

Mikropartikule

L. Slavík, J. Úlehlová, A. Hluší, J. Procházková, M. Procházka, V. Krčová, K. Indrák

Hemato-onkologická klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc, přednosta prof. MUDr. Karel Indrák, DrSc.

Souhrn: Za mikropartikule (MP) můžeme považovat částice s velikostí 0,05–1 mm. Jejich složení je značně variabilní dle jejich původu. Vždy však nesou na svém povrchu glykoproteiny exprimované taktéž na povrchu buněk. Této vlastnosti se také využívá k jejich detekci pomocí monoklonálních protilátek. MP se uvolňují jako fragmenty z plazmatické membrány prakticky všech typů eukaryotických buněk po jejich stimulaci nebo v rámci jejich apoptózy. MP se mohou tvořit také při procesu narušení buněčné tkáně. Vznik MP takto může reprezentovat širokou odpověď podněty typu buněčného stimulu nebo stresu. V patogenezi zánětu patří mezi klíčové kroky poškození endotelu a uvolnění membrány mikročástic. Metody detekce MP vychází jednak ze snahy stanovit jejich absolutní počet a jednak stanovit jejich trombogenní potenciál. Pro stanovení počtu MP lze s úspěchem využít průtokovou cytometrii, kdy bylo v poslední době popsáno mnoho metod využívajících široké spektrum monoklonálních protilátek. V současné době se využívají zejména stanovení trombocytárních MP pomocí detekce exprese CD41 znaku a endoteliálních MP pomocí CD144 znaku. ELISA metodiky naopak slouží pro stanovení trombogenního potenciálu MP pomocí detekce exprese P-selektinu. Specifickou metodou se jeví použití trombin generace testu v kombinaci s ultrafiltrací pro stanovení trombogenního potenciálu MP. Patologie spojené s MP vychází zejména z poznání jejich patofyziologických vlastností. Trombogenní potenciál je benefitem u trombocytopenií, kde vysoké hladiny MP jsou detekovány u pacientů bez krvácivých komplikací. Tato vlastnost však může být příčinou trombotických komplikací. Naopak negativní vliv mohou mít MP u infarktu myokardu, zánětlivých procesů nebo roztroušené sklerózy.

Klíčová slova: mikropartikule – trombofilní riziko – P-selektin – průtoková cytometrie – generace trombinu

Microparticles

Summary: Microparticles (MPs) are particles sized 0.05–1 mm. Their composition varies considerably depending on their origin. On their surface, however, glycoproteins are always found, that are also expressed on the cell surface. This characteristic is used for their detection using monoclonal antibodies. MPs are released as fragments from the plasma membrane of practically all types of eukaryotic cells, either after their stimulation or during apoptosis. MPs may also be formed in the process of cellular tissue damage. Thus, MP formation may represent a wide response to common stimuli in processes such as cellular stress. Endothelial damage and membrane disruption are the key steps in the pathogenesis of inflammation. Methods for detecting MPs result from attempts to determine both their absolute count and their thrombogenic potential. To measure the count of MPs, flow cytometry may be used with success. Recently, numerous methods using a broad spectrum of monoclonal antibodies have been described. At present, platelet MPs are determined by detecting expression of CD41 and endothelial MPs by expression of CD144. By contrast, ELISA methods are used to evaluate the thrombogenic potential of MPs by detecting expression of P-selectin. A specific method is the thrombin generation assay combined with ultrafiltration to assess the thrombogenic potential of MPs. Understanding the role of MPs in the pathology of numerous diseases is primarily based on the knowledge of their pathophysiological properties. The thrombogenic potential is beneficial in thrombocytopenia, with high levels of MPs being detected in patients without bleeding complications. However, this feature may cause thrombotic complications. On the other hand, MPs may play a negative role in myocardial infarction, inflammatory processes or multiple sclerosis.

