektroforéza, jelikož fragmenty DNA lze dělit na základě jejich relativní molekulové hmotnosti a velikosti náboje. U qPCR slouží spíše pro kontrolu a vlastní analýza vychází z fluorescenčních křivek, které zaznamenávaly průběh reakce (Bartůňková, Paulík, 2011).

5.8.1 RT-PCR

Jednou z možných variant PCR je tzv. reverzně transkriptázová PCR. Využívá se zejména pro měření genové exprese. Pomocí reverzní transkriptázy jsme schopni mRNA převést na cDNA, úseky DNA jsou pak namnoženy klasickým způsobem (Bartůňková, Paulík, 2011).

5.8.2 qPCR

Další možnou modifikací je kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR). Tato metoda využívá fluorescenčně značené oligonukleotidové sondy, které nasedají na sekvence nově vytvořené DNA. Na rozdíl od klasické PCR, kde je sledován konečný produkt, je u této metody sledován každý cyklus ve skutečném čase. Množství produktu je přímo úměrné změně intenzity fluorescence. Kvantitativní PCR má své uplatnění zejména pro kvantifikaci virových náloží v průběhu infekce u imunodeficitních pacientů a u pacientů po transplantaci (Bartůňková, Paulík, 2011). Pomocí reverzní kvantitativní PCR tak lze detekovat a kvantifikovat expresi cytokinových genů (CUSABIO TECHNOLOGY LLC, 2023).

5.9 Interpretace výsledků

Interpretace výsledků se odvíjí od použité metody. Hodnocení výsledků buněčné imunity vyžaduje zpravidla určité znalosti a zkušenosti odečítajícího laboranta, neboť patologické výsledky nemusejí pramenit čistě jen z poruchy imunity, ale mohou být následkem jiného, často nádorového či hematologického onemocnění (Bartůňková, Paulík, 2011).

PRAKTICKÁ ČÁST

6 CÍL A ÚKOLY PRÁCE

6.1 Hlavní cíl

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo ověření, zda metody pro sledování T-buněčné odpovědi jsou schopné poskytnout relevantní výsledky. Součástí hlavního cíle bylo i sumarizovat teoretické poznatky o metodách, které zkoumají postvakcinační odpověď.

6.2 Dílčí cíle

1. Ověření možností kultivace lymfocytů po kryokonzervaci.
2. Ověřit strategii analýzy pro cytokinový profil.
3. Ověřit strategii analýzy pro proliferační profil.

7 VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY

Výzkumná otázka č. 1: Je buněčnost a životnost po kryokonzervaci dostatečná?

Výzkumná otázka č. 2: Reagují T-lymfocyty na nespecifickou a specifickou stimulaci?

Výzkumná otázka č. 3: Sledujeme změny po vakcinaci u pacientů s imunosupresí a bez imunosuprese?

8 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU

Sledovaný soubor tvoří 50 subjektů, z čehož 30 subjektů má diagnostikované autoimunitní onemocnění (Ulcerózní kolitida, Crohnova choroba) a 20 subjektů slouží jako zdravá kontrola. Vzorke byly odebírány před očkováním na covid-19 a 4 týdny po ukončení plného dvou dávkového schématu očkování.

9 METODIKA PRÁCE

Veškerá práce s buněčnou kulturou probíhala za sterilních podmínek v laminárním boxu.

9.1 Příprava vzorků ke kryokonzervaci

9.1.1 Separace na hustotním gradientu

Plná krev z každého vzorku byla zředěna v poměru 1:1 kultivačním médiem RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*). Do centrifugačních zkumavek byly pipetovány 2 ml flo- tačního roztoku Histopaque o hustotě $1,077 \text{ g/cm}^3$. Dále byla do zkumavek přidána naře- děná suspenze jednotlivých vzorků. Všechny zkumavky byly centrifugovány 20 minut při 2200 otáčkách za minutu. Po centrifugaci byl opatrně odsán mléčně zkalený prstenec mono- nukleární frakce zadržovaný v hustotním přechodu. Odsátá frakce monocytů a lymfocytů byla přesunuta do nové zkumavky a následně byla frakce promyta roztokem RPMI (10 ml). Po promytí následovala deseti minutová centrifugace při 1800 otáčkách za minutu. Po centrifu- gaci byl slit odstředěný supernatant. Sediment byl ještě 2x promyt 500 μl 10% roztokem FBS (*Fetal Bovine Serum*) (100% roztok FBS byl ředěn roztokem PBS). Nakonec bylo k se- dimentu přidáno 500 μl roztoku FBS, v nichž byla peleta rozvolněna.

9.1.2 Zamrazení

Nejprve bylo připraveno kryomedium, které tvořilo z 80 % roztokem FBS a z 20 % vychlazený DMSO (*Dimethylsulfoxid*). Do označených zkumavek bylo převedeno 0,5 ml suspenze vzniklé v předchozím kroku zpracování a 0,5 ml chladného kryomedia. Zkumavky byly okamžitě uzavřeny a vloženy do mrazicího boxu ($-80 \text{ }^\circ\text{C}$), ve kterém došlo ke zmrazení vzorků.

9.2 Rozmražení kryokonzervovaných vzorků

Z mrazicího boxu byly vyjmuty kryokonzervované vzorky. Vzorky byly vloženy na přibližně 5 minut do předem vytemperované vodní lázně ($37 \text{ }^\circ\text{C}$). Po rozmražení se obsah z každé kryozkumavky převedl do centrifugační zkumavky. Zkumavky byly následně dopl- něny po rysku předem připraveným kultivačním médiem (RPMI s 10% FBS a přísadkou antibiotik a antimykotik). Následovala deseti minutová centrifugace 2200 otáček/min. Po centrifugaci byl slit supernatant a buňky usazené na dně zkumavky byly na vortexu resus- pendovány v 1 ml kultivačního média.

9.3 Test buněčnosti a životnosti

Do Trucount zkumavek bylo pipetováno 50 μ l buněčné suspenze spolu se 100 μ l roztoku propidium jodidu a 400 μ l PBS (*Phosphate Buffered Saline*) (IsoFlow). Následovalo měření na průtokovém cytometru, kde byla získána data informující o počtu a kvalitě buněk.

9.4 Kultivace

Data získaná testem buněčnosti a životnosti na průtokovém cytometru se následně zhodnotila a použila k dosažení do vzorce pro výpočet faktoru ředění. Cílem výpočtu a smyslem ředění bylo získat takové buněčné suspenze, které obsahovaly 1 000 000 buněk v 1 ml svého objemu. Buněčné suspenze byly ředěny kultivačním roztokem RPMI.

Samotná kultivace probíhala ve sterilních cytometrických zkumavkách. Každý vzorek byl rozdělen do dvou zkumavek. Do každé zkumavky bylo pipetováno 0,5 ml buněčné suspenze. Do zkumavek označených + jako pozitivní bylo přidáno 100 μ l 10% PHA (*Phytohemagglutinin*) (roztok byl ředěn kultivačním roztokem RPMI). Do zkumavek označených – jako negativní bylo přidáno 100 μ l kultivačního média RPMI. Všechny zkumavky byly vloženy na 72 hodin do termostatu, který byl vytemperován na 37 °C s obsahem 5 % CO₂ v atmosféře. Vzorky označené jako pozitivní byly po dobu inkubace vystaveny stimulaci mitogenem. Vzorky označené jako negativní sloužily jako nestimulovaná kontrola.

9.5 Značení antigenních determinant po nespecifické stimulaci

Po vyjmutí z termostatu byly buněčné suspenze v cytometrických zkumavkách centrifugovány 3 minuty při rychlosti 1800 otáček/min. Po centrifugaci byl slit odstředěný supernatant. Další zpracování bylo provedeno pomocí diagnostické soupravy PerFix-nc Kit (no centrifuge assay Kit). Cílem bylo navodit permeabilitu cytoplazmatické membrány leukocytů v buněčné suspenzi, díky které lze lépe demonstrovat intracelulární antigenní determinanty pomocí monoklonálních protilátek konjugovaných s fluorochromem.

Do zkumavek bylo přidáno po 5 μ l fixačního roztoku (pufr č. 1). Následovala inkubace 15 minut. Po inkubaci bylo do zkumavek přidáno 300 μ l perforačního roztoku (pufr č. 2) a 30 μ l předem připravené směsi protilátek. Množství přidávaných protilátek odpovídalo tak, aby v pipetovaném množství bylo po 5 μ l každé použité protilátky. Následovala inkubace 30 minut ve tmě. Po inkubaci bylo do zkumavek přidáno po 1,8 ml desetkrát zředěného ukončovacího roztoku (pufr č. 3). Následně byly zkumavky centrifugovány 3 mi-

nuty při rychlosti 1800 otáček/min. Po centrifugaci byl slit odstředěný supernatant. Seditované buňky byly nakonec resuspendovány v 500 µl ukončovacího roztoku a změřeny pomocí průtokové cytometrie.

Tabulka č. 1: Monoklonální protilátky využití při značení antigenních determinant po ne-specifické stimulaci

Znak	Fluorochrom
CD3	PB
CD4	PC5
CD8	PC7
CD25	FITC
CD45	KO
Ki67	PE

Zdroj: vlastní

9.6 Značení antigenních determinant po specifické stimulaci

Vzorky pro stanovení byly po kultivaci vyjmuty z termostatu a centrifugovány 3 minuty při rychlosti 1800 otáček/min. Po centrifugaci byl slit odstředěný supernatant a bylo přidáno 1000 µl roztoku PBS pH 7,4 (koncentrát roztoku PBS byl desetkrát zředěn destilovanou vodou). Zkumavky se opět nechaly centrifugovat 3 minuty při rychlosti 1800 otáček/min. Po centrifugaci byl slit odstředěný supernatant a bylo přidáno 1000 µl fixačního roztoku (PFA 4,2%). Po pěti minutové inkubaci se zkumavky opět centrifugovaly 3 minuty při rychlosti 1800 otáček/min. Po centrifugaci byl slit odstředěný supernatant a bylo přidáno 1000 µl roztoku PBS. Zkumavky se opět nechaly centrifugovat 3 minuty při rychlosti 1800 otáček/min. Po centrifugaci byl slit odstředěný supernatant a bylo přidáno 100 µl 0,1% roztoku tritonu (komerčně dostupný 1% roztok byl zředěn v poměru 1:9 roztokem PBS). Následovala inkubace 10 minut. Po inkubaci se přidalo 1000 µl roztoku PBS a následně se zkumavky nechaly centrifugovat 3 minuty při rychlosti 1800 otáček/min. Po centrifugaci byl slit odstředěný supernatant a bylo přidáno 500 µl 3% roztoku FBS (100% roztok FBS byl ředěn roztokem PBS). Po přidání roztoku FBS se zkumavky opět centrifugovaly 3 minuty při rychlosti 1800 otáček/min. Po centrifugaci byl slit odstředěný supernatant a přidalo se opět 500 µl 3% roztoku FBS. Ze vzniklé suspenze bylo následně odebráno 100 µl do cytometrických zkumavek. V tomto bodě stanovení se jednotlivé vzorky, jak pozitivní, tak negativní rozdělily do dvou panelů. K první polovině vzorků bylo přidáno 45 µl směsi protilátek na stanovení proliferačních znaků. K druhé polovině vzorků bylo přidáno 35 µl směsi tentokrát však na stanovení produkce cytokinů. Směs protilátek byla vytvořena tak, aby napipetované

množství, které se následně přidávalo do zkumavek, obsahovalo 5 µl každé použité protilátky. Obě sady se nechaly inkubovat 30 minut ve tmě. Po inkubaci bylo do všech zkumavek přidáno 500 µl 3% roztoku FBS. Následovala centrifugace 3 minuty při rychlosti 1800 otáček/min. Po centrifugaci byl slit odstředěný supernatant a bylo přidáno 250 µl 3% roztoku FBS. Zkumavky se poté centrifugovaly ještě jednou 3 minuty při rychlosti 1800 otáček/min. Po centrifugaci se slit odstředěný supernatant. Nakonec se buňky resuspendovaly v 450 µl 3% roztoku FBS a změřily na průtokovém cytometru.

Tabulka č. 2: Monoklonální protilátky využité při značení antigenních determinant po specifické stimulaci – proliferační profil

Znak	Fluorochrom
CD3	PB
CD4	APCAF750
CD8	PC7
CD27	APC
CD45	KO
CD45RO	FITC
CD69	APCAF700
CD137	PC5
Ki67	PE

Zdroj: vlastní

Tabulka č. 3: Monoklonální protilátky využité při značení antigenních determinant po specifické stimulaci – cytokinový profil

Znak	Fluorochrom
CD3	PB
CD4	APCAF700
CD8	PC7
CD45	KO
CD107a	APC
INFg	PE
TNFα	FITC

Zdroj: vlastní

9.7 Stanovení vzorků sledovaného souboru před a po očkování

9.7.1 Rozmražení kryokonzervovaných vzorků

Kryokonzervované vzorky byly vyjmuty z mrazicího boxu a rozmrazeny ve vodní lázni vytemperované na 37 °C. Po rozmražení se obsah každé kryozkumavky převedl do centrifugační zkumavky, která byla následně doplněna po rysku kultivačním médiem (RPMI s 10% FBS a přídatkem antibiotik a antimykotik). Všechny zkumavky byly centrifugovány

po dobu 3 minut rychlostí 1800 otáček/min. Po centrifugaci byl slit supernatant a buňky usazené na dně zkumavky byly na vortexu resuspendovány v 1 ml kultivačního média.

