

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Molekulární biologie a biochemie organismů

Studijní obor: Speciální chemicko-biologické obory



Magdalena Vítková

Analýza RNA slizničního epitelu nosohltanu

RNA analysis of nasopharyngeal swab

Bakalářská práce

Školitel: Ing. Lenka Steiner Mrázová Ph.D.

Praha, 2021

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 5. 5. 2021

Podpis: _____

Poděkování:

Ráda bych poděkovala Ing. Lence Steiner Mrázové Ph.D. za trpělivost, odborné rady a čas, který mi věnovala při psaní této bakalářské práce.

Abstrakt

Nosohltanový stěr je velmi heterogenní snadno dostupný biologický materiál, který se využívá především k diagnostice infekčních onemocnění horních cest dýchacích. V poslední době je však čím dál více využíván i v biomedicínském výzkumu. Nosohltan je místem styku zevního a vnitřního prostředí jedince, je místem první imunitní odpovědi při vniknutí cizorodých látek či patogenů do dýchacích cest. Poškození sliznice spouští zánětlivé, reparační a regenerační procesy, kterých se účastní celá řada buněk imunitního systému. Sliznice nosohltanu jsou trvale osídleny rozsáhlou skupinou mikroorganismů, které mají vliv na propuknutí a průběh onemocnění. Nosohltanový stěr je tak velmi bohatým zdrojem širokého spektra buněk hostitele a jeho mikrobiomu.

Zavedením metody masivního paralelního sekvenování došlo k rozvoji a automatizaci metod izolace DNA a RNA. Dále vedla k výraznému snížení nákladů na jejich analýzu a poskytuje řadu informací o genomu hostitele, zastoupení mikroorganismů, přítomnosti patogenů a také o aktuální výši exprese genů hostitele i patogenu. Díky zavedení metody single cell sekvenování je možné sledovat interakci jednotlivých buněčných typů za fyziologického stavu i během imunitní odpovědi.

Cílem práce je poskytnout přehled o biologické funkci nosohltanu, jeho buněčném složení a metod RNA sekvenování, které vede k diagnostice onemocnění i lepšímu pochopení biologických procesů.

Klíčová slova: nosohltan, mikrobiom, imunitní systém, patogen, RNA sekvenování, genová exprese, infekční onemocnění, diagnóza

Abstract

The nasopharyngeal swab is a very heterogeneous easily available sample which is used to diagnose infectious diseases of the upper respiratory tract.

Recently, the swab is increasingly used in biomedical research. The nasopharynx is the place of contact between the external and internal surrounding of an individual and the first immune response to the intrusion of pathogens. Mucosal damage initiates inflammatory and regenerative processes. The nasopharyngeal mucosa is permanently inhabited by a large group of microorganisms which influence the process of the disease. Therefore, the nasopharyngeal swab is a very rich source of host cells and its microbiome.

The introduction of the method of massive parallel sequencing, has developed and automated methods for DNA and RNA isolation. It also led to a significant reduction in the cost of their analysis and provides an information about the host genome, the presence of microorganisms and the current level of expression of host and pathogen genes as well. Thanks to the introduction of the single cell sequencing method, it is possible to monitor the interactions of individual cell types under physiological conditions and during the immune response.

The aim of this work is to provide an overview of the biological function of the nasopharynx, its cellular composition and RNA sequencing method, which lead to the diagnosis of the disease and a better understanding of biological processes.

Key words: nasopharynx, microbiome, immune system, pathogen, RNA sequencing, gene expression, infectious diseases, diagnosis

Obsah

1.	Úvod	1
2.	Horní cesty dýchací.....	2
2.1	Histologie a anatomie horních cest dýchacích	2
2.1.1	Řasinkové buňky	5
2.1.2	Pohárkové buňky	5
2.1.3	Basální buňky	5
2.1.4	Čichové neurony	6
2.1.5	Podpůrné (sustentakulární) buňky.....	6
2.1	Imunologický význam nosohltanu	7
2.1.1	Epiteliální buňky	8
2.1.2	Lymfatický systém.....	8
3.	Mikrobiom	10
3.1.1	Mikrobiom u zdravých jedinců	10
3.1.2	Potencionálně patologický mikrobiom.....	11
3.1.3	Vliv prostředí	11
4.	RNA sekvenování	12
4.1	Příprava vzorku.....	12
4.2	Příprava knihovny	13
4.3	Sekvenování RNA.....	14
4.4	Zpracování dat	18
5.	Klinické a výzkumné využití	20
5.1	Infekční onemocnění	20
5.1.1	Chřipka.....	20
5.1.2	Koronavirus.....	21
5.2	Výzkum neinfekčních onemocnění.....	23
5.2.1	Výzkum neurodegenerativních onemocnění	23
5.2.2	Cystická fibróza.....	23
5.2.3	Astma.....	24
5.2.4	Rakovina	25
6.	Závěr	26
7.	Zdroje.....	28

Seznam použitých zkratk:

ACE2	angiotensin konvertáza	angiotensin converting enzyme 2
BAM	oboustranně asociativní paměť	bidirectional associative memory
CCL	chemokinový ligand s disulfidickým můstkem	CC chemokine ligand
cDNA	komplementární DNA	complementary DNA
CLR	lektinové receptory	C-type lectin receptors
CXCL	chemokiny	CXC chemokine ligand
Covid-19	onemocnění způsobené koronavirem	Coronavirus disease 2019
DAMP	molekuly uvolněné z poškozených buněk	damage associated molecular patterns
DNA	deoxyribonukleová kyselina	deoxyribonucleic acid
GSEA	analýza obohacení genové sady	Gene set enrichment analysis
iNs	indukované neurální buňky	Induced neurons
iPSCs	indukované pluripotentní kmenové buňky	Induced pluripotent stem cells
M buňka	microfold buňka	microfold cell
mRNA	mediátorová RNA	messenger RNA
MUC	mucin	mucin
NALT	lymfoidní tkáň asociovaná s nosní sliznicí	nasal-associated lymphoid tissue
NGS	sekvenování nové generace	next-generation sequencing
NK	přirozený zabiják	natural killer cell
NLR	NOD-like receptory	NOD-like receptors
PAMP	povrchové struktury patogenních organismů	pathogen-associated molecular patterns
PRR	pattern recognition receptory	pattern recognition receptors
RIN	číslo ukazující kvalitu RNA	RNA Integrity number
RLR	RIG-I-like receptory	retinoic acid-inducible gene- I-like receptors
RNA	ribonukleová kyselina	ribonucleic acid

rRNA	ribozomální RNA	ribosomal RNA
RSV	respirační syncytiální virus	Human respiratory syncytial virus
RT-PCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce	real time/reverse transcription polymerase chain reaction
RV	rhinovirus	rhinovirus
SARS-Cov-2	koronavirus	Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus
sIgA	sekreční imunoglobulin A	secretory immunoglobuline A
STAT1	transkripční faktor	signal transducer and activator of transcrption 1
TLR	receptory skupiny toll	toll-like receptors
TNF	faktor nekrotizující nádory	tumor necrosis factor
Treg	regulační T lymfocyt	regulatory T-cell
WHO	světová zdravotnická organizace	word health organization

1. Úvod

Pandemie onemocnění covid-19 prudce zasáhla veškerá zdravotnická i vědecká odvětví. Došlo k rychlému vývoji celé řady metod, které slouží k záchytu nemocných a přenašečů s covid-19. Jako vhodný biologický materiál k průkazu přítomnosti viru SARS-CoV-2 se ukázal nosohltanový stěr. Za poslední rok absolvoval výtěr z nosohltanu téměř každý občan naší republiky. Tento biologický materiál je vysoce heterogenní, obsahuje celou řadu buněčných typů i celou řadu mikroorganismů a díky tomu má velký potenciál v diagnostice i výzkumu mnoha dalších onemocnění a fyziologických procesů.

Nosohltan, jakožto součást horních cest dýchacích, tvoří prvotní bariéru mezi vnějším a vnitřním prostředím. Dochází zde k rozpoznání cizorodých látek a indukci přirozené imunitní odpovědi.

Kromě epiteliálních buněk obsahuje nosohltanový stěr i různé typy buněk imunitního systému. Čichový epitel obsahuje také čichové neurony, které podléhají rychlému opotřebení a jako jediné neurony jsou stále obnovovány. (Borgmann-Winter *et al.*, 2015); (Lavoie *et al.*, 2017) Součástí nosohltanu je i řada komensálních bakterií, které tvoří přirozený mikrobiom. Zdravý mikrobiom nosohltanu vykazuje velkou diverzitu, která je specifická díky anatomickému umístění nosohltanu. Rovnováha mezi komenzálními a potenciálně patogenními bakteriemi je křehká. Narušení této rovnováhy nebo dominantní zastoupení určitého rodu potenciálně patogenní bakterie může být identifikátorem různých onemocnění.

Mezi rychle se rozvíjející metody diagnostiky a výzkumu buněčných procesů patří RNA sekvenování metodou masivního paralelního sekvenování (označovaný jako NGS, new generation sequencing). Umožňuje z jednoho vzorku získat v krátkém čase pomocí jedné metody informace o přítomnosti patogenních organismů, jejich variantách (např. mutacích), složení mikrobiomu i o buněčné odpovědi hostitele (zvýšená nebo snížená exprese určitých genů apod.) (Tan *et al.*, 2019); (Zhai *et al.*, 2015); (Russell *et al.*, 2019).

Cílem této práce je předložit ucelený přehled o anatomii a histologii nosohltanu a jeho funkci. Popsat současné metody RNA sekvenování. A nakonec na vybraných onemocněních ukázat, jak RNA sekvenování nosohltanového stěru přispělo k diagnostice nebo prognóze onemocnění nebo pochopení jeho biologické podstaty.

2. Horní cesty dýchací

Nosohltan (*nasopharynx*) společně s nosní dutinou (*cavitas nasi*), vedlejšími dutinami nosními (*sinus paranasales*) a horní částí hrtanu (*larynx*) tvoří horní cesty dýchací, které umožňují průchod vzduchu do/z plic, kde dochází k výměně dýchacích plynů. Dýchací cesty jsou stále otevřené, proto jsou dostatečně pevné a elastické. Jsou tvořeny kostěnými výběžky (skořepy nosní, které se nacházejí v dutině nosní), chrupavkou a elastickými vlákny. (Hach, Zuzana and Těšík, 2003)

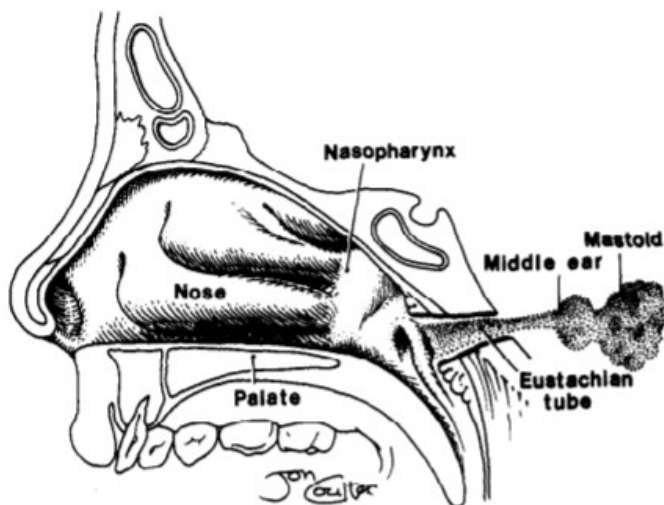
Funkcí horních cest dýchacích je vychytávání škodlivin, regulace teploty vdechovaného vzduchu a jeho zvlhčování. K úpravě vzduchu nedochází, pokud dochází k nádechu ústy. Mezi další funkce epitelu horních cest dýchacích řadíme čich a regulaci transportu vody a iontů. Nosohltan jako součást horních cest dýchacích tvoří prvotní mechanickou bariéru mezi vnějším prostředím a vnitřním homeostatickým prostředím člověka. Z toho důvodu má důležitou roli v imunitní odpovědi. Buňky slizničního epitelu filtrují vzduch a zbavují ho patogenů, čím snižují možnost vypuknutí infekce v plicích. V rámci imunologické odpovědi se využívá jak vrozené, tak adaptivní imunity. (Hiemstra, McCray and Bals, 2015); (Vajner *et al.*, 2017)

2.1 Anatomie a histologie horních cest dýchacích

Nosohltan je spojen s nosní dutinou skrze vnitřní nozdry (*choanae*), které odděluje přepážka tvořená kostí radličnou (*vomer*). S dutinou ústní (*oral cavity*) je nosohltan propojen velofaryngeálním otvorem (*velopharyngeal sphincter*). Laterálně do nosohltanu vstupuje Eustachova trubice, jejíž funkcí je vyrovnávání tlaku ve středním uchu, ochrana před nosohltanovým sekretem a odvádění sekretu středního ucha do nosohltanu. (Obr.1) Při špatné funkci Eustachovy trubice dochází k zánětu středního ucha (*otitis media*) z důvodu průchodu sekretu nosohltanu spolu s patogeny do středního ucha. (Bluestone and Doyle, 1988)

Na stropě nosohltanu leží nosní mandle (*tonsilla pharyngea*), která je tvořena lymfatickou tkání a sekrečními žlázami. Nosní mandle se zapojuje v lokální imunitní odpovědi nosohltanu, kde udržuje rovnováhu mezi jednotlivými bakteriálními koloniemi. (van Cauwenberge *et al.*, 1995). Největší velikosti dosahuje nosní mandle v období mezi 3. až 5. rokem života, po 7. roce mizí. Při často se opakujících rinosinusitidách v dětském věku může dojít ke zbytnění a nosní neprůchodnosti. V takovém případě je nutné nosní mandli odstranit (adenotomie).