Key words: microparticles – thrombotic risk factor – P-selectin – flow-cytometry – thrombin generation

Úvod

Poškození endotelu a uvolnění membrány mikročástic jsou klíčovými kroky v patogenezi zánětu, v širším pojetí smyslu slova [1,2]. V místě poranění endotelu, sekrece pro-zánětlivých cytokinů a exprese cytoadhesivních endotelových buněk umožní rozšíření a diapedezi zánětu. Současné rozdělení endoteliální bariéry umožňuje infiltraci cévní stěny či perivaskulárního prostoru buňky a v jejich důsledku mediátory zprostředkovaný projev zánětlivé reakce. Dlouhou dobu byly MP považovány za inertní

zbytky buněk nebo průvodce buněčné smrti. MP vzniklé apoptózou nebo poškozením buňky jsou nyní popisovány jako silné (dys) regulátory endoteliální funkce. Interakce s proximálními nebo distálními buňkami přispívá k přenosu biologických informací na relativně velké vzdálenosti, což může v konečném důsledku změnit endoteliální funkce samostatně [2].

Ve skutečnosti jsou oba děje – zánět a trombóza – propojeny interakcí cirkulujících buněk, krevních destiček, endotelu (včetně mastocytů) a z něj od-

vozených mikročástic. Dva odlišné skladovací pooly mikročástic se mohou podílet na patofyziologii trombózy jako: mikročástice uvolněné z periferních cév a krevních buněk, mikročástice uvolněné z apoptotických buněk sekvetrované v cévní stěně a uvolněné v případě ruptury ateromatózního plaku. Zde je důkaz, že trombóza je vyvolána tkáňovým faktorem (TF). TF je hlavním iniciátorem v koagulační kaskádě rozšířeným do krevního oběhu pomocí mikropartikulí. Je známo, že škodlivé cirkulující mikropartikule různého původu

mohou vyvolat nežádoucí reakce endoteliálních buněk, včetně amplifikace pro-inflamatorní a pro-koagulační reakce. Experimentální a klinické údaje potvrzují škodlivé vlastnosti MP jako příčinu řady patofyziologických mechanismů při zánětlivých reakcích, modulaci cévního průtoku, vaskulární remodelaci, angiogenezi a apoptóze, což se promítá řadou chorobných stavů, jako jsou ateroskleróza, vaskulitida, sepse a anafylaxe. Např. při ateroskleróze byl zjištěn podíl mikročastic na: uvolňování cytokinů a cytoadhesivní expresi endotelu a leukocytů, monocytární infiltraci aterosklerotického plaku, proliferaci buněk hladké svaloviny, proteolýze (v neovaskularizaci plaku, jako zdroji krvácení u pokročilé léze), zvýšení oxidativního stresu a také zvýšení trombogenicity [2]. Na druhé straně, protože mikročastice mohou odrážet jemnou rovnováhu mezi stimulací buněk, proliferací a smrtí, je možné, že působí jako signály pro udržení homeostázy u mnohobuněčných organismů.

Pro-protizánětlivé účinky mikročastic na endoteliálních buňkách a cévní stěně

Účinky mikročastic na změny pro-zánětlivého fenotypu endotelu byly zdokumentovány řadou prací z poslední doby. První monitorování mikročastic a jejich vlivu na endoteliální fenotyp byl ve studiích zkoumajících účinky destičkových mikročastic na kultury endoteliálních buněk. V průkopnické studii zprostředkovaly transcelulární mikropartikule transport kyseliny arachidonové do endoteliální buňky a současně expresi cyklooxygenázy 2 [4]. Kromě toho byly prokázány schopnosti mikročastic: stimulovat uvolnění pro-zánětlivých cytokinů endotelu, včetně interleukinu (IL)-6, monocytárního chemosenzibilního proteinu-1, indukovat expresi endoteliálních cytoadhezínů (intercelulární adhezni molekuly-1, vaskulární adhezni molekuly-1 a E-selektin) a indukovat expresi příslušných counter-receptorů na povrchu leukocytární membrány [4,5].