9.7.2 Test buněčnosti a životnosti

Do Trucount zkumavek bylo pipetováno 50 µl buněčné suspenze spolu se 100 µl roztoku propidium jodidu a 400 µl PBS (IsoFlow). Následovalo měření na průtokovém cytometru. Z dat získaných měření byly získány informace o životaschopnosti a počtu buněk ve zkumavkách. Naměřené hodnoty o počtu buněk byly dosazeny do vzorce pro výpočet faktoru ředění buněčné suspenze. Cílem výpočtu a smyslem ředění bylo opět získat takové buněčné suspenze, které obsahovaly 1 000 000 buněk v 1ml svého objemu. Buněčné suspenze byly ředěny kultivačním roztokem RPMI.

9.7.3 Kultivace

Kultivace probíhala ve sterilních cytometrických zkumavkách. Do každé zkumavky bylo napipetováno 0,5 ml buněčné suspenze, 4 µl roztoku BD Golgistopu a 500 µl roztoku peptidových poolů SARS-CoV-2 (S1). Všechny zkumavky byly vloženy na 72 hodin do termostatu, který byl vytemperován na 37 °C s obsahem 5 % CO₂ v atmosféře.

9.7.4 Značení antigenních determinant

Postup stanovení po kultivaci byl shodný s postupem na stanovení antigenních determinant po specifické stimulaci. Jediný rozdíl byl ve složení směsi použitých monoklonálních látek.

Tabulka č. 4: Monoklonální protilátky využité při značení antigenních determinant při stanovení vzorků sledovaného souboru – proliferační profil

Znak	Fluorochrom
CD3	PB
CD4	APCAF750
CD8	PC7
CD27	APC
CD45	KO
CD45RO	FITC
CD69	APCAF700
CD137	PC5
Ki67	PE

Zdroj: vlastní

Tabulka č. 5: Monoklonální protilátky využité při značení antigenních determinant při stanovení vzorků sledovaného souboru – cytokinový profil

Znak	Fluorochrom
CD3	PB
CD4	APCAF700
CD8	PC7
CD45	KO
CD107a	APC
INF γ	PE
TNF α	FITC

Zdroj: vlastní

Pro analýzu byly vybrány znaky charakterizující lymfocytární populaci. Povrchový znak CD3 prezentuje populaci T-lymfocytů, kterou lze dělit na několik subpopulací. Jako pomocné T-lymfocyty je v praxi označována subpopulace CD4 pozitivních T-lymfocytů. Subpopulace s pozitivním znakem CD8 je charakteristická pro cytotoxické T-lymfocyty.

CD45RO je jednou z izoform povrchového znaku CD45. Tato izoforma je znak typický pro paměťové T-lymfocyty. Základní znak CD45 je produkován všemi hematopoetickými buňkami.

Detekci produkce INF γ a exprese povrchových znaků CD27, CD69, CD137 a CD107a, lze u T-lymfocytů hodnotit stav jejich diferenciaci, stimulaci a aktivaci. Měření intracelulární exprese Ki67 lze využít k detekci proliferační aktivity T-lymfocytů (BECKMAN COULTER, USA; BioLegend, USA; EXBIO, Česká republika).

9.8 Pomůcky a reagentie využité během stanovení

9.8.1 Přístroje

- Průtokový cytometr (Navios BECKMAN COULTER, USA)
- Centrifuga (Hettich Zentrifugen – Rotina 46R, Germany)
- Třepačka – vortex (VELP Scientifica, Italy)
- Vodní lázeň (Biosan – WB-4MS, Latvia)
- Termostat (Schoeller INSTRUMENTS, Česká republika)
- Automatické pipety (Thermo Scientific™, FinnpiPETTE™, USA)
- Mrazicí box (LAB MARK a.s., Česká republika)

9.8.2 Reagencie

- RPMI 1640 – kultivační médium (Gibco™, USA)
- Histopaque™1077 - (MP Biomedicals, USA)
- FBS – fetální hovězí sérum (nutriční doplněk kultivačního média) (Gibco™, USA)
- Antibiotika a antimykotika – Anti-Anti (Gibco™, USA)
- Propidium jodid – fluorescenční interkalační činidlo (Reagencie E, ORPEGEN Pharma PHAGOTEST®, Germany)
- PBS – Phosphate buffered saline – fosfátový pufr 10X (IsoFlow) (Gibco™, USA)
- PHA – Phytohemagglutinin (Thermo Scientific™ eBioscience™, USA)
- PerFix-nc Kit pufr č. 1 – fixační roztok (PerFix-nc Kit (no centrifuge assay Kit) BECKMAN COULTER, USA)
- PerFix-nc Kit pufr č. 2 – permeabilizační roztok (PerFix-nc Kit (no centrifuge assay Kit) BECKMAN COULTER, USA)
- PerFix-nc Kit pufr č. 3 – ukončovací roztok 10X (PerFix-nc Kit (no centrifuge assay Kit) BECKMAN COULTER, USA)
- PFA – fixační roztok paraformaldehydu 4,2 % (BD Cytifix™ Biosciences, USA)
- Triton® X-100 (1 %) – neiontový vodní detergent (Life Technologies™ Thermo Fisher Scientific, USA)
- Monoklonální protilátky CD45 KO, CD45RO FITC, CD3 PB, TNF α FITC (EXBIO, Česká republika)
- Monoklonální protilátky Ki67 PE, CD4 APCA700, CD4 APCA750, INF- γ , CD8 PC7, CD27 APC, CD107a APC (BECKMAN COULTER, USA)
- Monoklonální protilátky CD69 APCA700, CD137 PC5 (BioLegend, USA)
- BD Golgistop™ – inhibitor intracelulárního transportu proteinů – cytokinů (BD Biosciences, USA)

- PepPool SARS-CoV-2 (S1) – (MABTECH AB, Sweden)
- Destilovaná voda

9.8.3 Spotřební materiál

- Kryozkumavky
- Centrifugační zkumavky
- Cytometrické zkumavky
- Truecount zkumavky
- Špičky na pipetování
- Pasteurovy pipety
- Plastové pipety

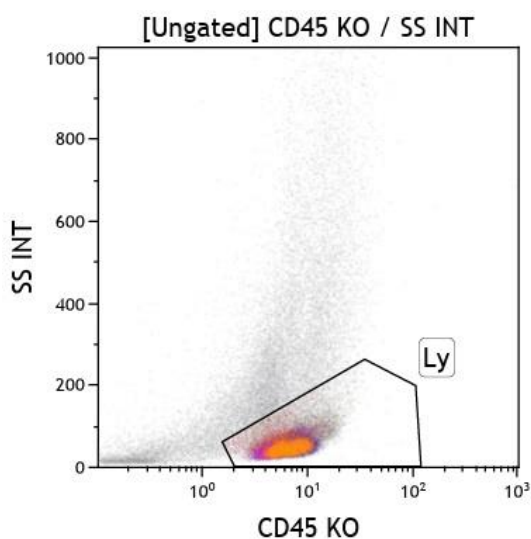
10 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

10.1 Stanovení na průtokovém cytometru

Předem připravené buněčné suspenze, označené pomocí monoklonálních protilátek, byly měřeny na průtokovém cytometru Navios (Beckman Coulter, USA). Během každého měření bylo analyzováno více než 35 000 buněk. Získaná data byla vyhodnocována pomocí programu Kaluza®.

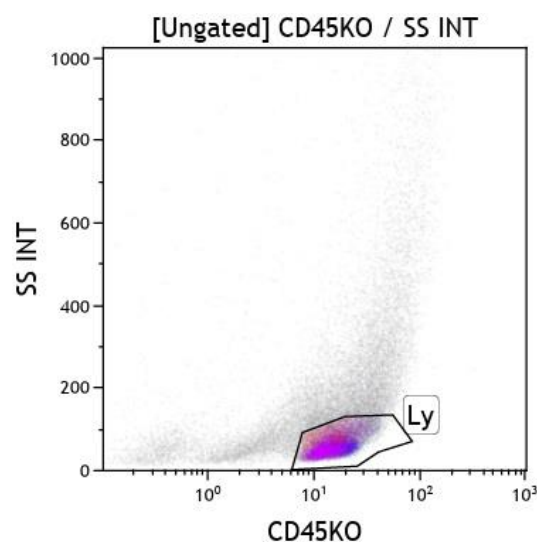
10.1.1 Gatovací strategie

Správná gatovací strategie je klíčová a nezbytná pro výběr konkrétních buněčných subpopulací. Buněčné subpopulace byly vybírány na základě exprese jejich povrchových markerů. Následující obrázky znázorňují základní gatovací strategii pro rozlišení základních T-lymfocytárních subpopulací při měření jejich proliferace a produkce cytokinů. Expese specifických postvakcinačních znaků jsou znázorněny v přílohách č. 2 a č. 3



Obrázek č. 1: Gatování populace lymfocytů při analýze proliferčního panelu

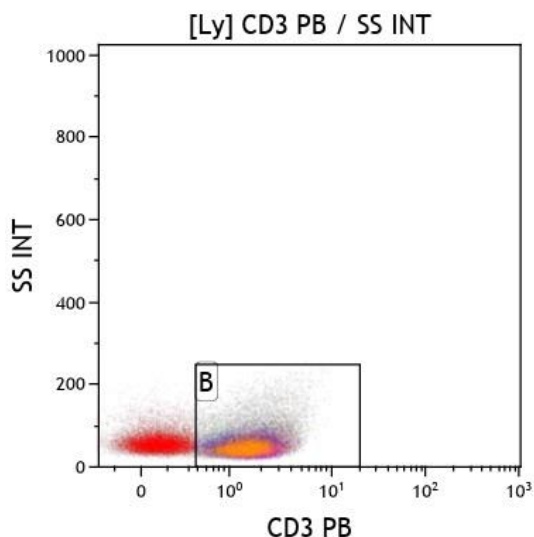
Zdroj: Vlastní



Obrázek č. 2: Gatování populace lymfocytů při analýze cytokinového panelu

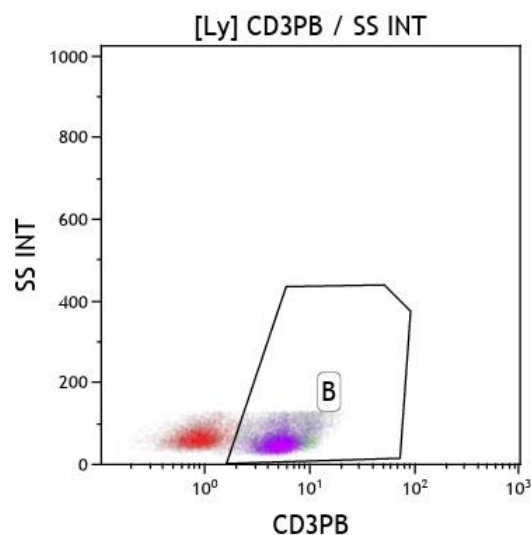
Zdroj: Vlastní

Při gatování je na začátku nejdůležitější si vymezit základní buněčnou populaci, ze které vycházejí další dot-ploty. Pro vymezení základní populace se využívá povrchový znak CD45, který je produkován všemi hematopoetickými buňkami. Jeho exprese je porovnávána s bočním rozptylem SS (*Side Scatter*). Lymfocyty jakožto agranulocyty splňují parametry CD45+ SS-. To je dáno tím, že jejich cytoplazma neobsahuje granula, od kterých by se rozptyloval laser průtokového cytometru.



Obrázek č. 3: Gatování populace T-lymfocytů při analýze proliferačního panelu

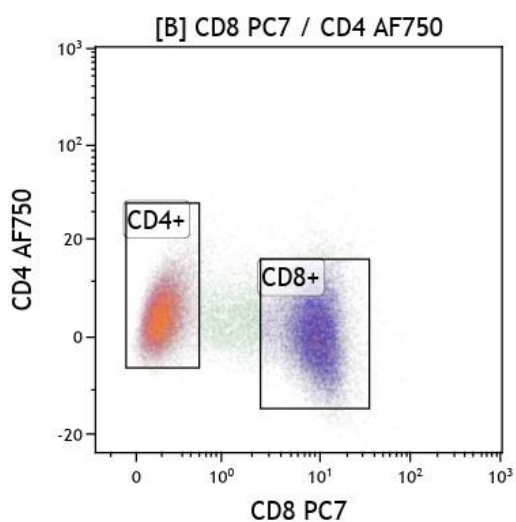
Zdroj: Vlastní



Obrázek č. 4: Gatování populace T-lymfocytů při analýze cytokinového panelu

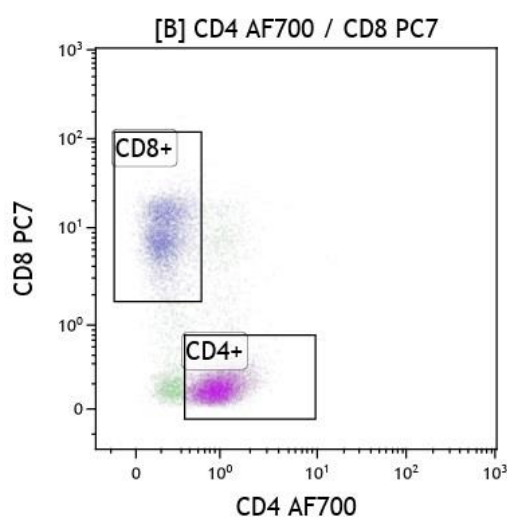
Zdroj: Vlastní

Pro odlišení populace T-lymfocytů od byla využita detekce exprese znaku CD3, která je součástí jejich TCR receptoru a na jiných lymfoidních buňkách se nevyskytuje. T-lymfocyty byly následně rozděleny do subpopulací pomocných (CD4+ CD8-) a cytotoxických (CD4- CD8+) T-lymfocytů.