Nosohltan jako součást hltanu (*pharynx*) je místem, kde se kříží dýchací a trávící cesty. Při polknutí dochází ke stahu měkkého patra, které se nachází nad tvrdým patrem, a uzavření nosních dutin. Potravě je tak zabráněno vstupu do nosních dutin.



Obr. 1 – anatomie horních cest dýchacích (Bluestone and Doyle, 1988)

Horní cesty dýchací jsou tvořeny sliznicí (*tunica mucosa*) a podslizničním vazivem (*tela submucosa*). Podslizniční vazivo je řídké kolagenní vazivo, které je tvořeno elastickými vlákny, lymfatickými uzly a kapilárami.

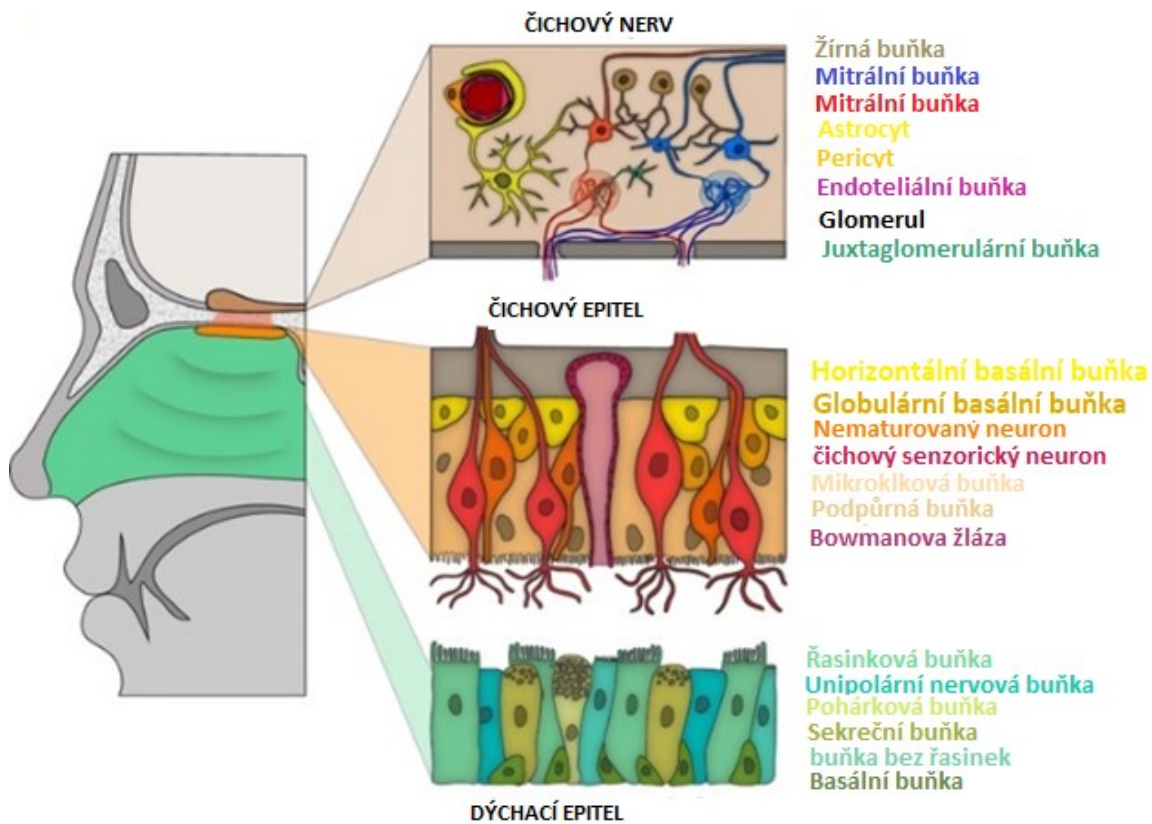
Sliznice dýchacích cest je složena z epitelu (*lamina epithelialis*) a vaziva (*lamina propria mucosae*), které jsou odděleny basální laminou (*lamina basalis*). Sliznice horních cest dýchacích rozdělujeme na čichovou oblast a dýchací oblast. (Obr. 2)

Dýchací epitel se nachází jak v horních, tak i v dolních dýchacích cestách. Čichový epitel se vyskytuje v horní části nosních dutin. (Obr. 3)

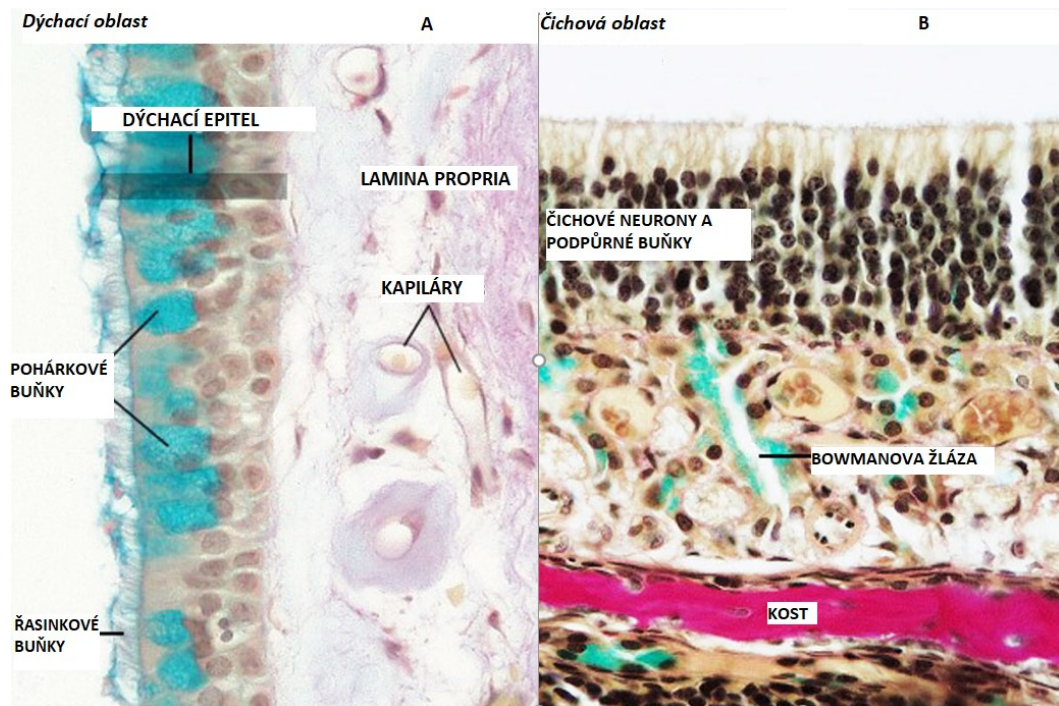
Dýchací oblast je vystlána víceřadým cylindrickým řasinkovým epitelem, ve kterém jsou zastoupeny řasinkové a pohárkové buňky. Z důvodu mechanického namáhání se směrem k hltanu (*pars oralis pharingis*) posléze přeměňuje ve vrstevnatý dlaždicový epitel. Dýchací epitel je pokryt mucinem, který slouží k zachycení patogenů a škodlivin. Mucin spolu se zachycenými částicemi je pomocí řasinkových buněk vykašlán. (Hach, Zuzana and Těšík, 2003); (Vajner *et al.*, 2017). Muciny jsou O-glykosylované glykoproteiny, které jsou sekretovány pohárkovými buňkami nebo jsou vázány v membráně na vnější straně slizničního epitelu. Kromě MUC1 jsou přítomny MUC5AC a MUC6, specifické pro respirační epitel. MUC5AC je vylučován na povrchu dýchacího epitelu pohárkovými buňkami. MUC5B je produkován Bowmanovými žlázami v čichovém epitelu. (Amini *et al.*, 2019) Při produkci MUC5B, na rozdíl od MUC5AC, dochází k odkašlávání a tím i k vyloučení patogenů ven z těla.

Bez MUC5B se zvyšuje riziko infekce z důvodu akumulace antigenů a aktivuje se protizánětlivá odpověď. (Roy *et al.*, 2014)

Čichový epitel má chemoreceptivní funkci. V apikální vrstvě epitelu se nacházejí podpůrné (sustentakulární) buňky jež mají podpůrnou funkci a fagocytují odumřelé nervové buňky. Pod apikální vrstvou se nachází vrstva intermediální. Zde se nalézají maturované a nematurované neurony. Společně tvoří neuroepitel, který je neustále obnovován pomocí multipotentních buněk. Čichové buňky přijímají podněty svými dendrity, signál je dále veden axony přes laminu propriu a předáván pomocí synapsí až neuronům čichového nervu. (Borgmann-Winter *et al.*, 2015); (Lavoie *et al.*, 2017) s



Obr 2 - Porovnání buněk čichového nervu, čichového a dýchacího epitelu (Brann *et al.*, 2020)



Obr. 3 - histologický řez; A) dýchací oblast – apikální stranu tvoří pohárkové a řasinkové buňky, basální strana dýchacího epitelu je v kontaktu s vazivovou vrstvou lamina propria. V lamině propria se nacházejí kapiláry. B) čichová oblast – apikální stranu čichového epitelu tvoří čichové neurony a podpůrné buňky²

2.1.1 Řasinkové buňky

Všechny řasinkové buňky při maturaci procházejí tzv. ciliogenezí, kdy dochází ke vzniku cílů. Jejich funkcí je hydratace dýchacích cest. Na apikální straně obsahují aquaporiny, kterými mohou regulovat vodu, která se dostává do dýchacích cest. Řasinkové buňky jsou využívány k posouvání mucinové vrstvy. Tu posouvají pomocí koordinovaného pohybu cílů. U kuřáků a lidí s cystickou fibrózou dochází k dysfunkci řasinkových buněk, což zvyšuje pravděpodobnost infekce. (Eon Kuek and Lee, 2020) (Obr. 4a)

2.1.2 Pohárkové buňky

Hlavní funkcí pohárkových buněk je sekrece mucinu. Produkovaný mucin slouží jako obranný mechanismus, jelikož aktivuje zánětlivou odpověď. (Roy *et al.*, 2014) Počet pohárkových buněk je dán vnějším prostředím, koncentrací antigenů či škodlivin. (Obr. 4a, 4b)

Lidé s astmatem, cystickou fibrózou nebo kuřáci mají zvýšenou expresi pohárkových buněk. (Ma, Rubin and Voynow, 2018); (Roy *et al.*, 2014)

2.1.3 Basální buňky

Basální buňky jsou multipotentní buňky zodpovědné za udržování homeostázy v epitelu a obnovu epitelu při poškození. (Rock, Randell and Hogan, 2010) Maturací se diferencují na pohárkové buňky nebo buňky čichové. (Vajner *et al.*, 2017)

Basální buňky jsou ve styku s basální laminou a dělí se na dva druhy buněk, horizontální a globulární. Horizontální basální buňky obnovují poškozený epitel, globulární basální buňky jsou především v čichovém epitelu, kde fungují jako progenitory pro čichové neurony. (Schwob et al., 2017) (Obr. 4a)

2.1.4 Čichové neurony

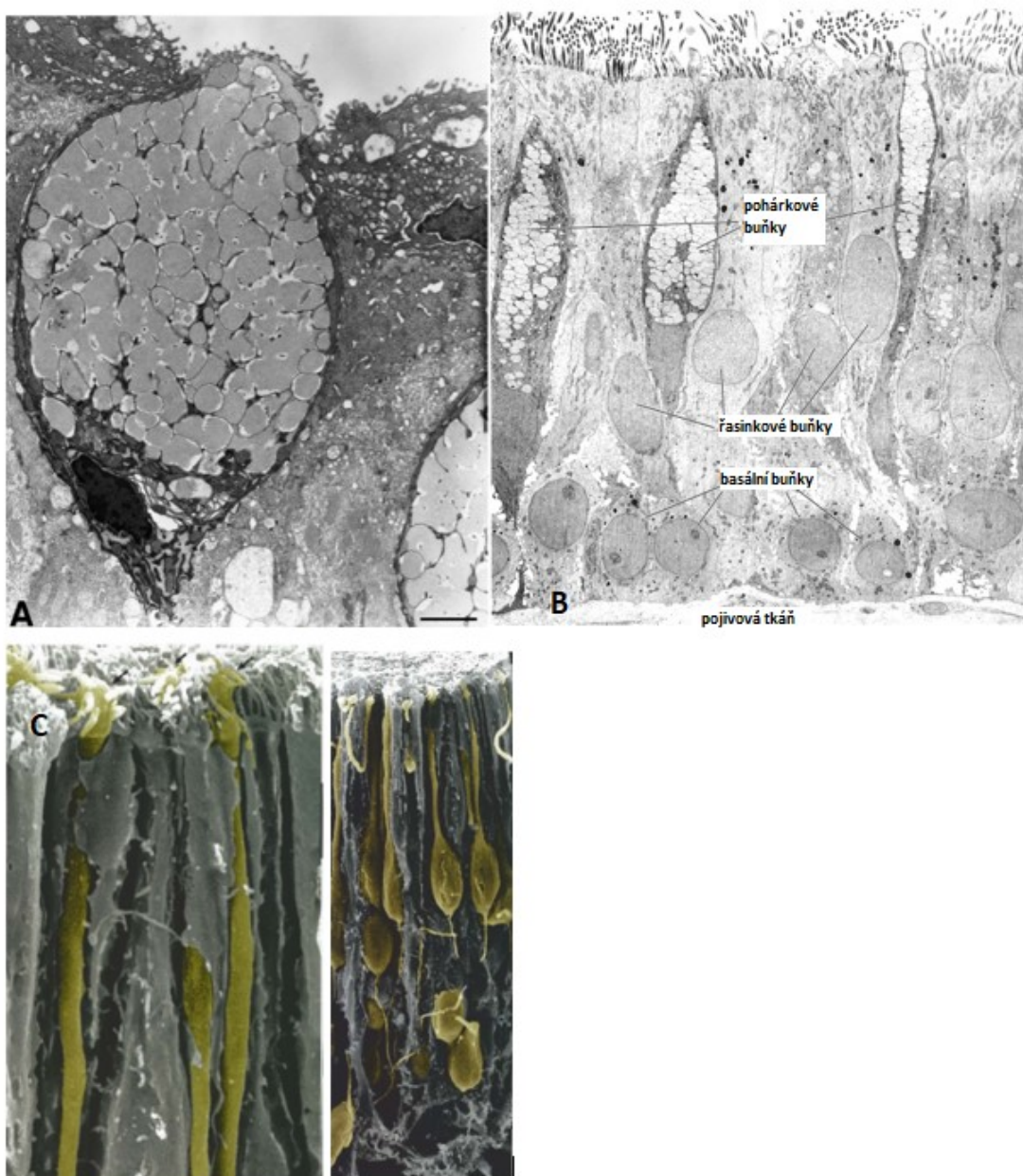
Čichové neurony jsou bipolární neurony, které se vyskytují pouze v čichovém epitelu v nosních dutinách. (Cunningham et al., 1999)