Protizánětlivé účinky mikročastic

První poznatky naznačující protizánětlivý vliv membránových vesikul poskytla práce Gassera a Schifferliho [10]. Autoři zde ukázali, že neutrofilní mikrovesikula nedisponují prozánětlivou aktivitou v oblasti lidských makrofágů, což bylo hodnoceno monitorováním uvolňování IL-8 a TNF- α . Nicméně bylo zjištěno zvýšené vylučování transformačního růstového faktoru β 1, který je účinným inhibitorem aktivace makrofágů. Dále se podařilo prokázat zablokování zánětlivé reakce makrofágů na lipopolysacharidy pomocí mikročastic. Uvolňování mikročastic z neutrofilů se jeví jako silný protizánětlivý efekt v brzké fázi zánětu [10]. V poslední době ukázal protizánětlivý účinek mikročastic odvozených z neutrofilů na endoteliálních buňkách novou cestu aktivace koagulace zprostředkovanou mikročasticemi nesoucí Anexin A1, endogenní protein schopný inhibovat adhezi neutrofilů k endotelu [11].

Protrombogenní potenciál mikročastic na endoteliálních buňkách

Různí endoteliální antagonisté, jako jsou cytokiny, mikroorganizmy (včetně *Chlamydia pneumoniae*), mohou indukovat membránovou remodelaci a expozici prokoagulačních fosfolipidů, expresi tkáňového faktoru a jeho uvolnění ve formě vázané na mikropartikule. Na jedné straně může být uvolňování endoteliálních mikročastic (EMP) považováno za přínosné k rozpoznání škodlivých pro-apoptotických faktorů, jako jsou kaspázy-3, a tím zabránění apoptóze endoteliálních buněk a jejich oddělení z endotelu [12]. Na druhé straně, v blízkosti cévních poškození může prokoagulační charakter mikročastic měnit rovnováhu hemostázy. Dokladem této hypotézy byla práce Mesriho a Altieriho, kteří prokázali up-regulaci cirkulujících leukocytárních mikročastic. Zánětlivá stimulace MP in vivo byla provedena pomocí stresu stejně jako aktivace signální cesty koagulační kaskády u endotelových buněk,

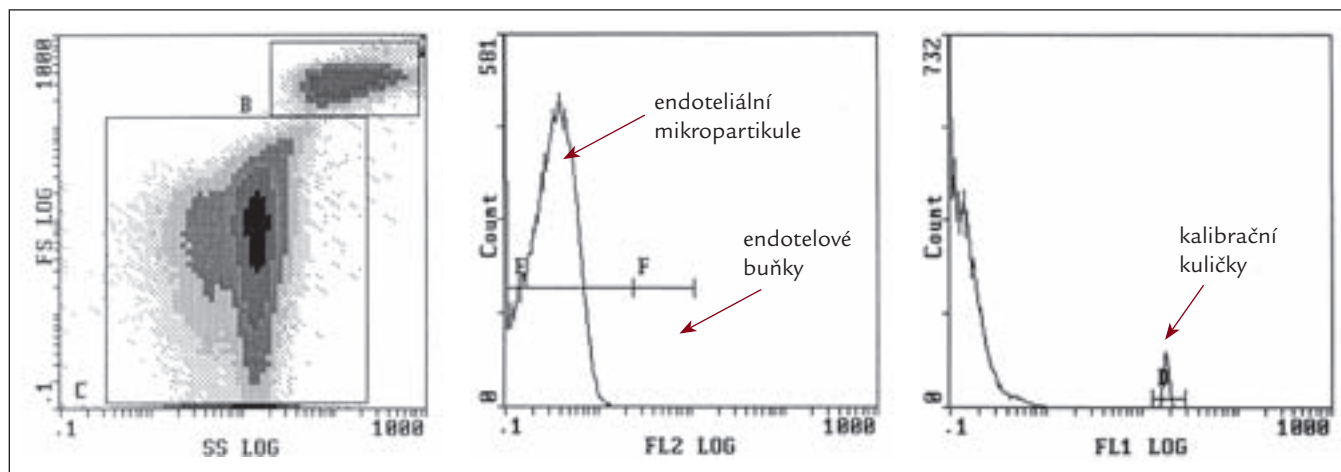
která vede ke zvýšení aktivity tkáňového faktoru [5]. Souběžně mikročasticemi indukované rychlé uvolnění von Willebrandova faktoru na povrchu umožňuje přechodné přilnutí neaktivovaných destiček k endotelu. Tyto dvě hlavní buněčné odpovědi se zdají být pod kontrolou reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) uvolněných mikročasticemi [13].