Obrázek č. 5: Gatování CD4+ a CD8+ subpopulace T-lymfocytů při analýze proliferačního panelu

Zdroj: Vlastní



Obrázek č. 6: Gatování CD4+ a CD8+ subpopulace T-lymfocytů při analýze cytokinového panelu

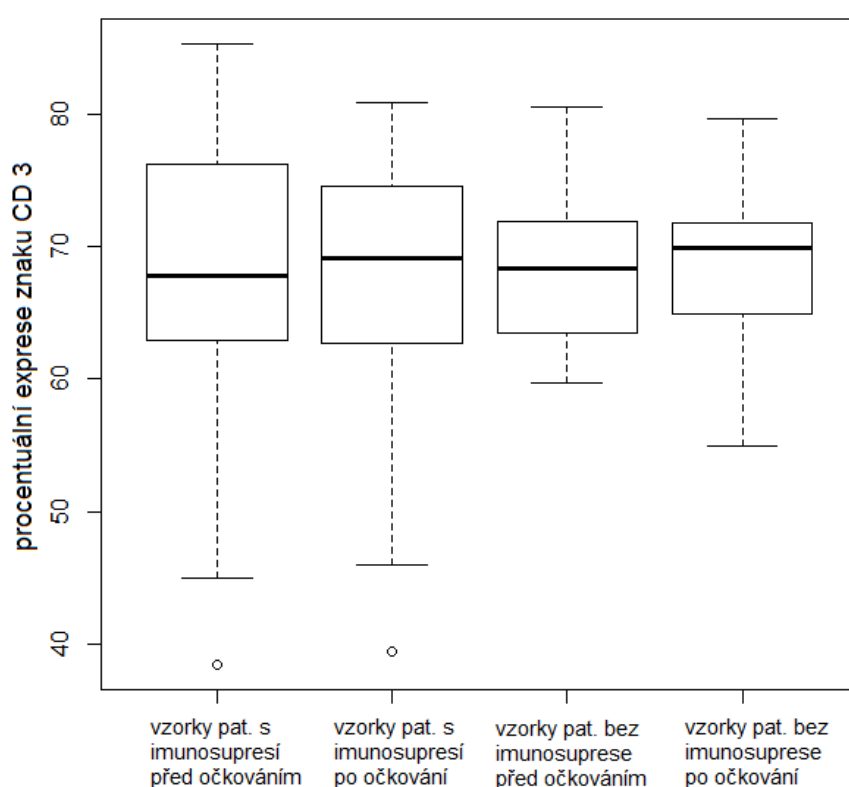
Zdroj: Vlastní

10.2 Statistické zhodnocení

Výsledky byly statisticky zhodnoceny v programu Microsoft Excel a R Project. Pro statistické zhodnocení byl zvolen Wilcoxonův neparametrický test, který určuje rozdíly mediánů. Byly hodnoceny výsledky procentuální exprese předem určených znaků u imunosuprimovaných pacientů před a po proběhlém očkování proti onemocnění covid-19. Zároveň pro kontrolu byly stejné analýze podrobeny i výsledky kontrolní zdravé skupiny. Nakonec se vzájemně porovnávala exprese znaků obou sledovaných skupin po proběhlém očkování.

10.2.1 Výsledky stanovení exprese znaku CD3

Graf č. 1: Stanovení T-lymfocytární populace pomocí exprese znaku CD3



Zdroj: Vlastní

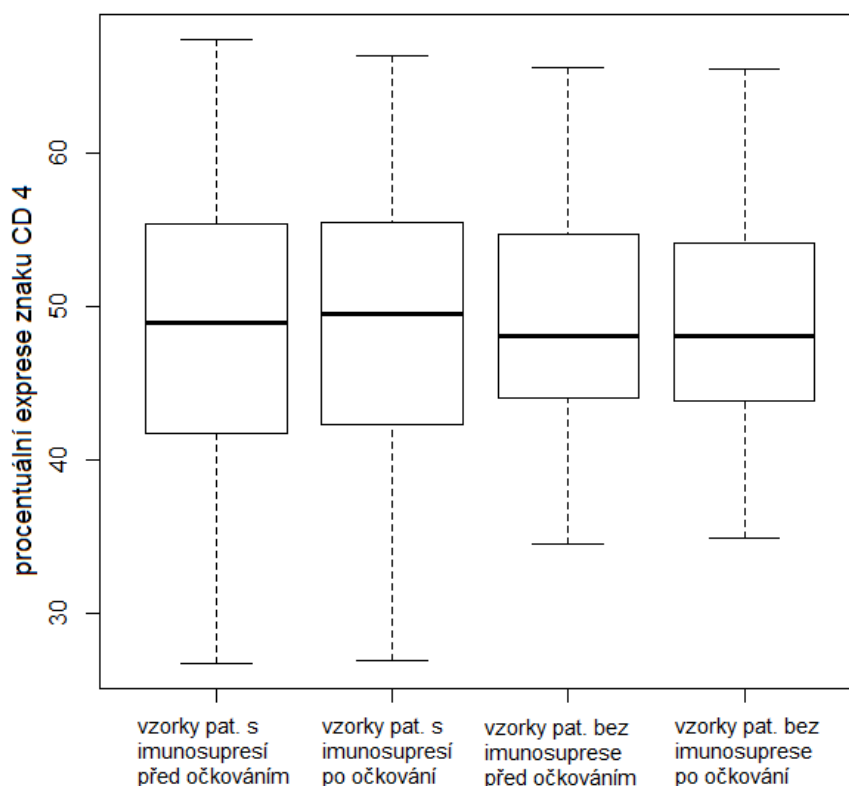
Byl zjištěn statisticky nevýznamný rozdíl v expresi znaku CD3 mezi mediánem vzorku imunosuprimovaného pacienta před očkováním a po proběhlém očkování. Rozdíl mediánů činil 1,37 % exprese znaku CD3, $p > 0,05$.

Dále byl zjištěn statisticky nevýznamný rozdíl v expresi znaku CD3 mezi mediánem vzorku zdravého pacienta před očkováním a po proběhlém očkování. Rozdíl mediánů činil 1,55 % exprese znaku CD3, $p > 0,05$.

Byl také zjištěn statisticky nevýznamný rozdíl mezi mediánem vzorku imunosuprimovaného pacienta po proběhlém očkování a mediánem vzorku zdravého pacienta po proběhlém očkování, kdy rozdíl mediánů činil 0,75 % exprese znaku CD3, $p > 0,05$.

10.2.2 Výsledky stanovení exprese znaku CD4

Graf č. 2: Stanovení subpopulace pomocných T-lymfocytů



Zdroj: Vlastní

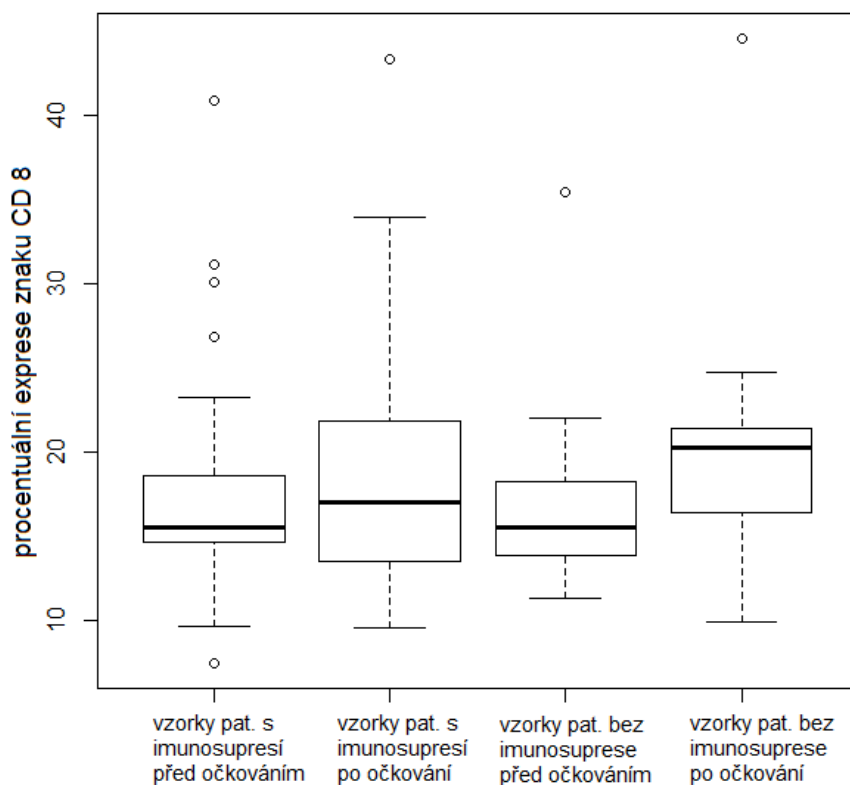
Byl zjištěn statisticky nevýznamný rozdíl v expresi znaku CD4 mezi mediánem vzorku imunosuprimovaného pacienta před očkováním a po proběhlém očkování. Rozdíl mediánů činil 0,5 % exprese znaku CD4, $p > 0,05$.

Dále byl zjištěn statisticky nevýznamný rozdíl v expresi znaku CD4 mezi mediánem vzorku zdravého pacienta před očkováním a po proběhlém očkování. Rozdíl mediánů činil 0,04 % exprese znaku CD4, $p > 0,05$.

Byl také zjištěn statisticky nevýznamný rozdíl mezi mediánem vzorku imunosuprimovaného pacienta po proběhlém očkování a mediánem vzorku zdravého pacienta po proběhlém očkování, kdy rozdíl mediánů činil 1,39 % exprese znaku CD4, $p > 0,05$.

10.2.3 Výsledky stanovení exprese znaku CD8

Graf č. 3: Stanovení subpopulace cytotoxických T-lymfocytů



Zdroj: Vlastní

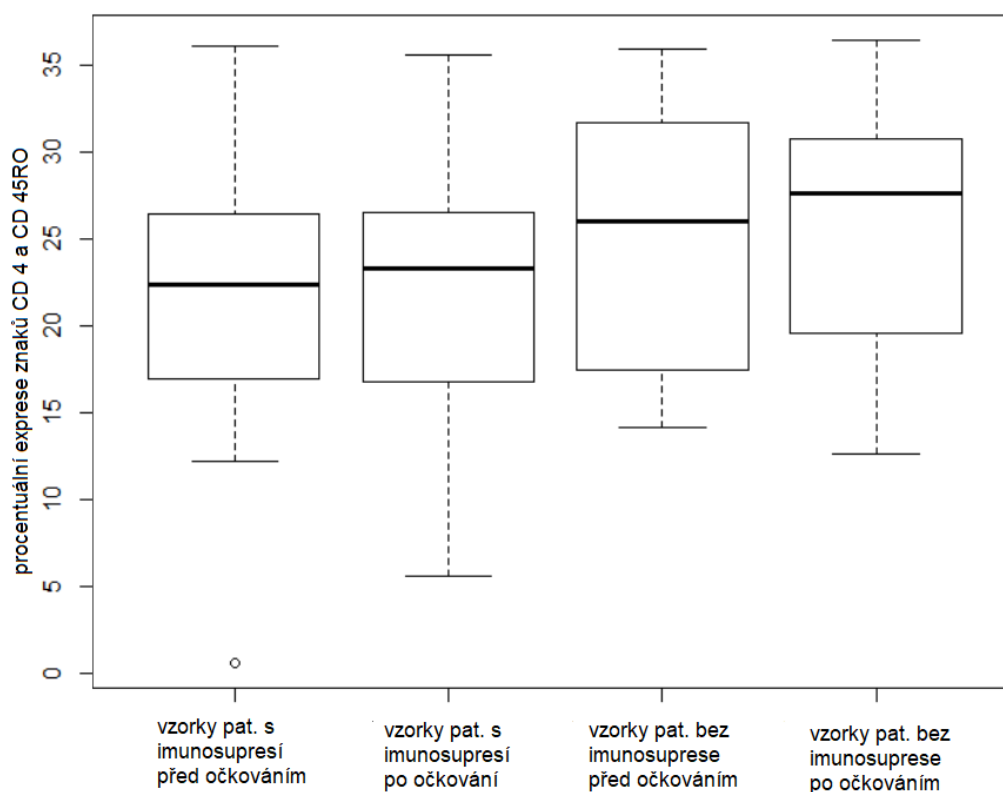
Byl zjištěn statisticky nevýznamný rozdíl v expresi znaku CD8 mezi mediánem vzorku imunosuprimovaného pacienta před očkováním a po proběhlém očkování. Rozdíl mediánů činil 1,47 % exprese znaku CD8, $p > 0,05$.

Dále byl zjištěn statisticky významný rozdíl v expresi znaku CD8 mezi mediánem vzorku zdravého pacienta před očkováním a po proběhlém očkování. Rozdíl mediánů činil 4,71% exprese znaku CD8, $p < 0,05$.

Byl také zjištěn statisticky nevýznamný rozdíl mezi mediánem vzorku imunosuprimovaného pacienta po proběhlém očkování a mediánem vzorku zdravého pacienta po proběhlém očkování, kdy rozdíl mediánů činil 3,28 % exprese znaku CD8, $p > 0,05$.