U čichových neuronů dochází k velké degeneraci, neboť jako jediný druh neuronu je na povrchu epitelu a přichází často do styku s patogeny. Z toho důvodu dochází k obnově senzorických čichových neuronů (jako jediných neuronů) pomocí podpůrných buněk, které je fagocytují, a basálních buněk, které se diferencují do nových čichových neuronů. (Steinke et al., 2008) (Liang, 2020) (Obr. 4c)

2.1.5 Podpůrné (sustentakulární) buňky

Jsou lokalizovány v apikální vrstvě čichového epitelu a jejich funkcí je fagocytóza odumřelých nervových buněk (Borgmann-Winter *et al.*, 2015)

Podpůrné buňky mají na své laterální straně mikroklky a v čichovém epitelu zastávají funkci buněk gliových. Poskytují ochranu a podporují čichové neurony. Podpůrné buňky jsou mezi sebou spojeny těsnými spoji (tight junction). Celkově obklopují jednotlivé dendrity maturovaných čichových neuronů, čímž dochází k jejich elektrické izolaci. V bazální vrstvě čichového epitelu již není krytí maturovaných neuronů úplné, a proto dochází k shlukování axonů a synapsím mezi nimi. (Nomura, Takahashi and Ushiki, 2004); (Liang, 2020) (Obr. 4c)



Obr. 4 – A) pohárková buňka pod elektronovým mikroskopem (Gipson, 2016); B) dýchací epitel průdušnice. V tomto epitelu jsou vyznačeny tři typy buněk: pohárkové buňky, řasinkové buňky a basální buňky¹; C) čichový neuron a podpůrná buňka pod elektronovým mikroskopem; žlutě jsou vyznačeny čichové neurony; u laminárního povrchu jsou dendrity hustě obklopeny podpůrnými buňkami (Nomura, Takahashi and Ushiki, 2004)

2.1 Imunologický význam nosohltanu

Sliznice horních cest dýchacích přichází do styku s mnoha patogeny, ale i s velkou škálou komenzálních mikroorganismů. Imunitní systém horních cest dýchacích na jedné straně brání vypuknutí infekce především v plicích, na druhou stranu musí být velmi tolerantní. V opačném případě by docházelo k zánětlivým odpovědím, což by vedlo buď k alergiím či autoimunitním

onemocněním. (Hořejší and Bartůňková, 2017) Složky imunitního systému jsou epiteliální buňky a lymfoidní tkáň nosu a nosohltanu (NALT)

V rámci imunologické odpovědi se využívá jak vrozené, tak adaptivní imunity. (Hiemstra, McCray and Bals, 2015)

2.1.1 Epiteliální buňky

Povrch epiteliálních buněk je součástí prvotní mechanické bariéry. Cizorodé látky jsou odstraněny pohybem řasinek, prouděním vzduchu, a sekretu žláz.

Epiteliální buňky, především neutrofilů, makrofágů a dendritické buňky, se současně podílejí na přirozené imunitní odpovědi. Dendritické buňky pronikají svými výběžky na apikální stranu epitelu a přímo vychytávají vdechnuté antigeny, které pak prezentují lymfocytům. Slizniční dendritické buňky mají většinou protizánětlivý účinek, jelikož indukují tvorbu regulačních T lymfocytů (Treg). (Hořejší and Bartůňková, 2017)

Mikroorganismy, plísňe a viry jsou rozeznávány pomocí povrchových receptorů epiteliálních buněk (PRR, Pattern recognition receptors). PRR váží části konzervované struktury patogenních organismů (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) anebo molekuly či struktury poškozených buněk, jež jsou normálně v intracelulárním prostoru (damage-associated molecular patterns, DAMPs). (Takeuchi and Akira, 2010) Mezi PRR patří TLR receptory (Toll like receptors), CLR (C-type lectin receptors), RLRs (RIG-I-like receptory, retinoic acid-inducible gene-I-like receptors) a NLRs (NOD-like receptors). (Hiemstra, McCray and Bals, 2015) Aktivaci dochází k imunitní odpovědi, expresi chemokinů či cytokinů, proliferaci, případně se spouští procesy adaptivní imunity nebo autofagocytózy (Borghini, Hibberd and Davila, 2018); (Scherzad et al., 2019).

2.1.2 Lymfatický systém

Mukózní lymfatický systém nosu a nosohltanu (NALT) se nachází v submukózní části epitelu v lamina propria. Součástí organizovaného lymfatického systému je nosní/nosohltanová mandle, která spolu s krčními mandlemi, jazykovou mandlí a trubicovými mandlemi tvoří tzv. Waldeyerův lymfatický okruh. Spojení mezi submukózním lymfatickým systémem a povrchem epitelu zajišťují kromě dendritických buněk i microfold (M) buňky. (Bemark *et al.*, 2019) M buňky na apikální straně epitelu pohlcují vzorky z prostředí a pomocí transcytózy je přenášejí do lamina propria. Součástí lymfatického systému jsou B a T lymfocyty, makrofágy a neutrofilů. Důležitou součástí adaptivního i přirozeného imunitního systému je tvorba sekrečních IgA protilátek (sIgA) antigen prezentujícími buňkami (B-lymfocyty a plazmatické

buňky). sIgA protilátky neaktivují komplement klasickou cestou, čili nejsou prozánětlivé a díky tomu nedochází k poškození sliznice. (Daha Gijlswijk-Janssen *et al.*, 2001) Jejich funkce je především v neutralizaci antigenu, sIgA se naváže na antigen a tím zabrání jeho adhezi k epiteliálním buňkám a následnému průniku do organismu. (Corthésy, 2013) sIgA protilátky se na povrch epitelu přenášejí pomocí transcytózy epiteliálními buňkami. K přenosu slouží Fc-receptor, jehož část zůstává po přenosu součástí sIgA, tzv. sekreční komponenta. (Woof and Kerr, 2006) (Hořejší and Bartůňková, 2017)

3. Mikrobiom

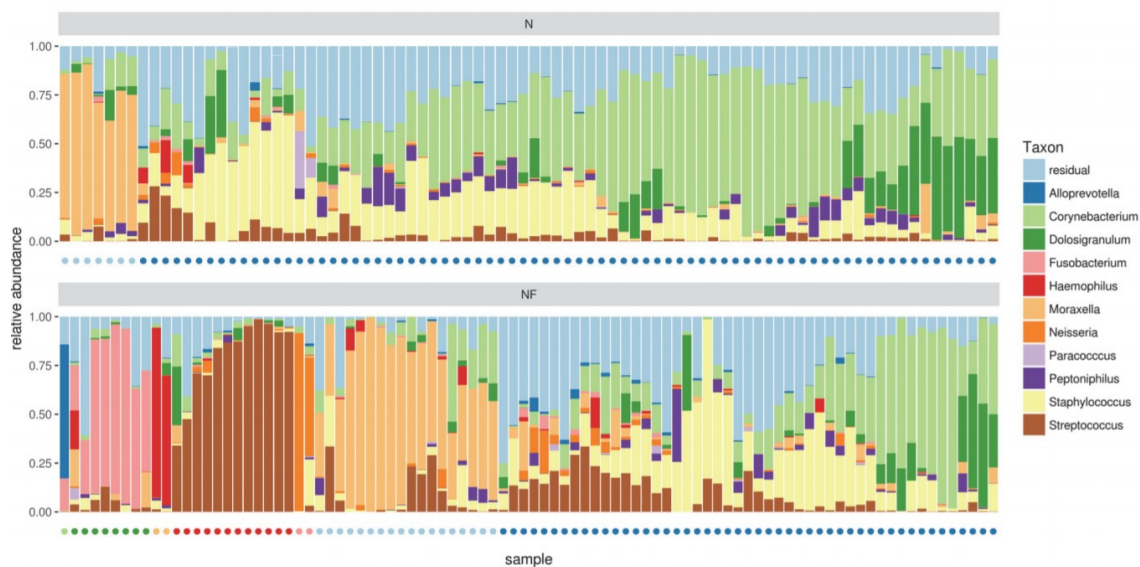
Jako první definoval lidský mikrobiom Lederberg a McCray (Lederberg and McCray, 2001): „ Mikrobiom je komunita komensálních, symbiotických a patogenních mikroorganismů, které doslova sdílí prostor v našem těle“.

3.1 Mikrobiom u zdravých jedinců

Horní cesty dýchací jsou vystaveny podmínkám vnějšího prostředí, setkávají se s mikroby a viry. Anatomickým rozdělením horních cest dýchacích se utváří „ekosystémy“, které tvoří příhodné prostředí pro různé druhy bakterií. (Ho Man, de Steenhuijsen Pipers and Bogaert, 2017)

Čtyři nejvíce zastoupené kolonie bakterií v nose jsou *Propionibacterium*, *Corynebacterium*, *Moraxella* a *Staphylococcus*. (Zhou et al., 2014)

V nosohltanových stěrech zdravých jedinců byly dominantními bakteriemi: *Staphylococcus*, *Corynebacterium* a *Dolosigranulum* (53,3 % vzorků). Významnou část tvořily bakterie *Moraxella* (19,6%), *Streptococcus* (13 %), nebo *Fusobacterium* (8,7 %). V menším množství se vyskytovaly *Neisseria* (2,2 %), *Haemophilus* (2,2 %) a *Alloprevotella* (1,1 %). Bakteriální kolonie *Streptococcus*, nebo *Fusobacterium* jsou asociovány s nosohltanovým epitelem, ale nejsou přítomny v nosním epitelu. (Pope et al., 2017) Naopak v nosních dírkách zdravých jedinců se vyskytují především *Propionibacterium*, *Corynebacterium* a *Staphylococcus aureus*. V případě narušení rovnováhy mikrobiomu, se *Staphylococcus aureus* začne chovat patologicky. (Frank et al., 2010) Někteří jedinci jsou vůči kolonizaci bakterií *Staphylococcus aureus* imunní, zatímco jiní jsou jí kolonizováni dlouhodobě. (Kuehnert et al., 2006) U novorozenců jsou horní cesty dýchací nejprve kolonizovány bakteriemi *Streptococcus viridans* (41%) a *Gemella* (12 %). Pro zdravý vývoj nosohltanového mikrobiomu je důležité, aby u novorozenců došlo ke kolonizaci nosohltanu bakterií *Staphylococcus aureus*. Naopak brzká kolonizaci *Haemophilus influenzae* vede k zánětlivé odpovědi a vzniku dýchacích obtíží. U dětí do šesti měsíců se prokázala přítomnost *Corynebacterium* (25 %), *Moraxella* (21%) *Staphylococcus* (19 %) *Streptococcus* (11 %) *Dolosigranulum* (11 %) a *Haemophilus* (4 %). (Bosch et al., 2016)



Obr 5 - Porovnání nosohltanového mikrobiomu s mikrobiomem nosu u zdravých jedinců (Pope et al., 2017)

3.2 Potenciálně patologický mikrobiom

„O tom, zda je organismus zdravý nebo bude mít klinické projevy, rozhoduje křehká rovnováha mezi komenzálními mikroorganismy, patogenními mikrobi a odpovědí hostitele.“ (Libertucci and Young, 2019) Zdraví jedinci mají širokou škálu bakterií. Naopak u pacientů dojde k snížené biodiverzitě mikrobiomu a dojde k rozšíření patologické kolonie bakterií. (Frank et al., 2010)

V nosohltanu se vedle avirulentních bakterií vyskytují i potenciálně patogenní bakterie *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae* či *Haemophilus influenzae*. Ty jsou při vstupu do nosohltanu asymptomatické, ale později mohou při narušení rovnováhy imunitního systému způsobit především u dětí akutní zánět středního ucha (otitis media). Čím dříve dojde u dítěte ke kolonizaci těmito bakteriemi, tím se zvyšuje pravděpodobnost propuknutí onemocnění (Faden et al., 1997).