Antikoagulační potenciál mikročastic

Aniontové fosfolipidy odhalené na aktivovaných cévních buňkách nebo uvolněné z mikročastic mohou podpořit tvorbu jak prokoagulačních komplexů, tak protein C antikoagulačních enzymových komplexů (vyžadují přibližně desetkrát vyšší koncentrace fosfatidylserinu). V závislosti na původu MP dochází k expresi trombomodulinu, inhibitoru zevní cesty tkáňového faktoru, endoteliálního protein C receptoru (ePCR) nebo proteinu S, a tím k eventuálnímu zapojení do antikoagulační cesty [14]. Pozoruhodné je, že i když jsou mikročastice uznávány jako silné prokoagulační mediátory v cévách, zvláště pokud slouží jako nosič tkáňového faktoru, mikročastice uvolněné indukci APC po interakci s funkčním ePCR disponují antikoagulační aktivitou, jako je inaktivace faktoru Va na povrchu mikropartikulí. Obě aktivní místa, jak pro aktivovaný protein C, tak pro proteázou aktivovaný receptor-1 (PAR-1), jsou nezbytná pro formování mikropartikulí [16].

Cirkulující mikročastice a cévní dysfunkce

Několik studií z poslední doby předpokládá, že mikročastice v oběhu lze považovat za doprovodný marker vulnerabilního plaku nebo globální poškození cév [17,18]. Zvýšení plazmatické hladiny endoteliálních MP (EMP) odráží zejména buněčné poškození a jeví se jako marker cévní dysfunkce. EMP koreluje s cirkulující endoteliální dysfunkcí u pacientů s ischemickou dysfunkcí levé komory.



Obr. 1. Příklad flowcytometrického stanovení endoteliálních mikropartikulí.

Metody detekce mikropartikulí

Laboratorní metody detekce mikropartikulí až do nedávné doby narážely na zásadní komplikace, které vycházely z charakteru mikročástic, tj. nelze je považovat ani za buňky, ani za plasmatický analyt. V poslední době, díky rostoucímu významu MP u řady chorobných stavů, se rozvinula řada metod pro stanovení počtu, ale zejména trombogenního potenciálu MP.

Metody na stanovení počtu mikročástic vychází z obecné vlastnosti MP, tj., že exprimují CD znak mateřské buňky. To umožňuje stanovit jednotlivé frakce MPs s ohledem na původ jejich vzniku. Naopak metody založené na stanovení trombogenního potenciálu využívají vlastnosti MP aktivovat koagulační systém. Tyto metody mají využití zejména pro monitorování protrombogenního potenciálu mikročástic.

Průtoková cytometrie

Pro stanovení průtokovou cytometrií lze použít řadu protokolů, které byly publikovány v posledních letech. Velmi elegantní je aplikace metodiky využívající průtokovou cytometrii z plné krve [19].

Vzorky plné krve jsou naznačeny příslušnou monoklonální protilátkou, která je specifická pro buňky, z kterých MP pocházejí. Následně jsou vzorky naředěny a podrobeny analýze v průtokovém cytometru. MP jsme schopni odečíst z forwardscatteru, čímž se vy-

hneme specifické separaci nebo dvojímu značení monoklonální protilátkou. Absolutní počet mikropartikulí je pak vypočten pomocí přidavku kalibračních kuliček o známé koncentraci.

Pro značení lze použít některou z následujících protilátek:

- **CD 31 (PECAM 1)** – CD31 antigen je exprimován na destičkách, monocyttech, granulocytech, ale ne na cirkulujících B-lymfocytech. Vysoká hladina je pozorována na povrchu endotelu.
- **CD 41** – CD 41 znak je exprimován na destičkách a megakaryocytech, ale také B-lymfocytech a endoteliálních buňkách.
- **CD 144** – CD 144, také nazývaný Cadherin 5 nebo VE-Cadherin je 140 kDa protein náležící do rodiny cadherinů, které představují molekuly buněčné adheze. CD 144 antigen je specifický pro endoteliální buňky a je lokalizován na intercelulárních trhlinách s poškozením endotelové tkáně.