10.2.4 Výsledky stanovení exprese znaků CD 4 a CD 45RO

Graf č. 4: Stanovení subpopulace pomocných paměťových T-lymfocytů



Zdroj: Vlastní

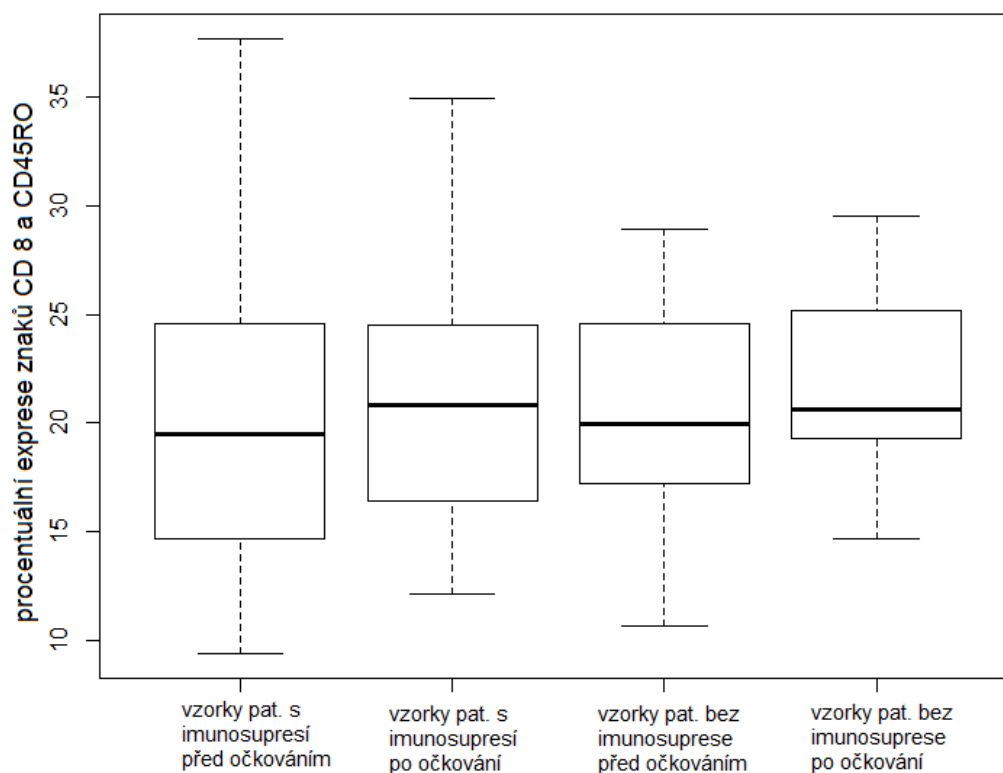
Byl zjištěn statisticky nevýznamný rozdíl v expresi znaku CD4, CD45RO mezi mediánem vzorku imunosuprimovaného pacienta před očkováním a po proběhlém očkování. Rozdíl mediánů činil 0,91 % exprese znaku CD4, CD45RO, $p > 0,05$.

Dále byl zjištěn statisticky nevýznamný rozdíl v expresi znaku CD 4, CD 45RO mezi mediánem vzorku zdravého pacienta před očkováním a po proběhlém očkování. Rozdíl mediánů činil 1,62 % exprese znaku CD4, CD45RO, $p > 0,05$.

Byl také zjištěn statisticky nevýznamný rozdíl mezi mediánem vzorku imunosuprimovaného pacienta po proběhlém očkování a mediánem vzorku zdravého pacienta po proběhlém očkování, kdy rozdíl mediánů činil 4,34 % exprese znaku CD4, CD45RO, $p > 0,05$.

10.2.5 Výsledky stanovení exprese znaků CD8 a CD45RO

Graf č. 5: Stanovení subpopulace cytotoxických paměťových T-lymfocytů



Zdroj: Vlastní

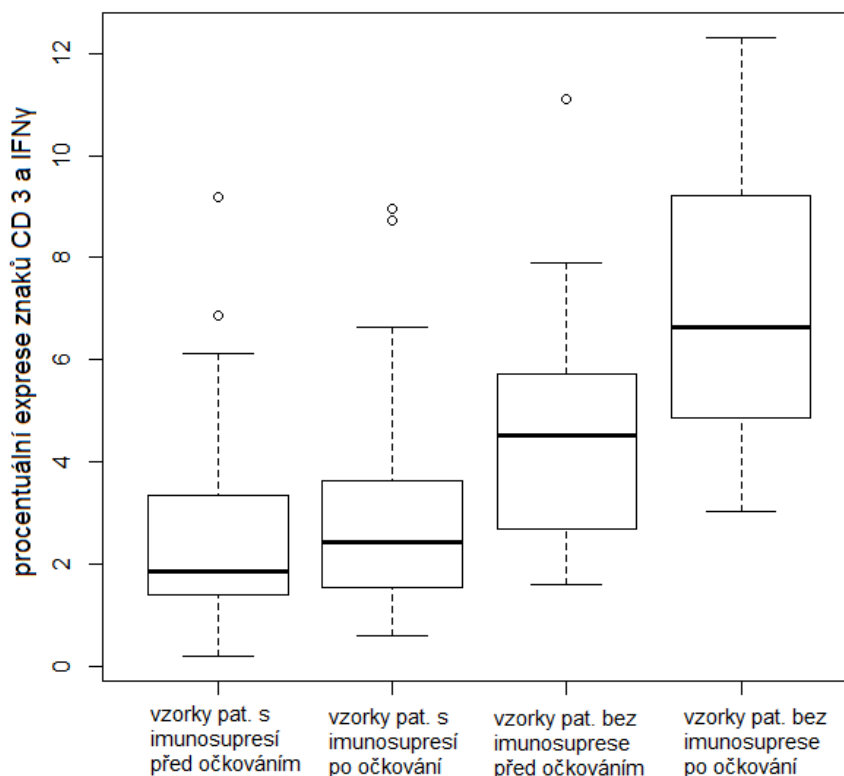
Byl zjištěn statisticky nevýznamný rozdíl v expresi znaku CD8, CD45RO mezi mediánem vzorku imunosuprimovaného pacienta před očkováním a po proběhlém očkování. Rozdíl mediánů činil 1,29 % exprese znaku CD8, CD45RO, $p > 0,05$.

Dále byl zjištěn statisticky nevýznamný rozdíl v expresi znaku CD8, CD45RO mezi mediánem vzorku zdravého pacienta před očkováním a po proběhlém očkování. Rozdíl mediánů činil 0,67 % exprese znaku CD8, CD45RO, $p > 0,05$.

Byl také zjištěn statisticky nevýznamný rozdíl mezi mediánem vzorku imunosuprimovaného pacienta po proběhlém očkování a mediánem vzorku zdravého pacienta po proběhlém očkování, kdy rozdíl mediánů činil 0,15 % exprese znaku CD8, CD45RO, $p > 0,05$.

10.2.6 Výsledky stanovení exprese znaků CD3 a IFN γ

Graf č. 6: Stanovení populace T-lymfocytů produkujících IFN- γ



Zdroj: Vlastní

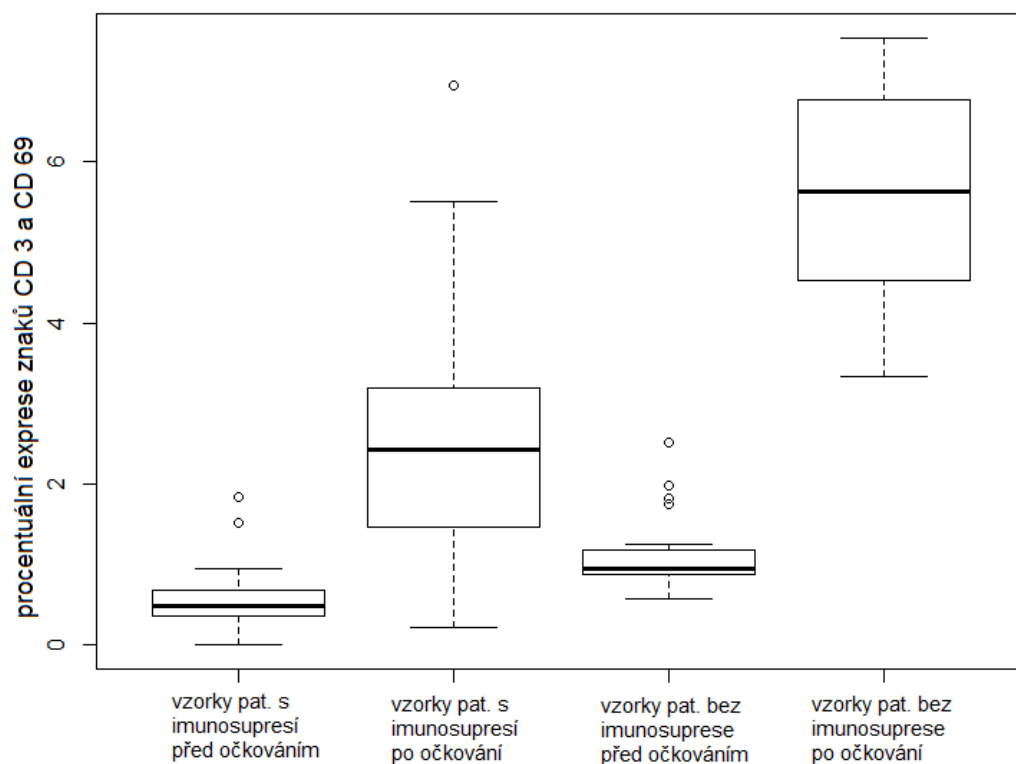
Byl zjištěn statisticky nevýznamný rozdíl v expresi znaku CD3 a IFN γ mezi mediánem vzorku imunosuprimovaného pacienta před očkováním a po proběhlém očkování. Rozdíl mediánů činil 0,56 % exprese znaku CD3 a IFN γ , $p > 0,05$.

Dále byl zjištěn statisticky významný rozdíl v expresi znaku CD3 a IFN γ mezi mediánem vzorku zdravého pacienta před očkováním a po proběhlém očkování. Rozdíl mediánů činil 2,14 % exprese znaku CD3 a IFN γ , $p < 0,01$.

Byl také zjištěn statisticky významný rozdíl mezi mediánem vzorku imunosuprimovaného pacienta po proběhlém očkování a mediánem vzorku zdravého pacienta po proběhlém očkování, kdy rozdíl mediánů činil 4,22 % exprese znaku CD3 a IFN γ , $p < 0,01$.

10.2.7 Výsledky stanovení exprese znaků CD 3 a CD 69

Graf č. 7: Stanovení populace T-lymfocytů exprimujících aktivační znak CD 69



Zdroj: Vlastní

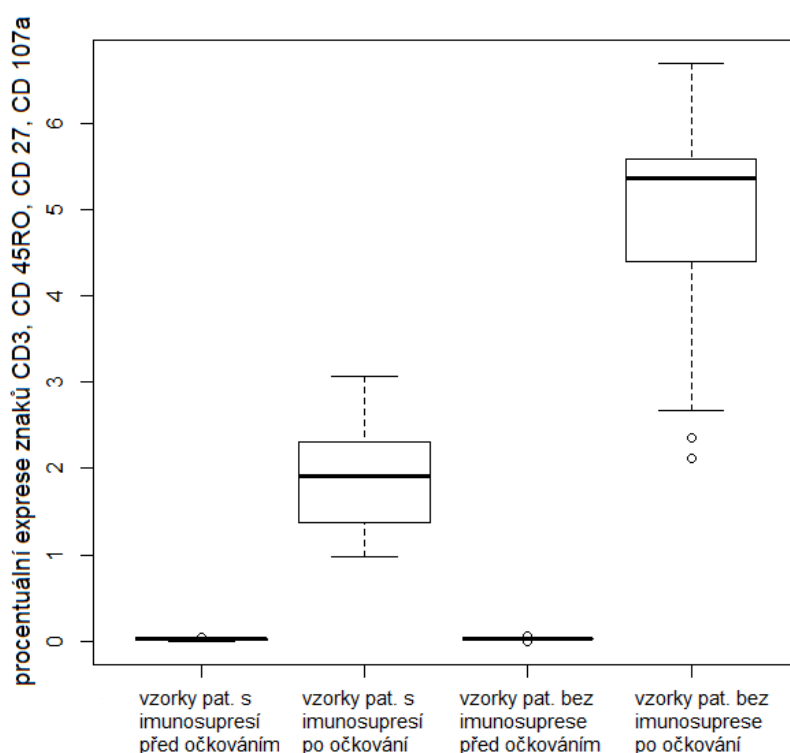
Byl zjištěn statisticky významný rozdíl v expresi znaku CD3 a CD69 mezi mediánem vzorku imunosuprimovaného pacienta před očkováním a po proběhlém očkování. Rozdíl mediánů činil 1,94 % exprese znaku CD3 a CD69 $p < 0,01$.

Dále byl zjištěn statisticky významný rozdíl v expresi znaku CD3 a CD69 mezi mediánem vzorku zdravého pacienta před očkováním a po proběhlém očkování. Rozdíl mediánů činil 4,70 % exprese znaku CD3 a CD69 $p < 0,01$.

Byl také zjištěn statisticky významný rozdíl mezi mediánem vzorku imunosuprimovaného pacienta po proběhlém očkování a mediánem vzorku zdravého pacienta po proběhlém očkování, kdy rozdíl mediánů činil 3,23 % exprese znaku CD3 a CD69, $p < 0,01$.