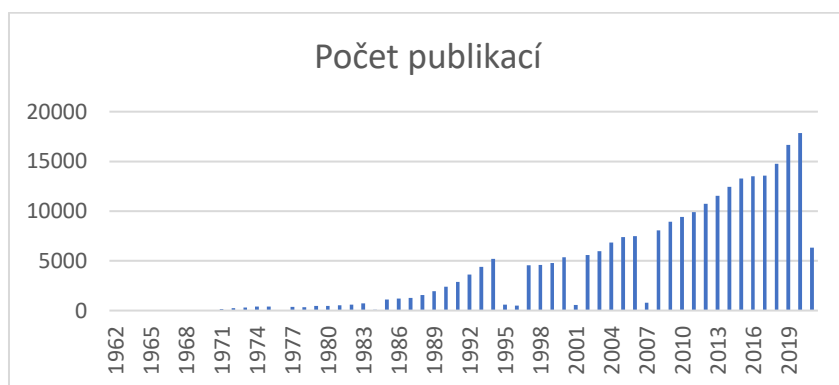
Narušení rovnováhy nosního a nosohltanového mikrobiomu je spojeno s celou řadou infekčních onemocnění horních cest dýchacích nebo s alergiemi či astmatem (viz kapitola 5.2.3).

3.3 Vliv prostředí

Ve spojitosti s kouřením byl prokázán zvýšený počet bakterií *Corynebacterium* a *Staphylococcus*. Naopak se neprokázala žádná výrazná změna mikrobiomu, která by byla asociována s pohlavím, věkem, krevní skupinou nebo ročním obdobím. Nebyla nalezena ani větší spojitost mezi mikrobiomem zdravých jedinců a jedinců s alergiemi. (Pope et al., 2017)

4. RNA sekvenování

RNA sekvenování je rychle se rozvíjející metodou především díky zavedení masivního paralelního sekvenování (NGS, new generation sequencing, Graf 1). V současné době lze velmi rychle a levně získat informaci o transkriptomu vybrané populace buněk. Pomocí NGS byla objevena řada nových alternativních sestřihových izoform RNA a nekódujících RNA. (Carninci, Yasuda and Hayashizaki, 2008) V případě heterogenní populace buněk je možné pomocí RNA single cell sekvenování určit jednotlivé buněčné typy. Takto byly nalezeny i nové buněčné typy, které by jinak vzhledem k jejich vzácnému zastoupení bylo těžké identifikovat. (Montoro *et al.*, 2018) Změny v transkriptomu jsou důležitým vodítkem při stanovení onemocnění, sledování vývoje nebo léčby onemocnění i při výzkumu biologické podstaty onemocnění. RNA sekvenování se dále využívá při identifikaci patogenů nebo pro analýzu mikrobiomu.



Graf 1: Počet publikací týkajících se RNA sekvenování od roku 1962 do roku 2021 podle NCBI (PubMed), celkem 251261 publikací do 30.4.2021

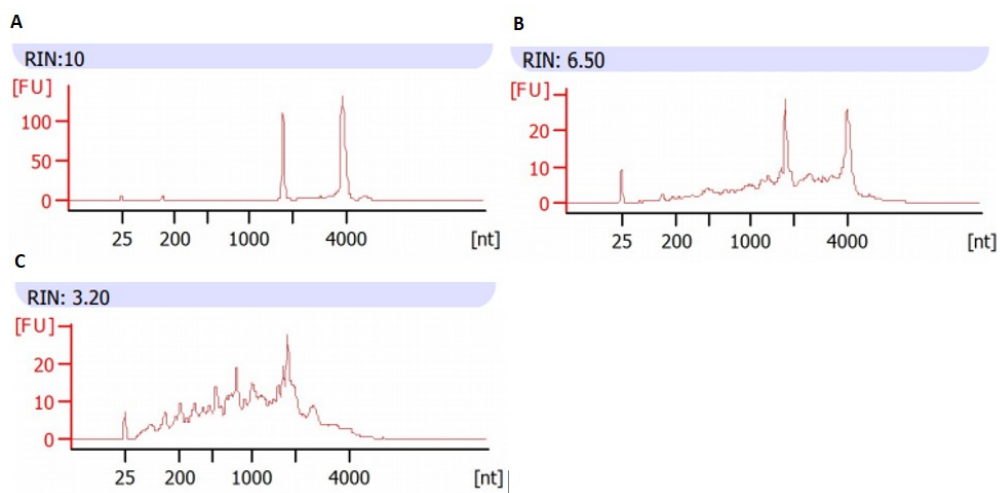
4.1 Příprava vzorku

Správně provedený odběr biologického materiálu a izolace RNA je stěžejním krokem při sekvenování RNA. Jednovláknová molekula RNA je málo stabilní a podléhá snadno degradaci v zásaditém prostředí, vlivem tepla nebo enzymy RNázami. Při izolaci je nutné dodržovat přísná pravidla pro práci s RNA (vyčleněný prostor v laboratoři, jednorázové rukavice, speciální pipety, voda a další).

Nosohltanový stěr se provádí nejlépe ráno, na lačno, speciální tyčinkou přes nosní dutinu ze zadní stěny nosohltanu, z oblasti s řasinkovým epitelem. Tyčinka se okamžitě umístí do izolačního média. Izolační médium obsahuje fenol a/nebo guanidiniové soli. Izolace se provádí fenol-chloroformovou extrací podle Chomczynski metody (Chomczynski, 1987), pomocí

křemičitých minikolonek nebo pomocí magnetických kuliček. (Ali et al., 2017) Během izolace nebo po izolaci je nutné vzorek RNA zbavit zbytků molekul DNA pomocí DNázy I. Izolovaná RNA rozpuštěná v čisté vodě se skladuje při -80°C . Podle účelu použití RNA vybíráme metodu izolace. Dnes existuje řada izolačních kitů na bázi minikolonek, které jsou schopny izolovat microRNA, dlouhé RNA, odstranit DNA apod. Poslední dobou se jako progresivní metoda jeví izolace pomocí magnetických kuliček, která umožňuje v krátkém čase izolaci velkého množství vzorků a je jednoduše automatizovatelná.

Množství izolované RNA se měří přímo spektrofotometriky, neboť purinové zbytky absorbují záření o vlnové délce 260 nm. Znečištění vzorku proteiny se stanovuje poměrem absorbancí 260 nm a 280 nm, (optimum 2,0 – 2,2), přítomnost zbytků fenolu nebo guanidiniových solí určuje poměr absorbancí 260 nm a 230 nm (optimum $> 1,7$). Při nízkých koncentracích a pro přesnější stanovení množství RNA se používají fluorescenční interkalační barviva, která interagují s RNA a zvyšují svou fluorescenci. Kvalitu RNA určuje číslo RIN (RNA integrity number). Jedná se o stupnici, která charakterizuje míru rozpadu RNA. RNA je rozdělena podle délky kapilární elektroforézou, pokud je kvalita RNA dobrá, na elektroforegramu jsou patrné dva ostré píky odpovídající rRNA o velikostech 18S a 28S (RIN > 8). V případě špatné kvality RNA (RIN < 4) píky nejsou patrné. (Obr. 6)



Obr. 6 – Znázornění kvality RNA pomocí čísla RIN (RNA Integrity number) na elektroforegramu A) vysoká kvalita RNA, RIN 10, jsou viditelné dva píky odpovídající podjednotkám rRNA: 18S a 28S; B) lehce degradovaná RNA, RIN 6,5; sále jsou zde pozorovatelné dva výraznější píky odpovídající podjednotkám 18S a 28S ;C) degradovaná RNA, RIN 3,2; nejsou zde viditelné píky, které by odpovídaly podjednotkám rRNA

4.2 Příprava knihovny

Příprava knihovny pro sekvenování na platformě Illumina.

Vhodná metoda pro přípravu knihovny je vybrána na základě analyzovaného typu RNA s ohledem na vstupní množství a kvalitu RNA. Obecně je RNA během procesu fragmentována na úseky o délce 200 – 400 párů bází a přepsána pomocí RNA dependentní DNA polymerázy (reverzní transkriptázy) na jednovláknovou komplementární DNA a poté na dvouvláknovou DNA. Na konce DNA jsou pomocí DNA ligázy připojeny sekvenační adaptory a nakonec je DNA amplifikována. Výsledná dvouvláknová DNA je poté sekvenována.

Sekvenační adaptory obsahují úseky pro navázání vlákna na sekvenační destičku, úseky pro sekvenační primery a unikátní úseky pro identifikaci vzorků. (Stark, Grzelak and Hadfield, 2019)

Celková RNA (total RNA) je z 95 – 97 % tvořena ribosomální RNA (rRNA). Při sekvenování total RNA informace o protein kódujících genech tvoří pouze 3 – 5 %. Sekvenování celkové RNA se využívá při studiu mikrobiomu nebo u silně degradovaných vzorků RNA.

Při studiu transkriptomu je však vhodné ribosomální RNA pro snížení sekvenačních nákladů odstranit. Jedním z možných způsobů je mRNA capture, který využívá struktury eukaryotické mRNA, která má na 3'-terminálním konci polyA sekvenci. K zachycení mRNA slouží oligo (d)T řetězec, který je zpravidla navázán na magnetické kuličky. PolyA konec mRNA hybridizuje k oligo (d)T a zbylá RNA je odstraněna. (Vomelová, Vaníčková and Šedo, 2009) Touto metodou nelze zachytit degradovanou RNA anebo RNA bez polyA konce, která se ale může podílet na expresi genu buď jako nekódující část nebo část kódující protein. (Zhao et al., 2014)

Druhou metodou je rRNA deplece, při které je ze vzorku ribosomální RNA odstraněna. Dnes jsou používány tři přístupy: i) deplece rRNA pomocí magnetických kuliček. Magnetické kuličky, mají na sobě navázaný oligonukleotid komplementární k rRNA, následně dojde k hybridizaci a odstranění rRNA ii) deplece rRNA za tvorby hybridní molekuly DNA:RNA. rRNA hybridizuje ke komplementárnímu oligonukleotidu DNA a vznikne RNA:DNA hybrid, který následně podléhá degradaci v přítomnosti enzymu RNasa H. iii) celková RNA je konvertována do cDNA a ribosomální cDNA je odštěpena pomocí ZapR enzymu. Poslední metoda se využívá pro vzorky s nízkou koncentrací RNA. (Herbert et al., 2018)

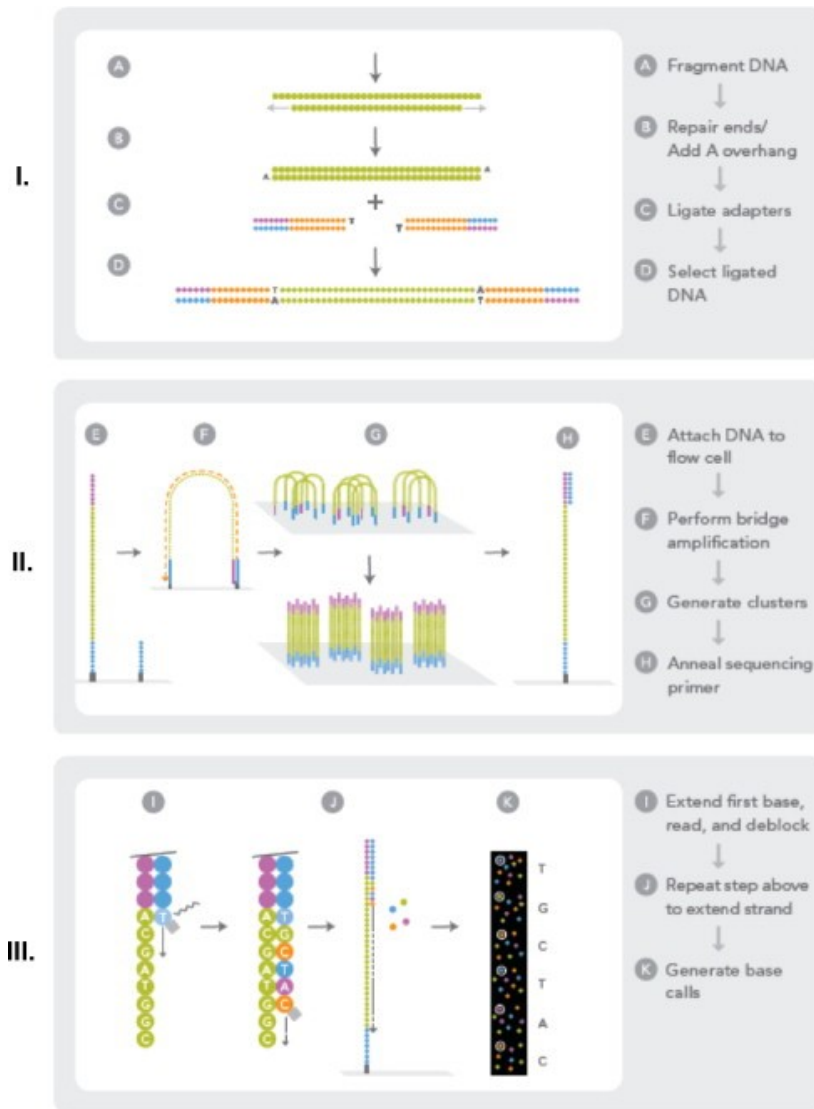
4.3 Sekvenování RNA

Masivní paralelní sekvenování, sekvenování nové generace (New Generation sequencing, NGS), umožňuje sekvenovat miliony až miliardy vláken najednou a rychle generovat velké objemy dat. Navazuje na původní Sangerovu metodu, která svou kapacitou přestala dostačovat.