ELISA metodiky

ELISA metodiky jsou koncipovány na základě vazby p-selektinu exprimovaného na povrchu MP [20,21]. Expres p-selektinu je dle dostupných prací přímo úměrná trombogennímu potenciálu MP.

MP přítomné ve vzorku se vážou na Annexin V, který je imobilizován na povrchu mikrotitrační desky, a takto navázané fosfolipidové povrchy umožňují přeměnu protrombinu na trombin za

přítomnosti F Xa – F Va a Ca^{2+} . Koncentrace generovaného trombinu je pak přímo úměrná koncentraci vázaných fosfolipidů a lze ji monitorovat pomocí rozkladu specifického substrátu při 405 nm.

Generace trombinu v kombinaci s ultrafiltrací

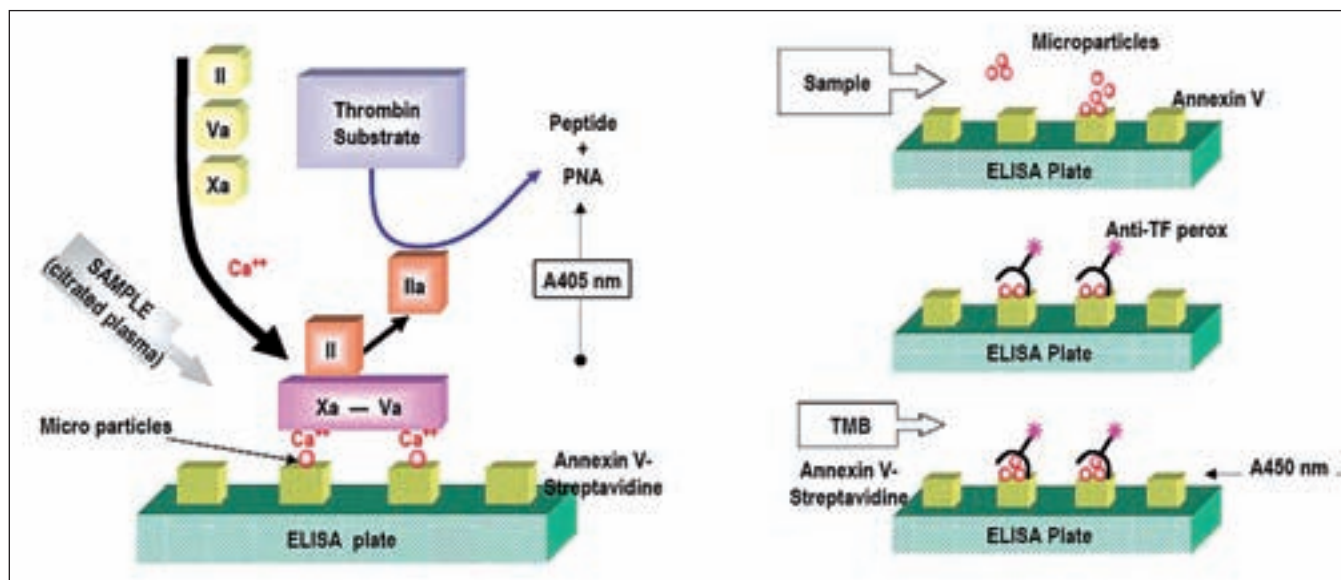
Trombin generační test lze využít pro stanovení trombogenního potenciálu MP bez rozdílu jejich původu. Princip testu spočívá v měření TGA u vzorků před a po odstranění MP [22]. MP jsou pak odstraněny většinou ultrafiltrací.

Rozdíl naměřené generace trombinu je pak přímo úměrný trombogennímu potenciálu MP. Jedná se o elegantní metodu, kterou lze používat v reálném čase bez nutnosti zamrazení vzorků, což vede k vyšší reprodukovatelnosti metodiky.

Patologie spojené s MP

V poslední době byla publikována řada sdělení o významu MP u srpkovité anémie [23], heparinem indukované trombocytopenie [24], septických stavů [25], trombotické trombocytopenické purpury (TTP) [26], paroxysmální noční hemoglobinurie [27], systémových onemocnění [28–32], kardiovaskulárních onemocnění [33], stroku [34], aneurysmatu aorty [35], hluboké žilní trombózy a plicní embolie [36], periferního vaskulárního onemocnění [37].