10.2.8 Výsledky stanovení exprese znaků CD3 a CD 45RO, C27, CD107a

Graf č. 8: Stanovení populace funkčně vyvrálých T-lymfocytů exprimujících znak CD107a



Zdroj: Vlastní

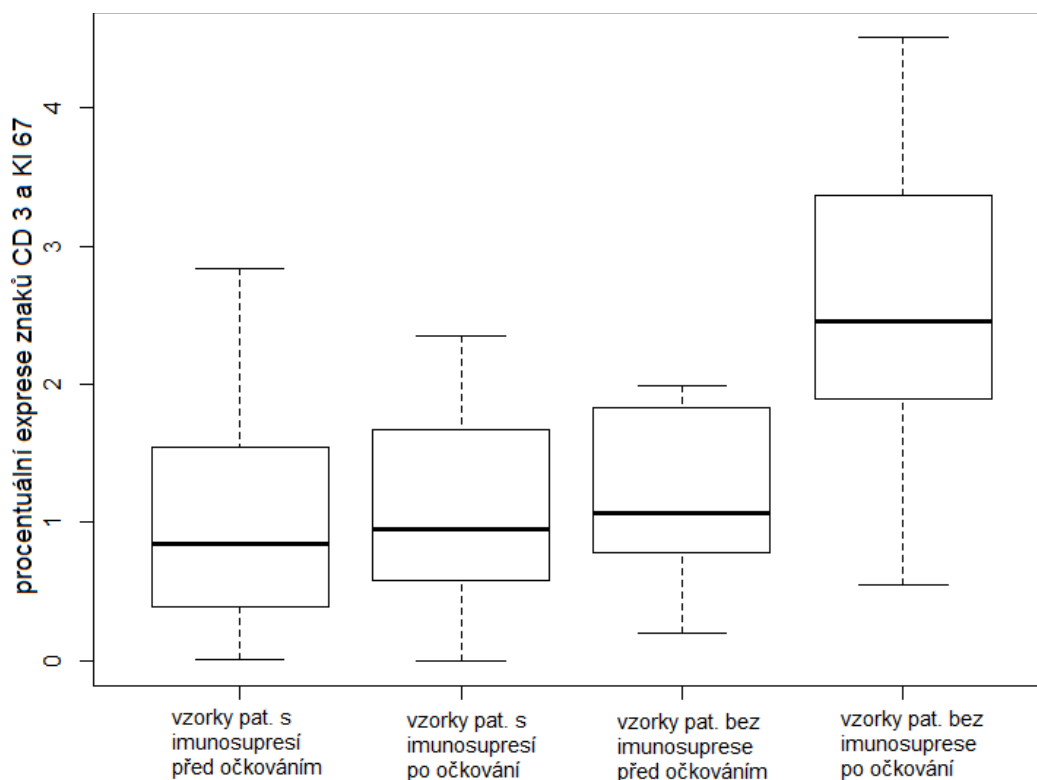
Byl zjištěn statisticky významný rozdíl v expresi znaku CD3 a CD45RO, CD27, CD107a mezi mediánem vzorku imunosuprimovaného pacienta před očkováním a po proběhlém očkování. Rozdíl mediánů činil 1,89 % exprese znaku CD3 a CD45RO, CD27, CD107a, $p < 0,01$.

Dále byl zjištěn statisticky významný rozdíl v expresi znaku CD3 a CD45RO, CD27, CD107a mezi mediánem vzorku zdravého pacienta před očkováním a po proběhlém očkování. Rozdíl mediánů činil 5,34 % exprese znaku CD3 a CD45RO, CD27, CD107a, $p < 0,01$.

Byl také zjištěn statisticky významný rozdíl mezi mediánem vzorku imunosuprimovaného pacienta po proběhlém očkování a mediánem vzorku zdravého pacienta po proběhlém očkování, kdy rozdíl mediánů činil 3,45 % exprese znaku CD3 a CD45RO, CD27, CD107a, $p < 0,01$.

10.2.9 Výsledky stanovení exprese znaků CD3 a Ki67

Graf č. 9: Stanovení populace T-lymfocytů produkujících proliferační faktor Ki67



Zdroj: Vlastní

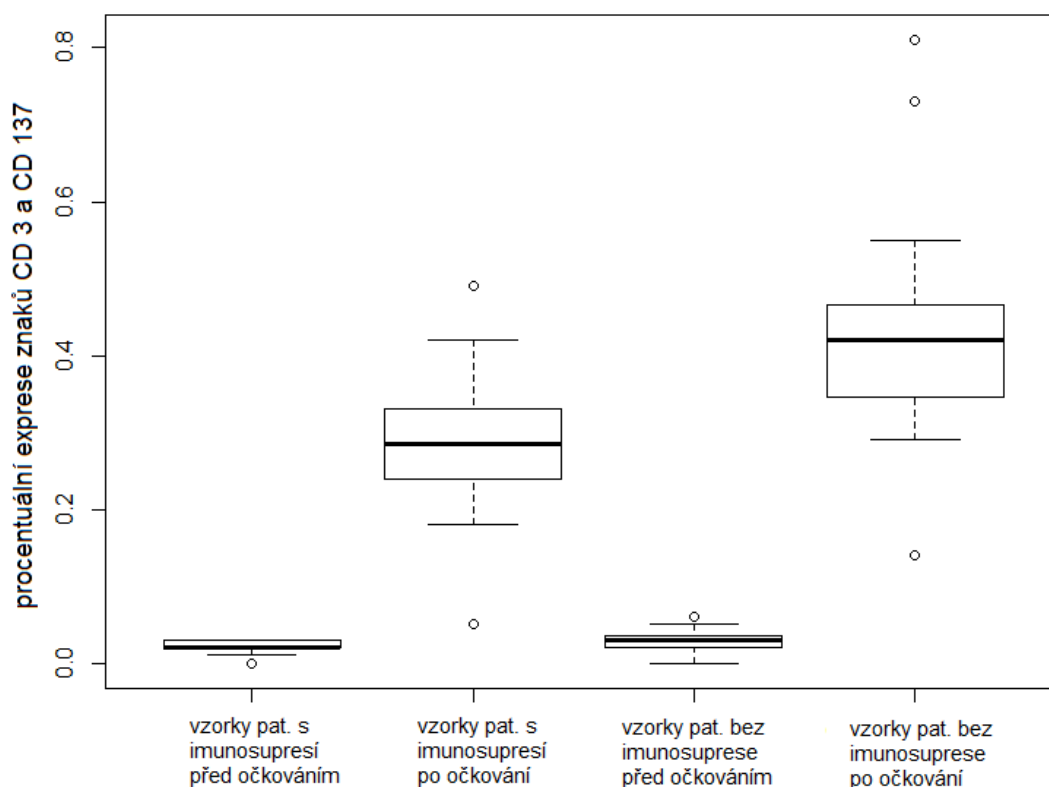
Byl zjištěn statisticky nevýznamný rozdíl v expresi znaku CD3 a KI67 mezi mediánem vzorku imunosuprimovaného pacienta před očkováním a po proběhlém očkování. Rozdíl mediánů činil 0,11 % exprese znaku CD3 a KI67, $p > 0,05$.

Dále byl zjištěn statisticky významný rozdíl v expresi znaku CD3 a KI67 mezi mediánem vzorku zdravého pacienta před očkováním a po proběhlém očkování. Rozdíl mediánů činil 1,39 % exprese znaku CD3 a KI67, $p < 0,01$.

Byl také zjištěn statisticky významný rozdíl mezi mediánem vzorku imunosuprimovaného pacienta po proběhlém očkování a mediánem vzorku zdravého pacienta po proběhlém očkování, kdy rozdíl mediánů činil 1,51 % exprese znaku CD3 a KI67, $p < 0,01$.

10.2.10 Výsledky stanovení exprese znaků CD3 a CD137

Graf č. 10: Stanovení populace antigeně specifických T-lymfocytů



Zdroj: Vlastní

Byl zjištěn statisticky významný rozdíl v expresi znaku CD3 a CD137 mezi mediánem vzorku imunosuprimovaného pacienta před očkováním a po proběhlém očkování. Rozdíl mediánů činil 0,27 % exprese znaku CD3 a CD137, $p < 0,01$.

Dále byl zjištěn statisticky významný rozdíl v expresi znaku CD3 a CD137 mezi mediánem vzorku zdravého pacienta před očkováním a po proběhlém očkování. Rozdíl mediánů činil 0,39 % exprese znaku CD3 a CD137, $p < 0,01$.

Byl také zjištěn statisticky významný rozdíl mezi mediánem vzorku imunosuprimovaného pacienta po proběhlém očkování a mediánem vzorku zdravého pacienta po proběhlém očkování, kdy rozdíl mediánů činil 0,14 % exprese znaku CD3 a CD137, $p < 0,01$.

DISKUZE

Kryokonzervace je způsob skladování buněčných linií, tkání či orgánů při kryogenních teplotách pro budoucí použití bez rizika kontaminace a genetických změn. Kryogenním zmražením lze zastavit metabolismus živých buněk a tím dlouhodobě zajistit jejich životaschopnost. Nízké teploty pod $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, při kterých dochází k buněčné degradaci, buňky tolerují díky kryoprotektivním činidlům. Mechanismus účinku kryoprotektivních médií tkví v jejich schopnosti snížit bod tání vody, čímž zabraňují tvorbě krystalků ledu (Moloney, 2023).

Testem buněčnosti a životnosti byla ověřena první výzkumná otázka týkající se buněčnosti kryokonzervovaných vzorků plazmy sledovaného souboru pacientů a životaschopnosti buněk v nich obsažených. Životaschopné buňky byly dále kultivovány a použity k další analýze. Buňka je považována za životaschopnou, pokud ji lze detekovat průtokovou cytometrií, je odolná vůči obarvení propidium jodidem, a je schopna aktivace a proliferace (Jeriunk et al., 2008).

Další otázkou bylo, zda T-lymfocyty reagují na nespecifickou a specifickou stimulaci. Nespecifická stimulace byla navozena rostlinným lektinem, fytohemaglutininem (PHA), jehož vazba na povrch lymfocytů vede k iniciaci proliferace buněk podobné té, jež je možno pozorovat po antigenem vyvolané imunitní reakci. Stimulace nespecifickými mitogeny však obchází požadavek na specifické rozpoznání stimulu, které je typické pro imunitní aktivaci. Testy s nespecifickou stimulací se v praxi využívají pro hodnocení funkční imunokompetence, obzvláště při hodnocení funkce u imunosuprimovaných pacientů (Schechter, 1980). Specifická stimulace lymfocytů při detekci postvakcinační odpovědi na očkování proti onemocnění covid-19 byla navozena peptidovými pooly (MABTECH AB, Sweden), které obsahují přes 100 peptidů Spike proteinu z lidského viru SARS-CoV-2.

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo ověřit, zda metody sledování T-buněčné odpovědi jsou schopné poskytnout relevantní výsledky. Během výzkumu byly ověřeny možnosti kultivace lymfocytů po kryokonzervaci a strategie analýzy cytokinového a proliferačního profilu. Výsledky byly statisticky zhodnoceny, a v této práci prezentovány v grafické formě boxplotů. Součástí statistického zhodnocení bylo i vzájemné porovnání mediánů exprese konkrétních znaků postvakcinační T-buněčné odpovědi. Byly porovnávány výsledky 30 imunosuprimovaných pacientů před očkováním a 4 týdny po ukončení plného očkovacího schématu. Zároveň byly hodnoceny výsledky 20 imunologicky zdravých pacientů, které

sloužily jako negativní kontrola. Nakonec byly výsledky obou sledovaných skupin vzájemně porovnány.

Z výsledků měření bylo zjištěno, že očkování nemělo vliv na početní zastoupení T-lymfocytů v periferní krvi. Co se rozložení T-lymfocytárních subpopulací týče, byl zaznamenán jen mírný vzestup cytotoxických T-lymfocytů, avšak pouze u zdravé kontroly. Zároveň nebyl zjištěn významný rozdíl v populacích paměťových buněk u obou sledovaných skupin.

U zdravé kontrolní skupiny, na rozdíl od pacientů s imunosupresí, byl po očkování patrný značný nárůst exprese proliferačního faktoru Ki67. Stejně tomu bylo i při měření INF- γ , kde byl taktéž zaznamenán nárůst jeho produkce pouze u zdravé kontrolní skupiny. Nedávné studie prokázaly odlišné výsledky tohoto markeru napříč všemi zkoumanými imunosuprimovanými pacienty. (Oyaert et al., 2022) Minimální vzestup hladiny INF- γ u skupiny imunosuprimovaných jedinců je v souladu se studií od Tortorellové a kolektivu (2022), naopak v rozporu se studiemi, které detekovali odpověď srovnatelnou se zdravou kontrolou (Brill et al., 2021; Pomsch et al., 2021; Qiu et al., 2022; Reuken et al., 2022) nebo dokonce vyšší (Apostolidis et al., 2021; Gadani et al., 2021; Dunn et al., 2022; Madelon et al., 2022).

T-lymfocyty obou sledovaných skupin vykazovaly vzestup exprese aktivačního znaku CD69, avšak u zdravé kontroly byl nárůst více než dvojnásobný. Podobný výsledek byl zaznamenán i u exprese znaku CD107a. U obou skupin byl zaznamenán nárůst jeho exprese na funkčně vyvrážděných T-lymfocytech, ovšem u imunosuprimovaných pacientů byly detekovány téměř trojnásobně nižší hodnoty. K významné změně exprese po očkování u obou skupin došlo i u posledního námi hodnoceného znaku CD137. Stejně jako u předchozích znaků byl i zde patrný rozdíl mezi hodnotami zdravé a imunosuprimované skupiny. Zvýšení exprese těchto znaků dokazuje, že T-lymfocyty obou naočkovaných skupin jsou schopné aktivace po antigenně specifické stimulaci. Tudiž jsou schopné zajistit ochranu i imunosuprimovaným pacientům. Tento poznatek potvrdila i řada studií. Většina studií hodnotila současně humorální i buněčnou část postvakcinační imunitní odpovědi u pacientů s různým autoimunitním onemocněním a typem imunosupresivní léčby. V těchto studiích bylo zjištěno, že i přes významný deficit protilátkové imunity jsou T-lymfocyty imunosuprimovaných pacientů schopné plně vyvráždět a diferencovat se ve funkční antigenně specifické

buňky. Tudiž jsou tito pacienti po vakcinaci chráněni imunitou zprostředkovanou T-lymfocyty, které jsou schopné rozpoznat a zlikvidovat virem napadené buňky. (Apostolidis et al., 2021; Madelon et al., 2022; Rauken et al., 2022; Oyaert et al., 2022; Barnes et al., 2023).