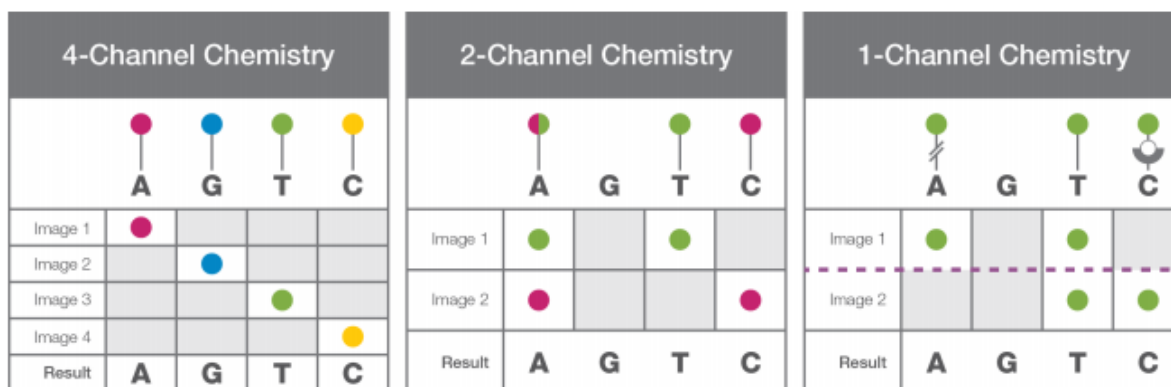
Historicky se NGS se vydaly dvěma směry, sekvenování pomocí hybridizace (sequencing by hybridization, SBH) a sekvenování pomocí syntézy, které je dnes dominantním přístupem (sequencing by synthesis, SBS). (Slatko, Gardner and Ausubel, 2019)

Při sekvenování pomocí syntézy dochází k postupné inkorporaci modifikovaných nukleotidů podle vzorového vlákna. Vzorové vlákno je pevně uchyceno k podkladu a komplementární vlákno je syntetizováno pomocí DNA polymerázy nebo ligázy. Mezi první SBS sekvenátory patřily Roche 454, který využíval techniku pyrosekvenování. (Ronaghi et al., 1996) Dále Ion Torrent, při kterém dochází ke změnám pH. Jeho výhodou je možnost okamžité detekce inkorporovaného nukleotidu. (Rothberg et al., 2011).

V současné době je nejrozšířenější sekvenační platformou Illumina. Jedná se o metodu využívající fluorescenční značku na jejímž základě je na konci cílová sekvence analyzována. K zesílení a zachycení signálu je každá molekula DNA mnohonásobně amplifikována a vznikají shluky vláken se stejnou informací, tzv. clustering. K amplifikaci DNA vlákna využívá strukturu most (bridge). (Slatko, Gardner and Ausubel, 2019) (Obr. 7) Sekvenátory využívají tři druhy fluorescenčního značení, čtyřbarevné (Fuller et al., 2009) (každý nukleotid má svou fluorescenční značku), dvoubarevné (využívá dvou fluorescenčních značek – na jeden nukleotid jsou navázány obě značky, na dvou nukleotidech po jedné značce a jeden nukleotid je neznačený) a jednobarevné (Illumina, 2018) (během jednoho sekvenačního cyklu dojde k dvěma chemickým krokům a dvěma snímkům, jeden nukleotid je permanentně označen, signál ano-ano, na druhém nukleotidu je značka, která je druhém kroku odštěpena, signál ano-ne, třetí nukleotid nese vazebné místo, na které se v druhém kroku váže fluorescenční značka, signál ne-ano, čtvrtý nukleotid značku nenese, signál ne-ne). Délka sekvencí se pohybuje okolo 50 – 200 bází. (Obr. 8)



Obr. 7– ILLUMINA SEKVENOVÁNÍ: (1) Příprava DNA k sekvenování: A) Ošetření fragmentované DNA – oprava konců, B) přiřazení A-overhang a C) ligace adaptorů D) připravená dsDNA (2) Clustering E) navázání forward vlákn DNA k sekvenovací destičce (flow cell) F) struktura most (bridge) – molekula ssDNA hybridizuje sekvencí druhého adaptoru k oligonukletidu navázaného na sekvenovací destičku a amplifikace reverse vlákn. G) tvorba klastrů a odštěpení reverzních vláken H) připravené forward vlákno k sekvenování nasednutí sekvenovacího primeru (3) Sekvenování I) Extenze prvního nukleotidu, emise záření a odstranění blokátoru, který brání další extenzi J) postupné opakování procesu extenze K) paralelní snímání emitujícího záření na flow cell



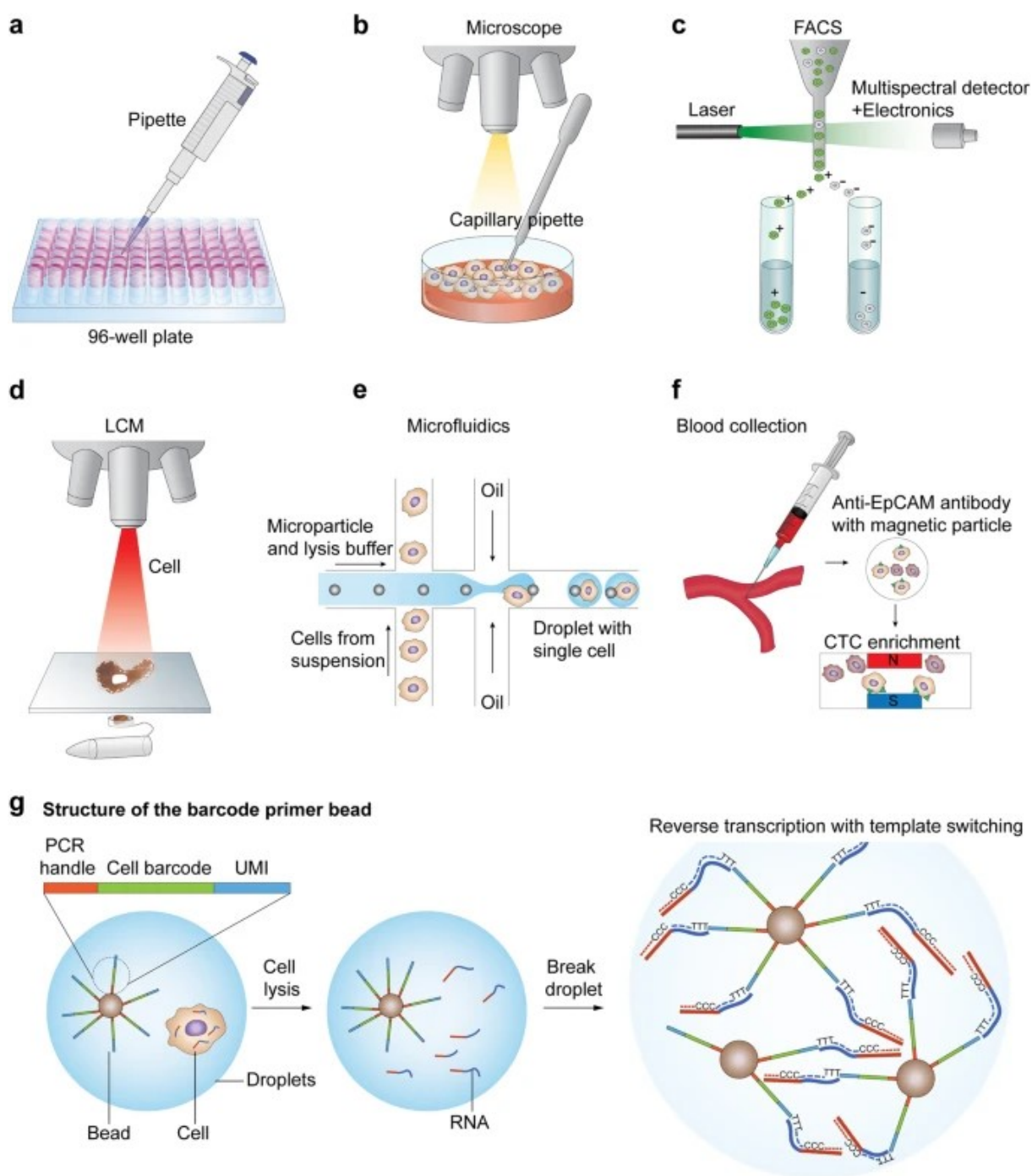
Obr 8 – Illumina 4-, 2- a 1-kanálová chemie: A) 4-kanálová chemie kombinuje čtyři fluorescenční značky a 4 snímky, B) 2-kanálová chemie kombinuje dvě fluorescenční značky a 2 snímky C) 1-kanálová chemie kombinuje jednu fluorescenční značku a 2 snímky (Illumina, 2018)

4.4 Single cell sekvenování

Poprvé bylo single cell sekvenování použito v roce 2009 pro analýzu transkriptomu a získání genové exprese myší blastomery. (Tang *et al.*, 2009)

Single cell sekvenování se využívá při sekvenování heterogenní populace buněk, ve které je možné identifikovat jednotlivé typy buněk podle jejich transkripčního profilu. Lze tak sledovat i velmi nízké populace buněk, které by nebylo možné jinak zachytit. Studium variability transkriptomu jednotlivých buněčných typů může do budoucna vést k lepšímu pochopení úlohy exprimovaných genů ve spojitosti k zdravému či patogennímu fenotypu nebo fyziologickému vývoji. (Hwang, Lee and Bang, 2018)

Vzorkem pro single cell sekvenování je tkáň, která je mechanicky a enzymaticky rozdělena na jednotlivé buňky, pomocí enzymů trypsináz a kolagenáz. (Leelatian *et al.*, 2017) Jednotlivé buňky jsou následně selektovány několika metodami (obr. 9). Mezi nejčastěji používané metody pro separaci buněk patří fluorescenčně aktivovaná buněčná separace (FACS; fluorescence activated cell sorting) a buněčná separace aktivovaná magnetem (MACS; magnetic-activated cell sorting). Obě metody vyžadují relativně velké množství buněk (cca 10.000). Buňky jsou nejprve označeny fluorescenčně nebo magneticky značenou monoklonální protilátkou nejčastěji proti povrchovému proteinu určitého buněčného typu a poté selektovány. Poslední roky se používá mikrofluidní separace. Jednotlivé buňky jsou obaleny mikrokapénkou, společně s mikročásticí na které jsou navázány oligomery s unikátní sekvencí. Po buněčné lýzi dojde k navázání RNA na oligonukleotidy, zpravidla přes A-konec, pak následuje rozpad kapének a reversní transkripce a amplifikace. Vzniká knihovna, kde každý transkriptom jedné buňky je značený unikátní sekvencí. (Hwang, Lee and Bang, 2018); (Hu *et al.*, 2016); (Stark, Grzelak and Hadfield, 2019)



Obr. 9 – SINGLE CELL SEKVENOVÁNÍ: (A) diluční metoda (B) mikromanipulace pomocí mikroskopu a kapilárních pipet (C) FACS (fluorescence-activated cell). Fluorescenčně značená protilátka je navázána na buněčný protein. (D) Laserová mikrodisekce z pevných vzorků (E) Mikrofluidní technologie (F) MACS (magnetic-activated cell sorting). (G) Schématické znázornění přípravy RNA knihovny pomocí kapének. (Hwang, Lee and Bang, 2018)

4.5 Zpracování dat

Výstupem sekvenování jsou obvykle data ve formátu FastQ, (Shah *et al.*, 2016) Postup zpracování sekvenčních dat probíhá v několika krocích, prvním krokem je kontrola kvalit, kdy

jsou z nalezených sekvencí odstraněny čtení s nízkou kvalitou a čtení obsahující adaptorové sekvence. V dalším kroku jsou sekvence namapovány na referenční genom (alignment). Výstupem jsou data v BAM formátu (Delhomme et al., 2012), která slouží jako vstup pro kvantifikaci genové exprese. Takto získané hodnoty jsou následně zpracovávány pomocí vhodných statistických přístupů s cílem identifikovat expresní změny mezi analyzovanými skupinami. Nalezené expresní změny je možné dále interpretovat s využitím nástrojů jako je například GSEA (Gene Set Enrichment Analysis). (Subramanian et al., 2005)

5. Klinické a výzkumné využití

5.1 Infekční onemocnění

RNA sekvenování v klinické praxi má perspektivu v jeho širokém využití při stanovení typu infekčního onemocnění. V současné době se v nemocničních laboratořích využívá metoda průtokové cytometrie, která je schopná určit jednotky druhů základních respiračních patogenů. (Leber et al., 2020) Oproti tomu RNA sekvenování nosohltanového výtěru je schopné zachytit veškeré patogenní organismy i jejich množství, které se v horních dýchacích cestách vyskytují.

Z výzkumného hlediska je RNA sekvenování důležité pro pochopení mechanismu propuknutí infekčního onemocnění, vztahu mezi patogenem a hostitelem a imunitní odpovědi organismu.