Ačkoli u řady onemocnění není role MP dosud plně objasněna, u někte-



Obr. 2. Schéma ELISA metodiky stanovení MP.

rých stavů se MP stávají prostředkem pro terapeutické ovlivnění léčebných postupů. Objasnění patofyziologické role mikropartikulí u srpkovité anémie a TTP může být využito pro charakterizaci jednotlivých fází průběhu těchto onemocnění. Detekce chronicky zvýšené hladiny MP u pacientů se srpkovitou anémií může být využito pro rozpoznání endoteliálního ataku onemocnění, což může vést k časnějšímu terapeutickému zásahu.

Aktivní MP mohou představovat u několika chorobných stavů přímou příčinu onemocnění a představují takto důležitý terapeutický cíl. Odstranění mikročastic v průběhu plazmaferézy může tuto metodu značně zvýhodnit proti podání mražené plazmy u TTP. Stejný postup může být efektivní i u některých septických stavů.

Terapeutické využití MP u krvácejících pacientů představuje jednu z dalších možností terapeutického ovlivnění chorobných stavů [38]. Účinek mikročastic v kryoprecipátutu u pacientů refrakterních na substituci krevních destiček je vysvětlován právě působením MP jako náhradních aktivačních povrchů.

Literatura

1. Schouten M, Wiersinga WJ, Levi M et al. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *J Leukoc Biol* 2008; 83: 536-545.
2. Morel O, Toti F, Hugel B et al. Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 2594-2604.
3. Pérez-Casal M, Downey C, Cutillas-Moreno B et al. Microparticle-associated endothelial protein C receptor and the induction of cytoprotective and anti-inflammatory effects. *Haematologica* 2009; 94: 387-394.
4. Barry OP, Pratico D, Lawson JA et al. Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *J Clin Invest* 1997; 99: 2118-2127.
5. Mesri M, Altieri DC. Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway. *J Biol Chem* 1999; 274: 23111-23118.
6. Mause SF, von Hundelshausen P, Zernecke A et al. Platelet microparticles: a transcellular delivery system for RANTES promoting monocyte recruitment on endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1512-1518.
7. Jy W, Mao WW, Horstman L et al. Platelet microparticles bind, activate and aggregate neutrophils in vitro. *Blood Cells Mol Dis* 1995; 21: 217-231.
8. MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E et al. Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity* 2001; 15: 825-835.
9. Canault M, Leroyer AS, Peiretti F et al. Microparticles of human atherosclerosis

tic plaques enhance the shedding of the tumor necrosis factor- α converting enzyme/ADAM17 substrates, tumor necrosis factor and tumor necrosis factor receptor-1. *Am J Pathol* 2007; 171: 1713-1723.

- 10.** Gasser O, Schifferli JA. Activated polymorphonuclear neutrophils disseminate antiinflammatory microparticles by ectocytosis. *Blood* 2004; 104: 2543-2548.
- 11.** Dalli J, Norling LV, Renshaw D et al. Annexin 1 mediates the rapid anti-inflammatory effects of neutrophil-derived microparticles. *Blood* 2008; 112: 2512-2519.
- 12.** Abid Hussein MN, Boing AN, Sturk A et al. Inhibition of microparticle release triggers endothelial cell apoptosis and detachment. *Thromb Haemost* 2007; 98: 1096-1097.
- 13.** Essayagh S, Xuereb JM, Terrisse AD et al. Microparticles from apoptotic monocytes induce transient platelet recruitment and tissue factor expression by cultured human vascular endothelial cells via a redox-sensitive mechanism. *Thromb Haemost* 2007; 98: 831-837.
- 14.** Satta N, Freyssinet JM, Toti F. The significance of human monocyte thrombomodulin during membrane vesiculation and after stimulation by lipopolysaccharide. *Br J Haematol* 1997; 96: 534-542.
- 15.** Sabatier F, Roux V, Anfosso F et al. Interaction of endothelial microparticles with monocytic cells in vitro induces tissue factor-dependent procoagulant activity. *Blood* 2002; 99: 3962-3970.
- 16.** Perez-Casal M, Downey C, Fukudome K et al. Activated protein C induces the release of microparticle-associated endothelial protein C receptor. *Blood* 2005; 105: 1515-1522.
- 17.** Chironi G, Simon A, Hugel B et al. Circulating leukocyte-derived microparticles