Je potřeba zmínit, že rozdíly mezi výsledky jednotlivých studií mohou být způsobeny sledováním odlišných skupin pacientů s různou imunosupresivní terapií a individuálními rizikovými faktory. (Bertrand et al., 2022; Oyaert et al., 2022) Dalo by se i diskutovat o možném účinku samotné očkovací látky na generaci imunitní odpovědi, avšak ve většině studií byly hodnoceny hlavně subjekty naočkované mRNA vakcínami, popř. adenovirovými vektorovými vakcínami, a Cadera et al. (2022) nezaznamenali zásadní rozdíl v účinku těchto vakcín.

V této práci byla postvakcinační T-buněčná odpověď hodnocena na základě měření extra a intracelulárních znaků pomocí průtokové cytometrie. V dnešní době však existuje řada studií s odlišnou metodikou. K testování T-buněčné imunity byly kromě průtokové cytometrie (Apostolidis et al., 2021; Reuken et al., 2022) využity metody jako ELISpot (Bertrand et al., 2021; Brill et al., 2021; Pomsch et al., 2021; Madelon et al., 2022; Qiu et al., 2022; Barnes et al., 2023), FLUOROSpot (Gadani et al., 2021) nebo QuantiFERON (Oyaert et al., 2022) pro stanovení produkce interferonu gama.

ZÁVĚR

V této bakalářské práci byla ověřena buněčnost a životnost buněk po kryokonzervaci. Dále bylo ověřeno, že T-lymfocyty po kryokonzervaci jsou i nadále schopné reagovat na nespecifické i specifické stimulační podněty. Zároveň bylo zjištěno, že T-lymfocyty imunosuprimovaných jedinců jsou po podání dvou dávek vakcíny proti lidskému viru SARS-CoV-2 schopné organismus ochránit, a i přes nižší aktivační schopnost jsou schopné diferencovat v antigenně specifické buňky. Výsledky T-buněčné imunitní odpovědi musí být hodnoceny v kontextu s anamnézou a celkovým klinickým stavem, zároveň je interpretace výsledků zkomplikována nižším počtem statistik a podkladů k hodnocení nejen T-buněčné odpovědi jako takové, ale i nedostatkem znalostí o nově vyskytlém patogenu, viru SARS-CoV-2, a jeho působení na imunitní systém.

SEZNAM LITERATURY

ACROBIOSYSTEMS, 2017. What are Pseudoviruses? Online. Acro Biosystems. Dostupné z: https://www.acrobiosystems.com/A1425-Pseudovirus-Neutralization-Antibody-Assay-Service-.html?gclid=Cj0KCQjwmICoBhDxARIsA-BXkXIIul0YuZ8VTnA9OhG2wwqQ3Wv_aR33cJSKsnqqsLvtr44pSbBt7yTAaAujIE-ALw_wcB. [cit. 2023-09-12].

APOSTOLIDIS, Sokratis A.; KAKARA, Mihir; PAINTER, Mark M.; GOEL, Rishi R.; MATHEW, Divij et al., 2021. Cellular and humoral immune responses following SARS-CoV-2 mRNA vaccination in patients with multiple sclerosis on anti-CD20 therapy. Online. *Nature Medicine*. Roč. 27, č. 11. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41591-021-01507-2>. [cit. 2024-01-12].

ASSIS, Rafael; JAIN, Aarti; NAKAJIMA, Rie a , kolektiv, 2021. Distinct SARS-CoV-2 antibody reactivity patterns in coronavirus convalescent plasma revealed by a coronavirus antigen microarray. Online. *Scientific Reports*. Roč. 11, č. 7554, s. 1-2. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87137-7>. [cit. 2023-09-12].

BANAEI, Niaz; GAUR, Rajiv L. a PAI, Madhukar, 2023. Interferon Gamma Release Assays for Latent Tuberculosis: What Are the Sources of Variability? Online. *Journal of Clinical Microbiology*. Roč. 54, č. 4, s. 845–850. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/JCM.02803-15>. [cit. 2023-09-22].

BARNES, Eleanor; GOODYEAR, Carl S.; WILLICOMBE, Michelle a , kolektiv, 2023. SARS-CoV-2-specific immune responses and clinical outcomes after COVID-19 vaccination in patients with immune-suppressive disease. Online. *Nature Medicine*. Č. 29, s. 1760–1774. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41591-023-02414-4>. [cit. 2023-09-12].

BARTOŠ, Vladimír a , kolektiv autorů, 2013. *Imunoanalytické metody*. Ostrava: Ostravská univerzita v Ostravě, Lékařská fakulta. ISBN 978-80-7464-366-8.

BARTUŇKOVÁ, Jiřina a PAULÍK, Milan, 2011. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2. přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-3533-7.

BECKMAN COULTER, INC., 2023. BECKMAN COULTER. Online. Dostupné z: <https://beckmancoulter.cz/>. [cit. 2024-02-02].

BECKMAN COULTER, INC., 2023. Density Gradient Centrifugation. Online. Beckman Coulter Life Science. Dostupné z: <https://www.beckman.com/resources/technologies/centrifugation/density-gradient-centrifugation>. [cit. 2023-09-19].

BEDNÁŘ, Marek, 2009. KFR. Online. In: *PŘÍRUČKA MIKROBIOLOGIE PRO BAKALÁŘE 3. LF UK*. Praha: 3. Lékařská fakulta Univerzity Karlovy. Dostupné z: <http://mikrobiologie.lf3.cuni.cz/bak/uceb/>. [cit. 2023-08-26].

BEŇOVSKÁ, Miroslava, 2016. *Imunochemické techniky*. Online. Masarykova univerzita. Dostupné z: <https://is.muni.cz/el/med/jaro2016/TXSM/Imunochem.tech.1.pdf>. [cit. 2023-09-13].

BERTHOLD TECHNOLOGIES GMBH & CO.KG, 2023. What is a Pseudovirus Neutralization Assay? Online. Berthold. Dostupné z: <https://www.berthold.com/en/bioanalytic/solutions-sars-cov-2-covid-19-research/pseudovirus-neutralization-assays-in-sars-cov-2-research/>. [cit. 2023-09-12].

BERTRAND, Dominique; HAMZAOU, Mouad; LEMÉE, Veronique; LAMULLE, Julie; HANOY, Mélanie et al., 2021. Antibody and T Cell Response to SARS-CoV-2 Messenger RNA BNT162b2 Vaccine in Kidney Transplant Recipients and Hemodialysis Patients. Online. *JASN*. Roč. 32, č. 9, s. 2147-2152. Dostupné z: <https://doi.org/10.1681/ASN.2021040480>. [cit. 2024-01-20].

BIOLEGEND, INC., 2024. BioLegend. Online. BioLegend. Dostupné z: https://www.biolegend.com/nl-be/search-results?PageSize=25&altView=list&Category=PRIM_AB&Applications=FC&Applications=ICFC. [cit. 2024-03-08].

BIO-RAD LABORATORIES, 2023. Fluorescence Compensation. Online. BioRad. Dostupné z: <https://www.bio-rad-antibodies.com/flow-cytometry-fluorescence-compensation.html>. [cit. 2023-09-23].

BRILL, Livnat; RECHTMAN, Ariel; ZVEIK, Omri, et al., 2021. Humoral and T-Cell Response to SARS-CoV-2 Vaccination in Patients With Multiple Sclerosis Treated With Ocrelizumab. Online. *JAMA Neurology*. Roč. 12, č. 78, s. 1510-1514. Dostupné z: <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2021.3599>. [cit. 2024-01-16].

BRUNCLÍKOVÁ, Klára, 2021. *EMA zahájila průběžné hodnocení vakcíny Sputnik V*. Online. SÚKL Státní ústav pro kontrolu léčiv. Praha: SÚKL. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/sukl/ema-zahajila-prubezne-hodnoceni-vakciny-sputnik-v>. [cit. 2023-09-05].

CALDERA, Freddy; FARRAYE, Francis A; NECELA, Brian M; COGEN, Davitte; SAHA, Sumona et al., 2022. Higher Cell-Mediated Immune Responses in Patients With Inflammatory Bowel Disease on Anti-TNF Therapy After COVID-19 Vaccination. Online. *Inflammatory Bowel Diseases*. Roč. 29, č. 8, s. 1201-1209. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/ibd/izac193>. [cit. 2024-01-19].

CANOUI, E a LAUNAY, O, 2019. History and principles of vaccination. Online. *Revue des Maladies Respiratoires*. Roč. 36, č. 1, s. 74-81. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2018.02.015>. [cit. 2023-07-19].

CUSABIO TECHNOLOGY LLC, 2023. The Detection of Cytokines. Online. Cusabio. Dostupné z: <https://www.cusabio.com/c-20931.html>. [cit. 2023-09-23].

COREY, Lawrence; BEYRER, Chris; COHEN, Myron S.; MICHAEL, Nelson L.; BEDFORD, Trevor et al., 2021. SARS-CoV-2 Variants in Patients with Immunosuppression. Online. *The New England Journal of Medicine*. Roč. 385, č. 6, s. 562-566. Dostupné z: <https://doi.org/10.1056/NEJMs2104756>. [cit. 2023-09-25].

CREATIVE BIOLABS, 2023. Protein Microarray. Online. Creative Biolabs Therapeutics. Dostupné z: <https://www.creative-biolabs.com/drug-discovery/therapeutics/protein-microarray.htm>. [cit. 2023-09-26].

ČESKÁ VAKCINOLOGICKÁ SPOLEČNOST ČLS JEP, STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV, 2023. *Co se v těle děje po očkování?: Reakce na očkování*. Online. Nzip.cz. Praha: Ministerstvo zdravotnictví ČR a Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/clanek/29-po-ockovani>. [cit. 2023-08-31].

DASTYCH, Milan, a kolektiv, 2014. *Instrumentální technika*. 2. doplněné vydání. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-7103-2.

DASTYCH, Milan; BREINEK, Petr, a kolektiv autorů, 2015. *Klinická biochemie – bakalářský obor Zdravotní laborant*. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-7788-1.

DEVI, Melania Janisha; GAFAR, Shabarn a HARTATI, Yeni Wahyuni, 2022. A review post-vaccination SARS-CoV-2 serological test: Method and antibody titer response. Online. *Analytical Biochemistr.* Roč. 658, č. 114902, s. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ab.2022.114902>. [cit. 2023-09-10].

DOURDOUNA, Maria-Myrto; TATSI, Elizabeth-Barbara; SYRIOPOULOU, Vasiliki a MICHOS, Athanasios, 2023. Evaluation of T cell responses with the QuantiFERON SARS-CoV-2 assay in individuals with 3 doses of BNT162b2 vaccine, SARS-CoV-2 infection, or hybrid immunity. Online. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* Roč. 106, č. 3, s. 2. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2023.115948>. [cit. 2023-09-22].

DŘEVÍNEK, Pavel; HRUBÁČEK, Petr; MACKOVÁ, Barbora a JIŘINCOVÁ, Helena, 2020. *Principy přímého průkazu SARS-CoV-2 metodou RT-PCR.* Online. Společnost pro lékařskou mikrobiologii. Dostupné z: <https://www.splm.cz/article/principy-primeho-prukazu-sars-cov-2-metodou-rt-pcr>. [cit. 2023-09-22].

DUNN, Roberto Alfonso; LIN, Jerry; KIRSCHNER, Vanessa; LEI, Joyce; et al., 2022. Strong T-cell activation in response to COVID-19 vaccination in multiple sclerosis patients receiving B-cell depleting therapies. Online. *Frontiers in Immunology.* Roč. 13, č. 8, s. 1-14. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.926318>. [cit. 2024-01-15].

EXBIO PRAHA, A.S., 2019. EXBIO. Online. Dostupné z: <https://www.exbio.cz/>. [cit. 2024-02-02].

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2023. What is COVID-19? Online. European Vaccination Information portal. Brussel: European Centre for Disease Prevention and Control. Dostupné z: <https://vaccination-info.eu/en/disease-factsheets/covid-19>. [cit. 2023-09-05].

EVROPSKÁ RADA, RADA EVROPSKÉ UNIE, 2021. Infografika – Jak nás vakcíny na bázi mRNA chrání před onemocněním COVID-19. Online. Evropská rada, Rada Evropské unie. Brussel: Evropská unie. Dostupné z: <https://www.consilium.europa.eu/cs/infographics/covid-19-mrna-vaccine/>. [cit. 2023-09-05]

FAJFRLÍK, Karel a AMLEROVÁ, Jana, 2019. *Epidemiologická opatření zaměřená na zvyšování odolnosti vnímavých osob – očkování.* Online. Epidemiologie. Plzeň. Dostupné z: <https://www.vovcr.cz/odz/zdrav/185/page10.html#heading45>. [cit. 2023-09-05].

FERENČÍK, Miroslav; ROVENSKÝ, Jozef a MAŤHA, Vladimír, 2005. *Imunitní systém – informace pro každého*. Praha: Grada Publishing. ISBN 80-247-1196.

GADANI, Sachin P.; REYES-MANTILLA, Maria; JANK, Larissa; HARRIS, Samantha; DOUGLAS, Morgan et al., 2021. Discordant humoral and T cell immune responses to SARS-CoV-2 vaccination in people with multiple sclerosis on anti-CD20 therapy. Online. *EBioMedicine*. Roč. 73, č. 103636, s. 1-6. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103636>. [cit. 2024-01-15].

CHEN, Yanjia; ZHAO, Xiaoyu; ZHOU, Hao; ZHU, Huanzhang; JIANG, Shibo et al., 2023. Broadly neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 and other human coronaviruses. Online. *Nature Reviews Immunology*. Roč. 23, č. 3, s. 198-199. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41577-022-00784-3>. [cit. 2023-09-14].