Single cell RNA sekvenování je schopné určit druh napadených buněk, molekuly a buňky podílející se na imunitní odpovědi proti patogenu a také exprimované geny, které patogenní organismus potřebuje pro své další šíření.

Onemocnění horních cest dýchacích doprovází změna ve složení a diverzitě mikrobiomu. Vzájemný vztah mikrobiomu, patogenu a hostitele je častým předmětem současného výzkumu.

5.1.1 Chřipka

Chřipka je onemocnění způsobené virem čeledi *Orthomyxoviridae*, které napadají především horní cesty dýchací. Chřipka je sezónním onemocněním, zpravidla s lehčím průběhem, může však způsobovat i vážné komplikace a u vnímavých a starších jedinců může končit smrtí. Každý rok prodělá chřipkové onemocnění až jedna miliarda lidí celosvětově, z nichž 3 – 5 miliónů lidí má těžký průběh a okolo půl miliónu případů končí smrtí. (World Health Organisation, 2019) V minulém roce počet případů chřipky, stejně jako dalších respiračních onemocnění vlivem pandemie covid-19 prudce klesl. (Jones, 2020); (Olsen et al., 2020); (WHO, 2021) V České republice bylo v roce 2018/2019 hlášeno okolo 600 vážných případů chřipky, z toho asi 200 pacientů zemřelo. (Nagy, 2019)

Ve spojitosti s chřipkou byla pozorována změna v mikrobiomu nosohltanu, která by mohla být indikátorem pro těžký průběh onemocnění. U pacientů s těžkým průběhem onemocnění byla zjištěna vyšší diverzita mikrobiomu oproti pacientům s lehčím průběhem. (Langevin et al., 2017) U pacientů s mírnějším průběhem byl zvýšený výskyt *Staphylococcus aureus*, naopak u pacientů s těžkým průběhem byl zvýšený výskyt některé z bakterií rodu *Prevotella*, *Streptobacillus*, *Haemophilus*, *Veillonella*, *Fusobacterium* (Langevin et al., 2017) nebo *Moraxella* (Edouard et al., 2018). Zároveň se v mikrobiomu pacienta nevyskytují gram-

pozitivní bakterie nebo jen velmi omezeně. (Langevin *et al.*, 2017) Ukazuje se, že mikrobiom, může hrát důležitou roli v boji s virovou infekcí. Například *Prevotella* neprodukuje žádné prozánětlivé cytokiny a naopak negativně ovlivňuje sekreci prozánětlivých cytokinů sekretovaných patogeny. (Edouard *et al.*, 2018). Na druhou stranu právě u bakterie rodu *Prevotella* byl zaznamenán zvýšený výskyt u dětí s těžším průběhem onemocnění. (Langevin *et al.*, 2017)

Průběh onemocnění na molekulárně biologické úrovni pomohlo objasnit single cell RNA sekvenování. Virus chřipky napadá v organismu více druhů buněk, především epiteliální buňky. Dále napadá buňky imunitního systému, jako jsou dendritické buňky, NK buňky (natural killer cells) a makrofágy. (Steerman *et al.*, 2018) Jakmile se virus dostane do buňky, zvýší se prudce genová exprese virové mRNA, která tvoří mezi 5 – 25 % veškeré buněčné mRNA. (Hatada *et al.*, 1989)

Jako první reaguje na virus chřipky přirozená imunita a to při vstupu tohoto viru do horních cest dýchacích. Makrofágy, epiteliální buňky a plazmocytoidní dendritické buňky aktivují imunitní odpověď po rozeznání viru chřipky pomocí PRR. Na konci imunitní dráhy dochází k produkci prozánětlivých cytokinů (Malik and Zhou, 2020) a interferonů, které negativně působí na buněčnou translaci a tím zabraňují množení viru. (Alexopoulou *et al.*, 2001) (Tan *et al.*, 2019). Současně dochází k poškození epitelu vlivem apoptózy nebo nekrózy u některých napadených buněk. (Tan *et al.*, 2019)

Poté nastupuje adaptivní imunita, jež je soustředěna v lymfatické tkáni. Epiteliální buňka lymfatické tkáně produkuje chemokiny, které slouží jako atraktanty pro dendritické buňky. Dendritická buňka jako antigen prezentující buňka putuje do lymfatické uzliny, kde stimuluje T-lymfocyty a B-lymfocyty v produkci protilátek. Stejně můžou fungovat i makrofágy, jejichž počet při virové infekci stoupá. T-lymfocyty, kterým dendritické buňky prezentují virový antigen spouští zánětlivou odpověď, aktivují makrofágy, neutrofile a cytotoxické T-lymfocyty, které putují zpět k místu zánětu a fagocytují virové částice. (Braciale, Sun and Kim, 2012) Cytotoxické T-lymfocyty produkují interferony INF a interleukiny IL-10, což jsou prozánětlivé mediátory. Byla prokázána spojitost mezi vysokou koncentrací IFN- α , který indukuje produkci cytokinu IL-10 a těžkým průběhem onemocnění. (Oshansky *et al.*, 2014)

5.1.2 Koronavirus

Na podzim 2019 se objevily první případy nákazy novým typem koronaviru, který způsobil současnou pandemii onemocnění covid-19 (coronavirus disease 2019) způsobené virem SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2). Onemocnění poprvé propuklo na

území Číny v provincii Wuhan. Příznaky onemocnění jsou velmi různorodé, mezi nejčastější patří teplota, kašel, svalová bolest, únava, bolest hlavy a ztráta čichu a chuti. Inkubační doba onemocnění je počítána od prvního vystavení nákaze a trvá 2 - 14 dní. (Chung, Thone and Kwon, 2021); (Mehrotra *et al.*, 2021) V současné chvíli je odhadováno, že onemocnění prodělalo celosvětově přes 150 miliónů lidí, z toho přes 3 milióny lidí zemřelo (ke dni 1. 5. 2021) (Dong, Du and Gardner, 2020). Vzniklá pandemie měla velký vliv na vývoj nových diagnostických metod, základem kterých je jednoduchý odběr vzorků, rychlost zpracování a přesnost výsledků.

V současnosti je hlavním materiálem pro diagnostiku přítomnosti SARS-CoV-2 nosohltanový stěr, v menší míře také odběr slin nebo stěr z ústní dutiny. Stěr nosních dutin je méně invazivní metoda odběru, která vykazuje podobnou senzitivitu jako nosohltanový stěr. (Péré *et al.*, 2020) Naopak výtěr nosohltanu vykazuje lepší senzitivitu a vyšší virovou nálož oproti stěru ze zadní stěny ústní dutiny. (Pope *et al.*, 2017)

Pro identifikaci přítomnosti viru SARS-CoV-2 se využívá metod RT-PCR nebo antigenního testu. RT-PCR je citlivější metodou, ale analýza výsledků je delší než u antigenního testu.

Pomocí RNA sekvenování nosohltanového stěru je kromě přítomnosti viru možné detekovat i jeho varianty – mutace. V současnosti jsou některé mutace spojovány s vyšší rychlostí šíření viru nebo s těžším průběhem onemocnění. Lze tak sledovat šíření těchto potenciálně nebezpečných variant. (Tegally *et al.*, 2021); (Giovanetti *et al.*, 2021); (Galloway *et al.*, 2021)

Stejně jako u viru chřipky i u SARS-CoV-2 pomohlo RNA sekvenování k objasnění buněčných mechanismů při propuknutí infekce. U pacientů s onemocněním covid-19 dochází k několika změnám v dýchacím epitelu. Bazální buňky zdravých jedinců, které slouží jako kmenové buňky, diferencují na sekreční buňky, ze kterých vznikají buňky řasinkové. Při infekci dochází přímo k diferenciaci basálních buněk na buňky řasinkové. Dále dochází k několikanásobnému zvýšení exprese ACE2 v epitelálních buňkách nikoliv však v imunitních buňkách. Prostřednictvím ACE2 (angiotensin-konvertující enzym 2) vstupuje SARS-CoV-2 do buněk. Vlivem infekce dochází ke zvýšené interakci mezi epitelálními buňkami a buňkami imunitního systému. Buňky imunitního systému produkují interferony, které brání virové replikaci. Interferonová dráha je indukovaná transkripčním faktorem STAT1, STAT1 ovšem indukuje i transkripci genu ACE2. Čím větší je tedy imunitní odpověď na probíhající infekci, tím větší je exprese ACE2 v epitelálních buňkách. (Lorenz Chua *et al.*, 2020)

Během infekce exprimují epitelální buňky celou řadu chemokinů, které jsou atraktanty pro neutrofile, T lymfocyty, mastocyty a makrofágy. U pacientů s těžkým průběhem onemocnění

dochází k nadměrné produkci těchto cytokinů, tzv. cytokinová bouři. Zejména se jedná o chemokiny CCL2, CCL3 a CCL8, které jsou spojovány s atrakcí neutrofilu, cytotoxických T lymfocytů a makrofágů. (Blanco-Melo et al., 2020) (Lorenz Chua et al., 2020)

Těžší průběh onemocnění covid-19 u starších lidí nad 60 let je dáván do souvislosti s horší funkcí imunitního systému ve vyšším věku. Starší jedinci mají snížené množství cytotoxických T-lymfocytů a NK buněk. Lehčí průběh onemocnění u žen oproti mužům je naopak přisuzován vyššímu počtu B-lymfocytů u žen. (Liebermanid et al., 2020)

Lehký nebo bezpříznakový průběh onemocnění covid-19 u dětí je spojován s mladým imunitním systémem. Imunitní systém dětí je neustále vystavován novým podnětům a velmi dobře funguje přirozená imunitní odpověď sliznice nosohltanu. Děti mají nastaven vyšší limit pro spuštění systémové adaptivní odpovědi. Oproti dospělým byl u dětí pozorován snížený počet neutralizačních protilátek, fagocytů a T lymfatická odpověď byla slabší, naopak byla prokázána zvýšená exprese genů pro interferony. Hodnoty specifických IgA a IgG protilátek byly u dětí i dospělých stejné. (Pierce et al., 2021)

5.2 Výzkum neinfekčních onemocnění

5.2.1 Výzkum neurodegenerativních onemocnění

Pro výzkum neurodegenerativních onemocnění se využívají buňky nervové tkáně. Odběr buněk přímo z mozku je metoda velmi invazivní a pro pacienta riziková. V současné době se proto využívají indukované neurální buňky (iN) a indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSCs). Během přeprogramování ovšem dochází k epigenetickým změnám, které mohou vést k zavádějícím výsledkům při studiu genové exprese (Lavoie et al., 2017)

Jako vhodný materiál pro výzkum se tak jeví odběr čichové nervové tkáně (OE, olfactory epithelium), která jako jediná nervová tkáň se neustále obnovuje a není nutné její přeprogramování. Využít lze izolované maturované neurony nebo kmenové buňky. Neuronální buňky OE jsou odebrány mikrodisekcí nebo pouhým stěrem, který je neinvazivní a není nutné použít anestezii. Výhodou je i možnost opakovaného odběru, například při sledování progresu onemocnění nebo léčby pacientů. (Borgmann-Winter et al., 2015)

5.2.2 Cystická fibróza

Cystická fibróza je onemocnění, které způsobuje chronickou infekci dýchacích cest, a která může vyústit až v poškození plic. V mikrobiomu pacientů s cystickou fibrózou byl nalezen vyšší výskyt bakterií *Streptococcus*, *Neisseria*, *Veillonella*, *Rothia*, *Staphylococcus aureus*,

Haemophilus influenzae a *Moraxella*. Jedná se o potencionálně patogenní nebo komenzální organismy horních cest dýchacích, které se rozšíří i do dolních dýchacích cest. Patogenní bakterie rodu *Pseudomonas* a *Burkholderia* jsou asociovány pouze s dospělými pacienty a souvisí s postupným zhoršováním onemocnění ve vyšším věku. (Coburn et al., 2015)

Podle doporučení Světové zdravotnické organizace se u dětí s cystickou fibrózou používá při cílené léčbě infekcí dolních cest dýchacích mikrobiologická analýza nosohltanového stěru, a to z důvodu neinvazivního odběru materiálu. Ovšem výsledky studie, která porovnávala mikrobiom nosohltanového a bronchoalveolárního výplachu ukázaly určité limity této metody. Mikrobiom horních cest dýchacích je mnohem více variabilní oproti mikrobiomu dolních cest dýchacích a složení obou mikrobiomů se u jedince mohou značně lišit. Nahrazení bronchoalveolárního výplachu nosohltanovým stěrem je proto diskutabilní. (Prevaes et al., 2017)

5.2.3 Astma

Astma je definováno jako „chronické zánětlivé onemocnění dýchacích cest, při kterém hraje roli mnoho buněk a buněčných prvků: zejména žírné buňky, eozinofily, T lymfocyty, makrofágy, neutrofilny a epitelální buňky. U vnímavých jedinců způsobuje tento zánět opakující se epizody sípání, dušnosti, tlaku na hrudi a kašle, zejména v noci nebo brzy ráno. Tyto epizody jsou obvykle spojeny s rozsáhlou, ale proměnlivou překážkou proudění vzduchu, která je často reverzibilní buď spontánně, nebo při léčbě.“ (Mims, 2015) Narušení rovnováhy mikrobiomu horních cest dýchacích je spojeno s alergiemi a astmatem zejména u dětí. Zvýšený výskyt bakterií rodu *Moraxella*, *Streptococcus* a *Haemophilus* a nižší výskyt bakterií rodu *Corynebacteriaceae* je spojen již v kojeneckém věku s vyšším výskytem infekcí dolních cest dýchacích. (Toivonen et al., 2019); (Teo et al., 2018) Podobná korelace byla pozorována u dětí a adolescentů s kompenzovaným astmatem. Během astmatických epizod se zvyšoval podíl bakterií rodu *Moraxella* a *Staphylococcus*, *Streptococcus* a oproti tomu se snižoval podíl bakterií rodu *Corynebacteriaceae* a *Dolosigranulum* (Zhou et al., 2019). U dospělých nebyly pozorovány výrazné rozdíly v mikrobiomu mezi astmatiky a neastmatiky, kromě významně zvýšeného podílu bakterií rodu *Corynebacteriaceae* u neastmatiků do 45 let věku. U starší populace nad 65 let rozdíly v mikrobiomu u astmatiků a neastmatiků pozorovány nebyly. (Lee et al., 2018)