- les predict subclinical atherosclerosis burden in asymptomatic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 2775–2780.
18. Pirro M, Schillaci G, Bagaglia F et al. Microparticles derived from endothelial progenitor cells in patients at different cardiovascular risk. *Atherosclerosis* 2008; 197: 757–767.
19. Vidal C, Spaulding Ch, Picard F et al. Flow Cytometry Detection of Platelet Procoagulant Activity and Microparticles in Patients with Unstable Angina Treated by Percutaneous Coronary Angioplasty and Stent Implantation. *Thromb Haemost* 2001; 86: 784–790.
20. Nomura S. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost* 2004; 10: 1847–1848.
21. Miyamoto S, Marcinkiewicz C, Edmunds Jr. LH et al. Measurement of platelet microparticles during cardiopulmonary bypass by means of captured ELISA for GpIIb/IIIa. *Thromb Haemost* 1998; 80: 225–230.
22. Bidot L, Jy W, Bidot C Jr et al. Microparticle-mediated thrombin generation assay: increased activity in patients with recurrent thrombosis. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 913–919.
23. Shet AS, Aras O, Gupta K et al. Sick blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood* 2003; 102: 2678–2683.
24. Visentin GP, Ford SE, Scott JP et al. Antibodies from patients with heparin-induced thrombocytopenia/thrombosis are specific for platelet factor 4 complexed with heparin or bound to endothelial cells. *J Clin Invest* 1994; 93: 81–88.
25. Barry OP, Pratico D, Savani RC et al. Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J Clin Invest* 1998; 102: 136–144.
26. Furlan M, Robles R, Galbusera M et al. von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med* 1998; 339: 1578–1584.
27. Hugel B, Socie G, Vu T et al. Elevated levels of circulating procoagulant microparticles in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and aplastic anemia. *Blood* 1999; 93: 3451–3456.
28. Ogata N, Imaizumi M, Nomura S et al. Increased levels of platelet-derived microparticles in patients with diabetic retinopathy. *Diabetes Res Clin Pract* 2005; 68: 193–201.
29. Omoto S, Nomura S, Shouzu A et al. Significance of platelet-derived microparticles and activated platelets in diabetic nephropathy. *Nephron* 1999; 81: 271.
30. Omoto S, Nomura S, Shouzu A et al. Detection of monocyte-derived microparticles in patients with Type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 2002; 45: 550–555.
31. Diamant M, Nieuwland R, Pablo RF et al. Elevated numbers of tissue-factor exposing microparticles correlate with components of the metabolic syndrome in uncomplicated type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 2002; 106: 2442–2447.
32. Faure V, Dou L, Sabatier F et al. Elevation of circulating endothelial microparticles in patients with chronic renal failure. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 566–573.
33. Bernal-Mizrachi L, Jy W, Jimenez JJ et al. High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes. *Am Heart J* 2003; 145: 962–970.
34. Lee YJ, Jy W, Horstman LL et al. Elevated platelet microparticles in transient ischemic attacks, lacunar infarcts, and multi-infarct dementias. *Thromb Res* 1993; 72: 295–304.
35. Touat Z, Ollivier V, Dai J et al. Renewal of mural thrombus releases plasma markers and is involved in aortic abdominal aneurysm evolution. *Am J Pathol* 2006; 168: 1022–1030.
36. Heresi GA, Chirinos JA, Velasquez H et al. Elevated endothelial Microparticles (EMP) and activation markers of platelet and leukocytes in venous thromboembolism (VTE). *Blood* 2003; 102: 804a.
37. Tan KT, Tayebjee MH, Lynd C et al. Platelet microparticles and soluble P selectin in peripheral artery disease: relationship to extent of disease and platelet activation markers. *Ann Med* 2005; 37: 61–66.

Mgr. Luděk Slavík

www.fnol.cz

e-mail: Ludek.Slavik@fnol.cz

Doručeno do redakce: 31. 3. 2010