JERIUNK, Prescilla V.; VISSERS, Yvonne; RAPPARD, Bianca a SAVELKOUL, Huub F.J., 2008. T cell responses in fresh and cryopreserved peripheral blood mononuclear cells: Kinetics of cell viability, cellular subsets, proliferation, and cytokine production. Online. *Cryobiology*. Roč. 57, č. 6, s. 91-103. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2008.06.002>. [cit. 2023-12-23].

JÍLKOVÁ, Eva, 2012. Principy aktivní imunizace. Je očkování zátěž? Online. *Interní medicína*. Roč. 14, č. 8a9, s. 336-338. Dostupné z: <https://www.internimedica.cz/pdfs/int/2012/09/10.pdf>. [cit. 2023-09-05].

KLEIVELAND, Charlotte R., 2015. Chapter 15 Peripheral Blood Mononuclear Cells. Online. In: *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*. Springer, s. 161-167. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500157/#__NBK500157_dtls__. [cit. 2023-09-18].

KLEIVELAND, Charlotte R. Peripheral Blood Mononuclear Cells. Online. S. 161-167. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_15. [cit. 2023-09-18].

KLIKA, Jan a HANÁČEK, Jan, 2022. *Přehledně: typy vakcín proti covidu-19, jejich fungování a účinnost*. Online. Akademie věd České republiky. Praha: Středisko společných činností AV ČR. Dostupné z: <https://www.avcr.cz/cs/veda-a-vyzkum/chemicke-vedy/Prehledne-Ctyri-typy-vakcin-proti-nemoci-covid-19/>. [cit. 2023-09-05].

KREJSEK, Jan, 2016. *Imunologie člověka*. Hradec Králové: Garamon. ISBN 978-80-86472-74-4.

KREJSEK, Jan, 2021. Imunopatogeneze infekce koronavirem SARS – CoV-2, s důrazem na roztroušenou sklerózu. Online. *NEUROLOGIE PRO PRAXI*. Roč. 22, č. 3, s. 236–241. Dostupné z: <https://www.neurologiepropraxi.cz/pdfs/neu/2021/03/11.pdf>. [cit. 2023-09-14].

KŘUPKA, Michal [@LLionTV], 2017. *Vakcinace kontra konspirace aneb mýty a fakta o očkování*. Online. 2017. Dostupné z: YouTube, https://www.youtube.com/watch?v=-dE-VHF1NP_o. [cit. 2023-09-05].

LAZCKA, Olovier; CAMPO, F. Javier Del a MUÑOZ, F. Xavier, 2007. Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. Online. *Biosensors and Bioelectronics*. Roč. 22, č., s. 1205-1217. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.06.036>. [cit. 2023-09-10].

LENZ, Ondřej, 2021. *Zeptejte se vědce: Spike protein a opravy DNA*. Online. BIOLOGICKÉ CENTRUM. České Budějovice: Biologické centrum AV ČR. Dostupné z: <https://www.bc.cas.cz/clanky/clanek-detail/6272-%e2%80%9ekoronavirus%e2%80%9c-%e2%80%93-%e2%80%9ezajima-vas/>. [cit. 2023-09-05].

LEWIS, Georgina; MACHINGAIFA, Francesca a MCGUIRE, Rachaela, 2023. *Immunosuppression and vaccines*. Online. Melbourne vaccine education centre. Dostupné z: <https://mvec.mcri.edu.au/references/immunosuppression-and-vaccines/>. [cit. 2023-09-25].

MADÉLON, Natacha; LAUPER, Kim; BREVILLE, Gautier; ROYO, Irène Sabater; GOLDSTEIN, Rachael et al., 2022. Robust T-Cell Responses in Anti-CD20-Treated Patients Following COVID-19 Vaccination: A Prospective Cohort Study. Online. *Clinical Infectious Diseases*. Roč. 75, č. 1, s. 1037-1045. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/cid/ciab954>. [cit. 2024-01-12].

MAYO CLINIC, 1998-2023. *COVID-19 antibody testing*. Online. MAYO CLINIC. Mayo Foundation for Medical Education and Research. Dostupné z: <https://www.mayoclinic.org/tests-procedures/covid-19-antibody-testing/about/pac-20489696>. [cit. 2023-09-05].

MCKINNON, Katherine M., 2018. Flow Cytometry: An Overview. Online. *Current protocols in immunology*. Roč. 120, č. 2, s. 1-11. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/cpim.40>. [cit. 2023-09-23].

METROHM, 2022. Elektrochemiluminiscence: další úroveň optické citlivosti. Online. Metrohm. Dostupné z: https://www.metrohm.com/cs_cz/products/electrochemistry/electrochemiluminiscence.html. [cit. 2023-09-12].

MOLONEY, Brian, 2023. *Cryopreservation of cells: Preserving cells for future use*. Online. Single Use Support. Dostupné z: <https://www.susupport.com/knowledge/cell-banking/cryopreservation-of-cells>. [cit. 2023-12-23].

OCHANI, Rohan Kumar a, et al., 2021. COVID-19 pandemic: from origins to outcomes. A comprehensive review of viral pathogenesis, clinical manifestations, diagnostic evaluation, and management. Online. *Le Infezioni in Medicina*. Roč. n., č. 1, s. 20-36. Dostupné z: https://www.infezmed.it/media/journal/Vol_29_1_2021_3.pdf. [cit. 2023-09-05].

ORTHO-CLINICAL DIAGNOSTICS, 2021. *VITROS Immunodiagnostic Products INSTRUCTIONS FOR USE CoV2T*. Online. Ortho-Clinical Diagnostics. Dostupné z: <https://www.fda.gov/media/136967/download>. [cit. 2023-09-12].

OYAERT, Matthijs; SCHEERDER, Marie-Angélique De; HERREWEGE, Sophie Van; LAUREYS, Guy; ASSCHE, Sofie Van et al., 2022. Evaluation of Humoral and Cellular Responses in SARS-CoV-2 mRNA Vaccinated Immunocompromised Patients. Online. *Frontiers in Immunology*. Roč. 13, č. 858399, s. 1-13. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.858399>. [cit. 2024-01-20].

PAUL, William E., 2013. *Fundamental Immunology*. Sedmé vydání. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business. ISBN 978-1-4511-1783-7.

PETRÁŠ, Marek, c1999-2019. *Nežádoucí účinky*. Online. Vakcíny.net. Internetové informační centrum správného očkování. Dostupné z: https://www.vakciny.net/principy_ockovani/pr_05.html. [cit. 2023-08-31].

POMPSCH, Mosche; FISENKCI, Peter A.; KRAEMER, Markus a LINDEMANN, Monika, 2021. Evidence of extensive cellular immune response after SARS-CoV-2 vaccination in ocrelizumab-treated patients with multiple sclerosis. Online. *Neurological Research and Practice*. Roč. 3, č. 60, s. 1-6. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s42466-021-00158-5>. [cit. 2024-01-16].

QUI, Martin; LE BERT, Nina; CHAN, Webber Pak Wo; TAN, Malcolm; HANG, Shou Kit et al., 2022. Favorable vaccine-induced SARS-CoV-2-specific T cell response profile in patients

undergoing immune-modifying therapies. Online. *J Clin Invest*. Roč. 12, č. 132. Dostupné z: <https://doi.org/10.1172/JCI159500>. [cit. 2024-01-16].

REUKEN, P.A.; ANDREAS, N.; GRUNERT, P.C.; KAMRADT, S.; STALLMACH, T. et al., 2022. T Cell Response After SARS-CoV-2 Vaccination in Immunocompromised Patients with Inflammatory Bowel Disease. Online. *Journal of Crohn's and Colitis*. Roč. 2, č. 16, s. 251–258. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjab147>. [cit. 2024-01-12].

RICE, Jerry M.; BAAN, Robert A.; STEWART, Bernard W. a STRAIF, Kurt, 2019. Chapter 16 Immunosuppression. Online. In: *Tumour Site Concordance and Mechanisms of Carcinogenesis*. 165. International Agency for Research on Cancer, s. 158-162. ISBN 978-92-832-2215-6. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK570327/pdf/Bookshelf_NBK570327.pdf. [cit. 2023-09-24].

RUMLAROVÁ, Šárka a KOSINA, Pavel, 2014. *Vakcinace u imunokompromitovaných osob*. Online. Remedia. Dostupné z: <https://www.remedia.cz/rubriky/prehledy-nazory-diskuse/vakcinace-u-imunokompromitovanych-osob-6743/>. [cit. 2023-09-14].

RYZHIKOV, Alexander B., et al., 2023. Assessment of Safety and Prophylactic Efficacy of the EpiVacCorona Peptide Vaccine for COVID-19 Prevention (Phase III). Online. *Vaccines Multidisciplinary Digital Publishing Institute*. Roč. 11, č. 5, s. 998. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/vaccines11050998>. [cit. 2023-09-05].

R&D SYSTEMS, INC., 2023. *ELISpot Assay Principle*. Online. Biotechne R&D systems. Dostupné z: <https://www.rndsystems.com/products/elispot-assay-principle>. [cit. 2023-09-21].

SCHECHTER, Bilha, 1980. Lymphocyte Stimulation by Nonspecific Mitogens. Online. In: *Lymphocyte Stimulation*. 1. Springer, Boston, MA, s. 1-13. ISBN 978-1-4684-6997-4. Dostupné z: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4684-6997-4_1. [cit. 2023-12-26].

SCHWARZ, Megan; TORRE, Denis; LOZANO-OJALVO, Daniel; TAN, Anthony T. a , Kolektiv, 2022. Rapid, scalable assessment of SARS-CoV-2 cellular immunity by whole-blood PCR. Online. *Nature Biotechnology*. Roč. 40, č. 11, s. 1680–1689. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41587-022-01347-6>. [cit. 2023-09-21].

SLOTA, Meredith; LIM, Jong-Baeck; DANG, Yushe a DISIS, Mary L, 2011. ELISpot for measuring human immune responses to vaccines. Online. *Expert Rev Vaccines*. Roč. 10, č. 3, s. 299–306. Dostupné z: <https://doi.org/10.1586/erv.10.169>. [cit. 2023-09-21].

SOBOTKOVÁ, Marta a BARTUŇKOVÁ, Jiřina, 2019. Současné trendy v imunosupresivní léčbě. Online. *Vnitřní lékařství*. Roč. 65, č. 2, s. 136-142. Dostupné z: <https://doi.org/10.36290/vnl.2019.027>. [cit. 2023-09-05].

SPICUZZA, Lucia; CAMPAGNA, Davide; DI MARIA, Chiara; SCIACCA, Enrico; MANCUSO, Salvatore et al., 2023. An update on lateral flow immunoassay for the rapid detection of SARS-CoV-2 antibodies. Online. *AIMS Microbiology*. Roč. 9, č. 2, s. 375-401. Dostupné z: <https://doi.org/10.3934/microbiol.2023020>. [cit. 2023-08-26].

STEMCELL TECHNOLOGIES, 2023. *Cell Separation and Cell Isolation Methods*. Online. STEMCELL Technologies. Dostupné z: <https://www.stemcell.com/cell-separation/methods>. [cit. 2023-09-19].

SUTANDY, F.X. Reymond; QIAN, Jiang; CHEN, Chien-Sheng a ZHU, Heng, 2013. Overview of Protein Microarrays. Online. *Current Protocols in Protein Science*. Roč. 72, č. 1. ISSN 1934-3655. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps2701s72>. [cit. 2023-09-26].

ŠAFARČÍK, Kristián; BARTOŠ, Vladimír a KARLÍKOVÁ, Marie, 2018. Principy imunoanalytických metod. Online. *POSTUDIUM*. ISSN 1803-8999. Dostupné z: <https://postudium.cz/course/view.php?id=454>. [cit. 2023-09-05].

TESTLINE CLINICAL DIAGNOSTICS S.R.O., 2023. *Budoucnost patří multiplexu*. Online. TestLine. Brno. Dostupné z: <https://www.testlinecd.cz/microblot-array-mba>. [cit. 2023-08-31].

TORTORELLA, Carla; AIELLO, Alessandra; GASPERINI, Claudio; AGRATI, Chiara; CASTILLETI, Concetta et al., 2022. Humoral – and T-Cell–Specific Immune Responses to SARS-CoV-2 mRNA Vaccination in Patients With MS Using Different Disease-Modifying Therapies. Online. *Neurology Journal*. Roč. 5, č. 98, s. 541-544. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000013108>. [cit. 2024-01-16].

VACEK, Jan, 2006. Proteinové čipy v moderní klinické biochemii. Online. *Klinická biochemie a metabolismus*. Roč. 14, č. 1, s. 25–30. Dostupné z: <http://nts.prolekare.cz/cls/odkazy/kbm0601-25.pdf>. [cit. 2023-09-26].

VLAS, Tomáš, b.r. *Světový den imunologie 2022*. Online. POSTUDIUM. Plzeň: UNIVERZITA KARLOVA Lékařská fakulta v Plzni. Dostupné z: <https://postudium.cz/mod/book/view.php?id=7471&chapterid=2669>. [cit. 2023-09-05].

VLAS, Tomáš; TYMKIVOVA, Lenka; VELKOVÁ, Anna a LYSÁK, Daniel, 2018. Test blastické transformace pro sledování imunosupresivní léčby. Online. *Alergie*. Roč. 20, č. 1, s. 42-47. Dostupné z: https://www.tigis.cz/images/stories/Alergie/2018/1_18/vlas_1_18.pdf. [cit. 2023-09-23].

WHEELER, Sarah E.; SHURIN, Galina V.; YOST, Mary; ANDERSON, Adam; PINTO, Lisa et al., 2021. Differential Antibody Response to mRNA COVID-19 Vaccines in Healthy Subjects. Online. *Microbiology Spectrum*. Roč. 9, č. 1. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/spectrum.00341-21>. [cit. 2023-09-05].