Nejčastějším druhem viru způsobující zhoršení astmatu jsou rhinoviry. (Zhou et al., 2019)

Zvýšené riziko astmatu bylo u dětí spojeno s infekcí dýchacích cest způsobenou respiračním syncytiálním virem (RSV) a u dospělých s výskytem rhinoviru (RV). Virová infekce je také

spojena se změnou složení bakteriálního osídlení horních cest dýchacích. Rhinoviry zvyšují podíl bakterií rodu *Moraxella* a *Streptococcus* a RSV zvyšují podíl *Streptococcus* a *Haemophilus*. (Jartti et al.,2020)

I přes značné množství studií, které se zabývají změnami v mikrobiomu horních cest dýchacích a astmatem, není dosud zřejmé, zda jsou změny příčinou či důsledkem onemocnění. (Zhou et al., 2019)

5.2.4 Rakovina

Karcinom nosohltanu je agresivní maligní typ rakoviny, který je prevalentní ve východní a jihovýchodní Asii a severovýchodní Africe. Pro nádor je charakteristická vysoká míra pronikání buněk imunitního systému do nádorových lézí. Ke zvolení cílené terapie bylo využito single cell sekvenování, které ukázalo velkou heterogenitu karcinomu. Pacienti s vysokou expresí genů typických pro makrofágy, dendritické buňky a NK buňky měli dobrou prognózu onemocnění, naopak pacienti se zvýšenou expresí genů buněčného cyklu měli negativní prognózu. Současné byly nalezeny regulátory a transkripční faktory, které by mohly hrát důležitou roli při cílené léčbě nádoru. (Chen *et al.*, 2020)

5.2.5 Dědičná onemocnění

Nosohltanový stěr je také možné využít i při studiu a diagnóze vzácných dědičných onemocnění. Řada dědičných onemocnění je orgánově specifická, a proto určení přesné diagnózy je v některých případech možné pouze na úrovni transkriptu, s nutností biopsie, neboť řada těchto transkriptů není sledovatelná v periferní krvi ani, v dalších snadno dostupných odběrových materiálech. Nosohltanový případně nosní stěr obsahuje velké množství různých typů buněk (epiteliální buňky - sekreční, neurony), transkripčně vysoce aktivních, u kterých může probíhat exprese stejných genů jako je tomu ve sledovaných postižených orgánech nebo tkáních.

6. Závěr

Tato práce je přehledem znalostí o sliznici nosohltanu, jejího mikrobiomu a využití RNA sekvenování.

Čichový epitel, který se vyskytuje pouze v nosních dutinách, je tvořen řasinkovými, pohárkovými, basálními buňkami a čichovými neurony. Dýchací epitel se vyskytuje v rámci horních i dolních dýchacích cest a je především tvořen, pohárkovými, sekrečními a řasinkovými buňkami. Na povrchu dýchacího epitelu je mucin, který slouží k zachycení patogenů a škodlivin.

Sliznice nosohltanu obsahuje pestrou škálu mikroorganismů, a jejíž struktura je specifická. Pro zdravý mikrobiom je důležitá vyrovnanost mezi jednotlivými druhy bakterií a vysoká heterogenita v zastoupení jednotlivých bakteriálních kolonií. Narušení této rovnováhy vede k snížení diverzity a při dominanci potencionálně patogenní bakterie i k propuknutí onemocnění.

V souvislosti s propuknutím onemocnění covid-19 získal odběr nosohltanového stěru velký význam a ukázal se jako vhodný diagnostický a výzkumný materiál. Jedním z výsledků pandemie je zdokonalení metod odběru, transportu i izolace vzorků nosohltanového stěru a jejich automatizace při zpracování. Stěr z nosohltanu může sloužit pro výzkum infekčních i neinfekčních nemocí. U infekčních onemocnění se RNA sekvenování využívá zejména k detekci patogenního organismu a pozorování změn genové exprese. Snahou je nalézt směrodatné indikátory, které by v předstihu dokázaly odhalit jedince s předpoklady pro těžký průběh onemocnění s nutností hospitalizace. U dědičných (cystická fibróza, astma) nebo získaných (rakovina) onemocnění, odhalení změn transkriptomu, může vést k cílené a efektivní léčbě pacienta.

7. Souhrn

Odběr nosohltanového stěru je rychlá a jednoduchá metoda. Vzorek z nosohltanu obsahuje epitelální a imunitní buňky hostitele, mikroorganismy a případné patogeny. Z toho důvodu má vysoký potenciál v diagnostice i biomedicínském výzkumu. S rozvojem RNA sekvenování se podařilo shromáždit velké množství informací o fyziologických a infekčních procesech, které v nosohltanu probíhají.

Přestože se mnoho studií zabývalo složením zdravého mikrobiomu a mikrobiomu v závislosti na závažnosti onemocnění, obecným výsledkem je, že v průběhu onemocnění dochází ke změně variability mikrobiomu. Variabilita je snížena a převládají potenciálně patologické mikroorganismy. (Toivonen et al., 2019); (Teo et al., 2018); (Zhou et al., 2019); (Jartti et al., 2020). Například nebyla nalezena žádná výrazná změna mezi mikrobiomem astmatiků a neastmatiků v dospělém věku (Lee et al., 2018) a nebyla nalezena ani žádná spojitost mezi změnou mikrobiomu v závislosti na pohlaví nebo věku. (Pope et al., 2017) Dosud není prokázáno, zda změna složení mikrobiomu je příčinou nebo následkem sledovaného onemocnění. (Zhou et al., 2019) Zajímavým zjištěním naopak je interakce mezi mikroorganismy navzájem, například při virové infekci. (Edouard et al., 2018); (Jartti et al., 2020).

Stejně tak snaha nalézt jednoznačný marker (např. změna exprese některého genu, podle kterého by bylo možné již v začátku infekčního onemocnění identifikovat jedince, u kterých hrozí těžký průběh onemocnění) zatím nepřinesla jasné výsledky. Genová exprese je spojena s akutním stavem jedince a prognóza v dohledu několika dnů je složitá. Naopak se podařilo zmapovat průběh onemocnění na buněčné úrovni, popsat mezibuněčné interakce, což může přispět k vývoji cílených léků při život ohrožujících stavech. (Oshansky et al., 2014); (Lorenz Chua et al., 2020)

Velký pokrok byl zaznamenán ve výzkumu karcinomu nosohltanu, na jehož základě je možné určit prognózu onemocnění a vést cílenou léčbou. (Chen et al., 2020)

V neposlední řadě má do budoucna velký potenciál studium čichových nervových buněk ve spojitosti s neurodegenerativními onemocněními. Výhodou je jejich neinvazivní získání a zároveň není třeba jejich reprogramování, které vede k epigenetickým změnám. (Lavoie et al., 2017)

8. Zdroje

Alexopoulou, L. *et al.* (2001) 'Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3', *Nature*, 413(6857), pp. 732–738. doi: 10.1038/35099560.

Ali, N. *et al.* (2017) 'Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics', *BioMed Research International*. Hindawi Limited. doi: 10.1155/2017/9306564.

Amini, S. E. *et al.* (2019) 'Muc5b is mainly expressed and sialylated in the nasal olfactory epithelium whereas Muc5ac is exclusively expressed and fucosylated in the nasal respiratory epithelium', *Histochemistry and Cell Biology*, 152(2), pp. 167–174. doi: 10.1007/s00418-019-01785-5.

Bemark, M. *et al.* (2019) 'Airway M Cells Arise in the Lower Airway Due to RANKL Signaling and Reside in the Bronchiolar Epithelium Associated With iBALT in Murine Models of Respiratory Disease', *Frontiers in Immunology* | www.frontiersin.org, 1, p. 1323. doi: 10.3389/fimmu.2019.01323.

Blanco-Melo, D. *et al.* (2020) 'Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19', *Cell*, 181(5), pp. 1036-1045.e9. doi: 10.1016/j.cell.2020.04.026.

Bluestone, C. D. and Doyle, W. J. (1988) *The ears Anatomy and physiology of eustachian tube and middle ear related to otitis media*.

Borghini, L., Hibberd, M. and Davila, S. (2018) 'Changes in H3K27ac following lipopolysaccharide stimulation of nasopharyngeal epithelial cells', *BMC genomics*, 19(1), p. 969. doi: 10.1186/s12864-018-5295-4.

Borgmann-Winter, K. *et al.* (2015) *Translational potential of olfactory mucosa for the study of neuropsychiatric illness, Translational Psychiatry*. Nature Publishing Group. doi: 10.1038/tp.2014.141.

Bosch, A. A. T. M. *et al.* (2016) 'Development of Upper Respiratory Tract Microbiota in Infancy is Affected by Mode of Delivery', *EBioMedicine*, 9, pp. 336–345. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.05.031.

Braciale, T. J., Sun, J. and Kim, T. S. (2012) 'Regulating the adaptive immune response to respiratory virus infection', *Nature Reviews Immunology*. Nat Rev Immunol, pp. 295–305. doi: 10.1038/nri3166.

Brann, D. H. *et al.* (2020) *Non-neuronal expression of SARS-CoV-2 entry genes in the olfactory system suggests mechanisms underlying COVID-19-associated anosmia*, *Sci. Adv.* Available at: <http://advances.sciencemag.org/>.

Carninci, P., Yasuda, J. and Hayashizaki, Y. (2008) 'Multifaceted mammalian transcriptome', *Current*

Opinion in Cell Biology. Elsevier Current Trends, pp. 274–280. doi: 10.1016/j.ceb.2008.03.008.

van Cauwenberge, P. B. *et al.* (1995) 'The adenoid as a key factor in upper airway infections', *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 32, pp. S71–S80. doi: 10.1016/0165-5876(94)01146-O.

Chen, Y.-P. *et al.* (2020) 'Single-cell transcriptomics reveals regulators underlying immune cell diversity and immune subtypes associated with prognosis in nasopharyngeal carcinoma'. doi: 10.1038/s41422-020-0374-x.

Chomzynski, P. (1987) 'Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate–Phenol–Chloroform Extraction', *Analytical Biochemistry*, 162(1), pp. 156–159. doi: 10.1006/abio.1987.9999.

Chung, J. Y., Thone, M. N. and Kwon, Y. J. (2021) 'COVID-19 vaccines: The status and perspectives in delivery points of view', *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier B.V., pp. 1–25. doi: 10.1016/j.addr.2020.12.011.

Coburn, B. *et al.* (2015) 'Lung microbiota across age and disease stage in cystic fibrosis'. doi: 10.1038/srep10241.

Corthésy, B. (2013) 'Multi-faceted functions of secretory IgA at mucosal surfaces'. doi: 10.3389/fimmu.2013.00185.

Cunningham, A. M. *et al.* (1999) *OLFACTORY RECEPTOR NEURONS EXIST AS DISTINCT SUBCLASSES OF IMMATURE AND MATURE CELLS IN PRIMARY CULTURE*.

Daha Gijlswijk-Janssen, M. R. *et al.* (2001) 'Pathway System Via the Mannan-Binding Lectin Human IgA Activates the Complement'. doi: 10.4049/jimmunol.167.5.2861.

Delhomme, N. *et al.* (2012) 'Gene expression easyRNASeq: a bioconductor package for processing RNA-Seq data', 28(19), pp. 2532–2533. doi: 10.1093/bioinformatics/bts477.

Dong, E., Du, H. and Gardner, L. (2020) 'An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time', *The Lancet Infectious Diseases*. Lancet Publishing Group, pp. 533–534. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30120-1.

Edouard, S. *et al.* (2018) 'The nasopharyngeal microbiota in patients with viral respiratory tract infections is enriched in bacterial pathogens', *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious*

Diseases. doi: 10.1007/s10096-018-3305-8.

Eon Kuek, L. and Lee, R. J. (2020) 'First contact: the role of respiratory cilia in host-pathogen interactions in the airways', *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 319, pp. 603–619. doi: 10.1152/ajplung.00283.2020.-Respi.

Faden, H. *et al.* (1997) 'Relationship between Nasopharyngeal Colonization and the Development of Otitis Media in Children', *The Journal of Infectious Diseases*, 175(6), pp. 1440–1445. doi: 10.1086/516477.

Frank, D. N. *et al.* (2010) 'The Human Nasal Microbiota and Staphylococcus aureus Carriage'. doi: 10.1371/journal.pone.0010598.

Fuller, C. W. *et al.* (2009) 'The challenges of sequencing by synthesis', *Nature Biotechnology*. Nature Publishing Group, pp. 1013–1023. doi: 10.1038/nbt.1585.