WOOD, Kathryn a MORRIS, Peter, 1995. *The handbook of transplantant immunology*. Oxford: MedSci. ISBN 1900348004.

WHO, 2020. *Coronavirus disease (COVID-19)*. Online. World Health Organization. Geneva: WHO. Dostupné z: <https://www.who.int/health-topics/coronavirus>. [cit. 2023-09-05].

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1 Povolení sběru informací ve FN Plzeň	90
Příloha 2 Gatovací strategie analýzy proliferačního profilu.....	91
Příloha 3 Gatovací strategie analýzy cytokinového profilu	93

PŘÍLOHY

Příloha 1 – Povolení sběru informací ve FN Plzeň



FAKULTNÍ NEMOCNICE PLZEŇ

Útvar náměstka pro vnější vztahy a spolupráci s LF

Edvarda Beneše 13, 305 99 Plzeň - Bory
alej Svobody 80, 304 60 Plzeň - Lochotín
IČO 00669806 tel.: 377 401 111, 377 103 111

Vážená paní

Barbora Štěchová

Studentka oboru *Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví*

*Fakulta zdravotnických studií, Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví
Západočeská univerzita v Plzni*

Povolení sběru informací ve FN Plzeň

Na základě Vaší žádosti Vám jménem Útvaru náměstkyně pro vnější vztahy a spolupráci s lékařskou fakultou FN Plzeň **uděluji souhlas** se sběrem a zpracováním anonymizovaných dat z výsledků laboratorních metod, používaných v *Ústavu imunologie a alergologie (ÚIA) FN Plzeň*. Tento souhlas je vydáván, při splnění níže uvedených podmínek, v souvislosti s vypracováním Vaší bakalářské práce s názvem „*Sledování imunitní odpovědi u imunosuprimovaných jedinců*“.

Podmínky, za kterých Vám bude umožněna realizace Vašeho šetření ve FN Plzeň:

- Vrchní sestra ÚIA souhlasí s Vaším postupem.
- Osobně povedete svoje šetření.
- Vaše šetření nenaruší chod pracoviště ve smyslu provozního zajištění dle platných směrnic FN Plzeň, ochrany dat pacientů a dodržování Hygienického plánu FN Plzeň. **Vaše šetření bude provedeno za dodržení všech legislativních norem, zejména s ohledem na platnost zákona č. 372/2011 Sb.,** o zdravotních službách a podmínkách jejich poskytování, v platném znění.
- Údaje ze zdravotnické dokumentace pacientů, které budou uvedeny ve Vaší bakalářské práci, musí být zcela anonymizovány.
- Sběr informací budete provádět v době Vaší, školou schválené odborné praxe na ÚIA a pod přímým vedením oprávněného zdravotnického pracovníka, kterým **je Ing. Bc. Tomáš Vlas, odborný pracovník v laboratorních metodách ÚIA FN Plzeň.**

Po zpracování Vámi zjištěných údajů poskytnete zdravotnickému oddělení / klinice či organizačnímu celku FN Plzeň závěry Vašeho šetření, pokud o ně projeví oprávněný pracovník ZOK / OC zájem a budete se aktivně podílet na případné prezentaci výsledků Vašeho šetření na vzdělávacích akcích pořádaných FN Plzeň.

Toto povolení nezakládá povinnost zdravotnických pracovníků s Vámi spolupracovat, pokud by spolupráce s Vámi narušovala plnění pracovních povinností zaměstnanců. Spolupráce zaměstnanců FN Plzeň na Vašem šetření je dobrovolná.

Přeji Vám hodně úspěchů při studiu.

Mgr. Bc. Světluše Chabrová

Manažerka pro vzdělávání nelékařů

Útvar náměstkyně pro vnější vztahy a spolupráci s LF

Fakultní nemocnice Plzeň

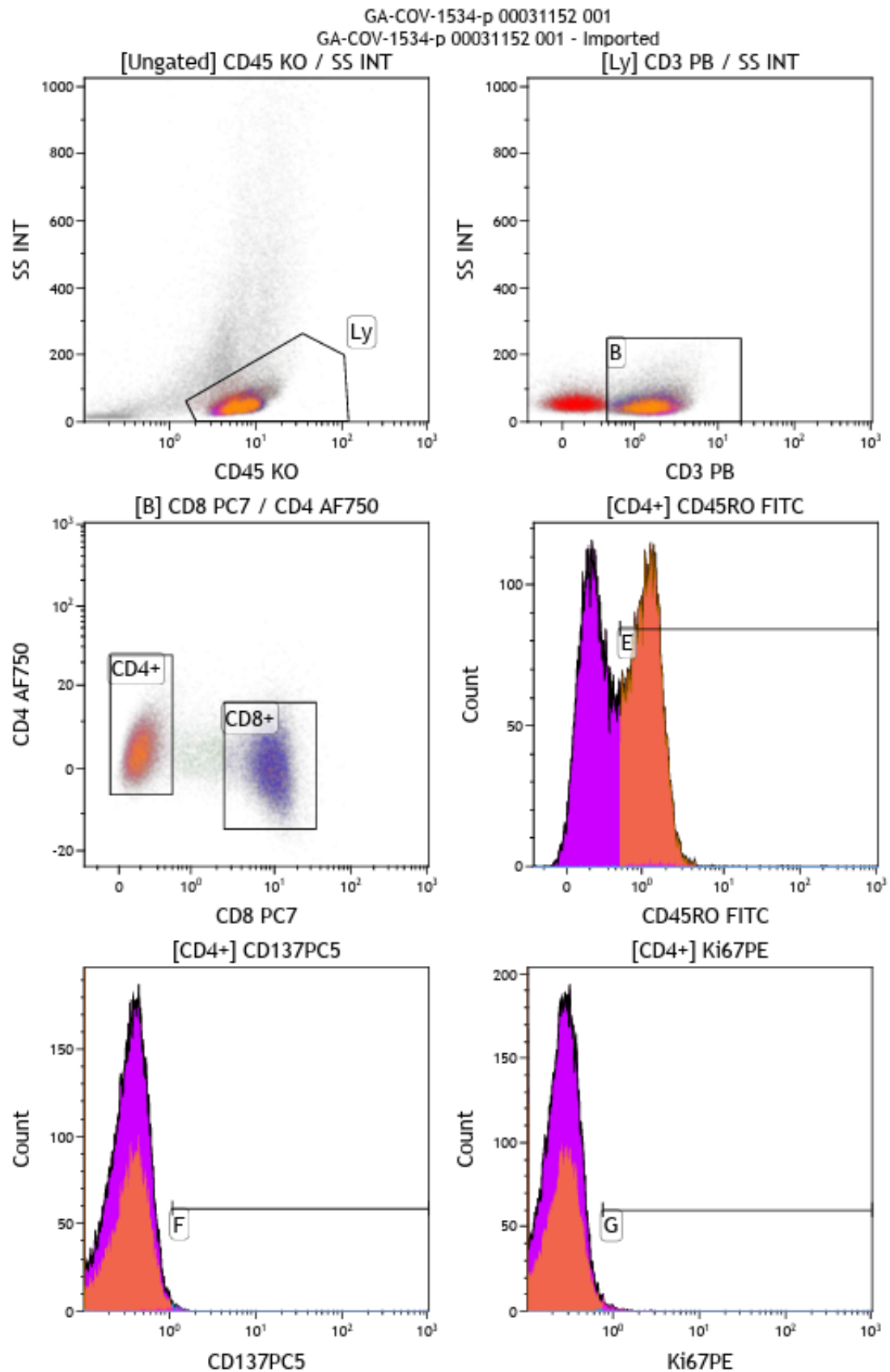
Edvarda Beneše 1128/13, 305 99 Plzeň

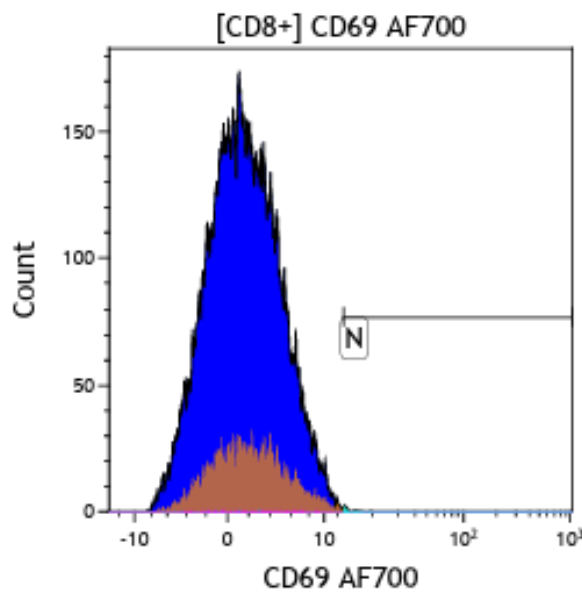
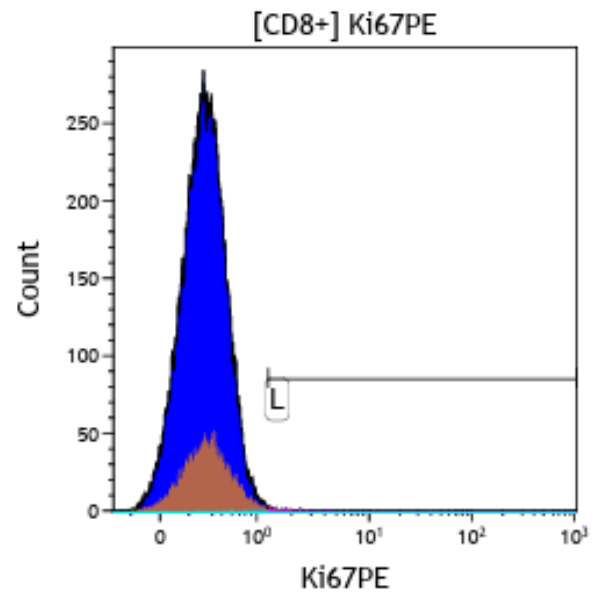
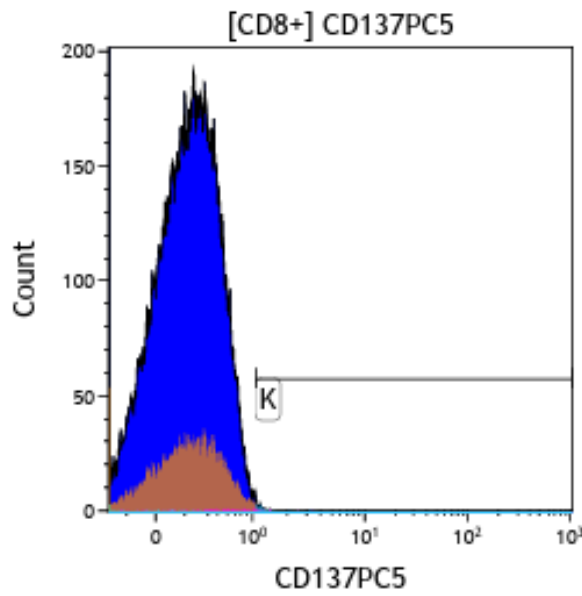
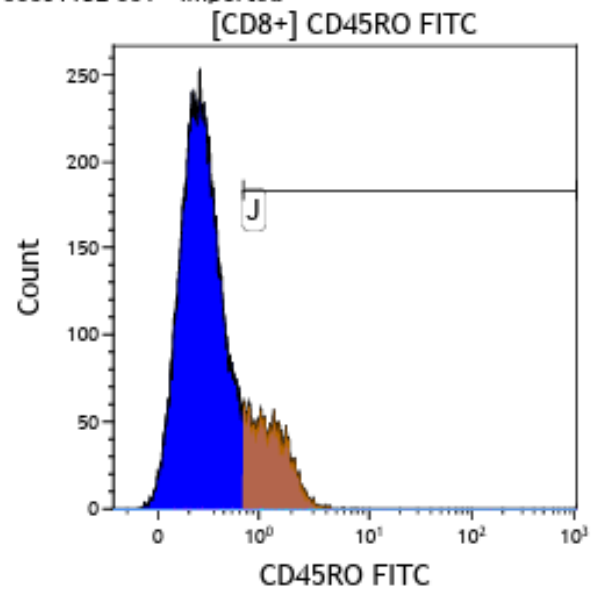
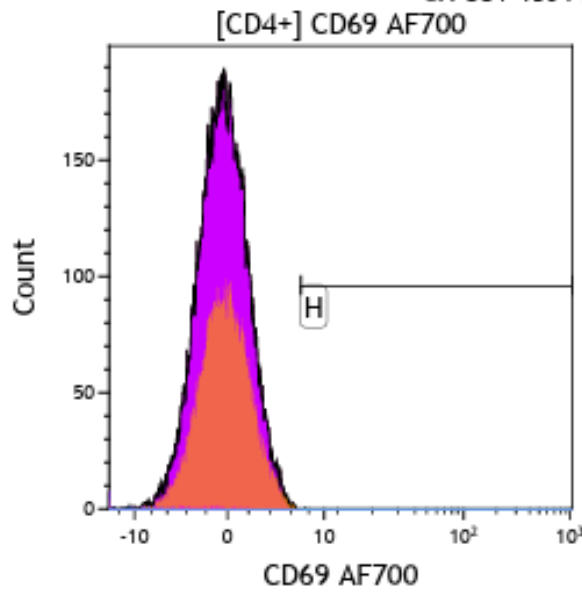
Tel: 377 401 663

E-mail: chabrovas@fnplzen.cz

12. 1. 2023

Příloha 2 – Gatovací strategie analýzy proliferačního profilu





Příloha 3 – Gatovací strategie analýzy cytokinového profilu