Galloway, S. E. *et al.* (2021) 'Emergence of SARS-CoV-2 B.1.1.7 Lineage — United States, December 29, 2020–January 12, 2021', *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 70(3), pp. 95–99. doi: 10.15585/mmwr.mm7003e2.

Giovanetti, M. *et al.* (2021) 'Evolution patterns of SARS-CoV-2: Snapshot on its genome variants', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 538, pp. 88–91. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.10.102.

Hach, P., Zuzana, J. and Těšík, I. (2003) *Histologie II*. Praha: Univerzita Karlova v Praze - Nakladatelství Karolinum.

Hatada, E. *et al.* (1989) 'Control of influenza virus gene expression: Quantitative analysis of each viral RNA species in infected cells', *Journal of Biochemistry*, 105(4), pp. 537–546. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a122702.

Herbert, Z. T. *et al.* (2018) 'Cross-site comparison of ribosomal depletion kits for Illumina RNAseq library construction', *BMC Genomics*, 19(March). doi: 10.1186/s12864-018-4585-1.

Hiemstra, P. S., McCray, P. B. and Bals, R. (2015) 'The innate immune function of airway epithelial cells in inflammatory lung disease', *European Respiratory Journal*, 45(4), pp. 1150–1162. doi: 10.1183/09031936.00141514.

Ho Man, W., de Steenhuijsen Piters, W. A. and Bogaert, D. (2017) 'The microbiota of the respiratory

tract: gatekeeper to respiratory health'. doi: 10.1038/nrmicro.2017.14.

Hořejší, V. and Bartůňková, J. (2017) *Základy imunologie*. 6th edn. Praha: Nakladatelství TRITON s.r.o.

Hu, P. *et al.* (2016) 'Single cell isolation and analysis', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Frontiers Media S.A. doi: 10.3389/fcell.2016.00116.

Hwang, B., Lee, J. H. and Bang, D. (2018) 'Single-cell RNA sequencing technologies and bioinformatics pipelines', *Experimental & Molecular Medicine*, 50, p. 96. doi: 10.1038/s12276-018-0071-8.

Illumina (2018) *Illumina CMOS Chip and One-Channel SBS Chemistry*. Available at: www.illumina.com/SBSvideo.

Jartti, T. *et al.* (2020) 'Role of viruses in asthma'. doi: 10.1007/s00281-020-00781-5.

Jones, N. (2020) 'How COVID-19 is changing the cold and flu season', *Nature*, 588(7838), pp. 388–390. doi: 10.1038/d41586-020-03519-3.

Kuehnert, M. J. *et al.* (2006) 'Prevalence of Staphylococcus aureus nasal colonization in the United States, 2001-2002', *Journal of Infectious Diseases*, 193(2), pp. 172–179. doi: 10.1086/499632.

Langevin, S. *et al.* (2017) 'Early nasopharyngeal microbial signature associated with severe influenza in children: a retrospective pilot study', *Journal of General Virology*. doi: 10.1099/jgv.0.000920.

Lavoie, J. *et al.* (2017) 'The Olfactory Neural Epithelium As a Tool in Neuroscience', *Trends in Molecular Medicine*. Elsevier Ltd, pp. 100–103. doi: 10.1016/j.molmed.2016.12.010.

Leber, A. L. *et al.* (2020) 'Multicenter Evaluation of the QIAstat-Dx Respiratory Panel for Detection of Viruses and Bacteria in Nasopharyngeal Swab Specimens'. doi: 10.1128/JCM.00155-20.

Lederberg, J. and McCray, A. (2001) 'Ome Sweet `Omics--A Genealogical Treasury of Words', *The Scientist*, 15, p. 8.

Lee, J.-J. *et al.* (2018) 'Different upper airway microbiome and their functional genes associated with asthma in young adults and elderly individuals'. doi: 10.1111/all.13608.

Leelatian, N. *et al.* (2017) 'Single cell analysis of human tissues and solid tumors with mass cytometry', *Cytometry Part B - Clinical Cytometry*, 92(1), pp. 68–78. doi: 10.1002/cyto.b.21481.

Liang, F. (2020) 'Sustentacular cell enwrapment of olfactory receptor neuronal dendrites: An update', *Genes*, 11(5). doi: 10.3390/genes11050493.

- Libertucci, J. and Young, V. B. (2019) 'The role of the microbiota in infectious diseases', *Nature Microbiology*. Nature Publishing Group, pp. 35–45. doi: 10.1038/s41564-018-0278-4.
- Liebermanid, N. A. P. *et al.* (2020) 'In vivo antiviral host transcriptional response to SARS-CoV-2 by viral load, sex, and age'. doi: 10.1371/journal.pbio.3000849.
- Lorenz Chua, R. *et al.* (2020) 'COVID-19 severity correlates with airway epithelium–immune cell interactions identified by single-cell analysis'. doi: 10.1038/s41587-020-0602-4.
- Ma, J., Rubin, B. K. and Voynow, J. A. (2018) 'Mucins, Mucus, and Goblet Cells', *Chest*. Elsevier Inc, pp. 169–176. doi: 10.1016/j.chest.2017.11.008.
- Malik, G. and Zhou, Y. (2020) 'Innate immune sensing of influenza a virus', *Viruses*. MDPI AG. doi: 10.3390/v12070755.
- Mehrotra, D. V. *et al.* (2021) 'Clinical Endpoints for Evaluating Efficacy in COVID-19 Vaccine Trials', *Annals of internal medicine*, 174(2), pp. 221–228. doi: 10.7326/M20-6169.
- Mims, J. W. (2015) 'Asthma: definitions and pathophysiology'. doi: 10.1002/alr.21609.
- Montoro, D. T. *et al.* (2018) 'A revised airway epithelial hierarchy includes CFTR-expressing ionocytes', *Nature*, 560(7718), pp. 319–324. doi: 10.1038/s41586-018-0393-7.
- Nagy, A. (2019) 'Zpráva za chřipkovou sezonu 2018/2019', 579.
- Nomura, T., Takahashi, S. and Ushiki, T. (2004) 'Cytoarchitecture of the normal rat olfactory epithelium: Light and scanning electron microscopic studies', *Archives of Histology and Cytology*, pp. 159–170. doi: 10.1679/aohc.67.159.
- Olsen, S. J. *et al.* (2020) 'Decreased Influenza Activity During the COVID-19 Pandemic — United States, Australia, Chile, and South Africa, 2020', *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 69(37), pp. 1305–1309. doi: 10.15585/mmwr.mm6937a6.
- Oshansky, C. M. *et al.* (2014) 'Mucosal Immune Responses Predict Clinical Outcomes during Influenza Infection Independently of Age and Viral Load', *Am J Respir Crit Care Med*, 189(4), pp. 449–462. doi: 10.1164/rccm.201309-1616OC.
- Péré, H. *et al.* (2020) 'Nasal Swab Sampling for SARS-CoV-2: a Convenient Alternative in Times of Nasopharyngeal Swab Shortage', *Journal of clinical microbiology*, 58(6), pp. e00721-20. doi: 2

- Pierce, C. A. *et al.* (2021) 'Natural mucosal barriers and COVID-19 in children', *JCI Insight*. doi: 10.1172/jci.insight.148694.
- Pope, P. B. *et al.* (2017) 'Comparing the Healthy Nose and Nasopharynx Microbiota Reveals Continuity As Well As Niche-Specificity'. doi: 10.3389/fmicb.2017.02372.
- Prevaes, S. M. P. J. *et al.* (2017) 'Concordance between upper and lower airway microbiota in infants with cystic fibrosis', *European Respiratory Journal*. doi: 10.1183/13993003.02235-2016.
- Rock, J. R., Randell, S. H. and Hogan, B. L. M. (2010) 'Airway basal stem cells: A perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling', *DMM Disease Models and Mechanisms*. *Dis Model Mech*, pp. 545–556. doi: 10.1242/dmm.006031.
- Ronaghi, M. *et al.* (1996) 'Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release', *Analytical Biochemistry*, 242(1), pp. 84–89. doi: 10.1006/abio.1996.0432.
- Rothberg, J. M. *et al.* (2011) 'An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing', *Nature*. doi: 10.1038/nature10242.
- Roy, M. G. *et al.* (2014) 'Muc5b is required for airway defence', *Nature*, 505. doi: 10.1038/nature12807.
- Russell, A. B. *et al.* (2019) 'Single-Cell Virus Sequencing of Influenza Infections That Trigger Innate Immunity'. doi: 10.1128/JVI.00500-19.
- Scherzad, A. *et al.* (2019) 'Current Understanding of Nasal Epithelial Cell Mis-Differentiation'. doi: 10.2147/JIR.S180853.
- Schwob, J. E. *et al.* (2017) 'Stem and Progenitor Cells of the Mammalian Olfactory Epithelium: Taking Poietic License HHS Public Access', *J Comp Neurol*, 525(4), pp. 1034–1054. doi: 10.1002/cne.24105.
- Shah, A. *et al.* (2016) 'Sequence analysis CLIP Tool Kit (CTK): a flexible and robust pipeline to analyze CLIP sequencing data'. doi: 10.1093/bioinformatics/btw653.
- Slatko, B. E., Gardner, A. F. and Ausubel, F. M. (2018) 'Overview of Next Generation Sequencing Technologies'. doi: 10.1002/cpmb.59.
- Stark, R., Grzelak, M. and Hadfield, J. (2019) 'RNA sequencing: the teenage years', *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group, pp. 631–656. doi: 10.1038/s41576-019-0150-2.

- Steinke, A. *et al.* (2008) 'Molecular composition of tight and adherens junctions in the rat olfactory epithelium and Wla', *Histochem Cell Biol*, 130, pp. 339–361. doi: 10.1007/s00418-008-0441-8.
- Steuerman, Y. *et al.* (2018) 'Dissection of Influenza Infection In Vivo by Single-Cell RNA Sequencing', *Cell Systems*, 6(6), pp. 679–691.e4. doi: 10.1016/j.cels.2018.05.008.
- Subramanian, A. *et al.* (2005) *Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles*. Available at: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0506580102 (Accessed: 4 May 2021).
- Takeuchi, O. and Akira, S. (2010) 'Pattern Recognition Receptors and Inflammation', *Cell*, 140(6), pp. 805–820. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.022.
- Tan, K. Sen *et al.* (2019) 'RNA Sequencing of H3N2 Influenza Virus-Infected Human Nasal Epithelial Cells from Multiple Subjects Reveals Molecular Pathways Associated with Tissue Injury and Complications', *Cells*, 8(9). doi: 10.3390/cells8090986.
- Tang, F. *et al.* (2009) 'mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell', *Nature Methods*, 6(5), pp. 377–382. doi: 10.1038/nmeth.1315.
- Tegally, H. *et al.* (2021) 'Sixteen novel lineages of SARS-CoV-2 in South Africa', *Nature Medicine*, 27(3), pp. 440–446. doi: 10.1038/s41591-021-01255-3.
- Teo, S. M. *et al.* (2018) 'Airway Microbiota Dynamics Uncover a Critical Window for Interplay of Pathogenic Bacteria and Allergy in Childhood Respiratory Disease', *Cell Host and Microbe*, 24(3), pp. 341–352.e5. doi: 10.1016/j.chom.2018.08.005.
- Toivonen, L. *et al.* (2019) 'Early nasal microbiota and acute respiratory infections during the first years of life'. doi: 10.1136/thoraxjnl-2018-212629.
- Vajner, L. *et al.* (2017) *LÉKAŘSKÁ HISTOLOGIE: Mikroskopická anatomie II*. 2nd edn. Praha: Univerzita Karlova v Praze - Nakladatelství Karolinum.
- Vomelová, I., Vaníčková, Z. and Šedo, A. (2009) 'Methods of RNA purification. All ways (should) lead to Rome', *Folia Biologica*, 55(6), pp. 243–251.
- WHO (2021) 'Influenza Update N ° 191', (March), pp. 1–7.
- Woof, J. M. and Kerr, M. A. (2006) 'The function of immunoglobulin A in immunity', *Journal of Pathology J Pathol*, 208, pp. 270–282. doi: 10.1002/path.1877.

World Health Organisation (2019) 'Global Influenza Strategy Summary 2019-2030 Influenza', *Global Influenza Strategy 2019-2030 Influenza*, 1, p. 1.

Zhai, Y. *et al.* (2015) 'Host Transcriptional Response to Influenza and Other Acute Respiratory Viral Infections – A Prospective Cohort Study', *PLoS Pathogens*, 11(6). doi: 10.1371/journal.ppat.1004869.

Zhao, W. *et al.* (2014) 'Comparison of RNA-Seq by poly (A) capture, ribosomal RNA depletion, and DNA microarray for expression profiling', *BMC Genomics*, 15(1), pp. 1–11. doi: 10.1186/1471-2164-15-419.

Zhou, Y. *et al.* (2014) *Exploration of bacterial community classes in major human habitats*. doi: 10.1186/gb-2014-15-5-r66.

Zhou, Y. *et al.* (2019) 'The upper-airway microbiota and loss of asthma control among asthmatic children', *Nature Communications*, 10(1). doi: 10.1038/s41467-019-13698-x.

Webové odkazy:

¹ Histology Laboratory Manual. [online]. Dostupné z: http://www.columbia.edu/itc/hs/medical/sbpm_histology_old/lab/lab10_micrograph.html

² Respiratory System - Histology - Embryology. Redirect [online]. Copyright © Dr Mark Hill 2021, [cit. 05.05.2021]. Dostupné z: https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Respiratory_System_-_Histology

