

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Zánětlivé markery
Dagmar Straková

Bakalářská práce
2017

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Inflammatory markers
Dagmar Straková

Bachelor work
2017

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Dagmar Straková**
Osobní číslo: **C14341**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Zánětlivé markery**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracovat teoretickou rešerši týkající se zánětlivých markerů.
2. V úvodní části definovat zánět a popsat jeho fáze.
3. Další část věnovat analytům stanovovaným při zánětu.
4. Popsat metody stanovení zánětlivých markerů.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Šárka Štěpánková, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

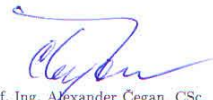
Datum zadání bakalářské práce: **28. listopadu 2016**

Termín odevzdání bakalářské práce: **7. července 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

Prohlašuji

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

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

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne:

Dagmar Straková

Poděkování

Můj velký dík patří především paní Mgr. Šárce Štěpánkové Ph.D. za konzultace a odborný dohled nad mou prací.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se zabývá zánětem jako takovým. Nejprve je zde zánět popsán a rozdělen do kategorií. Nechybí popis bakteriálního a virového zánětu. Největší část je věnována zánětlivým markerům, nejprve reaktantům akutní fáze, dále pak bílkovinám snižujícím přístup k reaktivním formám kyslíku. Další významnou skupinou jsou bílkoviny ochraňující tkáň před jejich poškozením proteázami tzv. serpiny. V této práci jsou popsány také induktory zánětu na konec speciální senzory, umožňující buňkám reagovat na změny spojené se zánětem.

KLÍČOVÁ SLOVA

Zánět, reakce akutní fáze, reaktanty akutní fáze

ANNOTATION

This bachelor work deals with inflammation. First there is inflammation described and divided into categories. There is described bacterial and viral inflammation too. The biggest part is dedicated to markers of inflammations. First there are reactants of acute phase, other there are proteins reducing access to reactive oxygen species. Another significant group are proteins protecting tissue from damage by proteases inhibitors called serpins. In this work are described inductors of inflammation and special sensors which allow cells respond to changes connected with inflammation.

KEY WORDS

Inflammation, reaction acute phase, reactants acute phase

SEZNAM ZKRATEK

(MASP)-1,-2,-3	serinové proteázy asociované s mannan-vázajícím lektinem (mannan-binding lectin-associated serine protease)
A2M	gen kódující α 2-makroglobulin
ADP	adenosin difosfát (adenosine diphosphate)
C3-C9	jednotlivé složky komplementu
CRP	C reaktivní protein (C reactive protein)
DAMPs	s nebezpečím spojené molekulární vzory (danger associated molecular patterns)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
EIA	enzymová imunoanalýza (enzyme immunoassay)
ELISA	imunochemická metoda užívající enzymem značenou protilátku heterogenní (enzyme – linked immunosorbent assay)
HETES	mono-, di- a trihydroxyeikosatetraenoické kyseliny
HMGB1	HMGB1 protein (high-mobility group box1)
IL	interleukin
MBL	manóza vázající lektin (mannose-binding lectin)
NAD ⁺	oxidovaná forma nikotinamidadeninukleotidu
NADH	redukováná forma nikotinamidadeninukleotidu
PAMPs	s patogenem spojené molekulové vzory (pathogen associated molecular patterns)
PGHS	prostaglandin H syntetáza (prostaglandine H syntetase)
RvE1	resolvin E1
SAA	sérový amyloid A
sIL-6R	specifický receptor pro IL-6
SIRT1	NAD ⁺ dependentní senzor (NAD ⁺ dependent redox sensor)
TH	pomáhající lymfocyt (helper)
TNF	nádor nektrotizující faktor (tumor necrosis factor)

Obsah

1 ÚVOD	13
2 ZÁNĚT	14
2.1 Reakce akutní fáze	14
2.2 Fáze zánětu.....	14
2.3 Induktory zánětu	15
2.3.1 Exogenní	15
2.3.2 Endogenní	15
2.4 Bakteriální zánět	15
2.4.1 Patogen spojený s molekulárními modely	15
2.4.2 Virulentní patogen.....	15
2.5 Virový zánět.....	16
2.6 Chronický zánět	16
2.7 Cíl imunitní reakce.....	16
3 REAKTANTY AKUTNÍ FÁZE	17
3.1 Komplement.....	17
3.1.1 Aktivace komplementu	17
3.1.2 Stanovení komplementu.....	18
3.2 C-reaktivní protein	18
3.2.1 Metody stanovení.....	19
3.2.2 CRP jako marker onemocnění srdce a diabetu	19
3.3 Cytokiny.....	19
3.4 Imunoglobuliny	20
3.4.1 Složení.....	21
3.4.2 Funkce.....	21
3.4.3 Metody stanovení.....	22
3.5 Manóza vázající lektin	22
3.5.1 Metody stanovení.....	23
3.6 Sérový amyloid A	23
3.6.1 Stanovení.....	23
3.6.2 Sérový amyloid A a onemocnění.....	23
3.7 Albumin	24
3.7.1 Negativní reaktant akutní fáze	24
3.7.2 Stanovení.....	24
3.8 Interferon.....	24

3.8.1 Lopus erythematodes	25
4 BÍLKOVINY SNIŽUJÍCÍ VZNIK A PŘÍSTUP K REAKTIVNÍM FORMÁM KYSLÍKU.....	26
4.1 Haptoglobin.....	26
4.1.1 Struktura.....	26
4.1.2 Mechanismus působení.....	26
4.1.3 Stanovení.....	27
4.2 Hemopexin	27
4.2.1 Protein vázající hem.....	27
4.2.2 Hemopexin a periferní nervová tkáň.....	27
4.3 Ceruloplasmin	28
4.3.1 Stanovení.....	28
4.3.2 Ceruloplasmin a těhotenství.....	29
4.4 Ferritin.....	29
4.4.1 Molekula ferritinu	29
4.4.2 Ferooxidázová aktivita.....	30
4.4.3 Regulace koncentrace ferritinu a transferinu	30
4.4.4 Vazba železa	30
4.5 Hpcidin.....	30
4.5.1 Recyklace železa	31
4.5.2 Stanovení.....	31
5 BÍLKOVINY PŮSOBÍCÍ PROTI KOLATERÁLNÍMU POSKOZENÍ TKÁNĚ	32
5.1 α -1 antitrypsin	32
5.1.1 Vrozený deficit α -1 antitrypsinu	32
5.1.2 Clearance α -1 antitrypsinu	33
5.1.3 Glykosylace α -1 antitrypsinu	33
5.2 α -1 antichymotrypsin	33
5.2.1 Chronická obstrukční plicní nemoc	33
5.2.2 Alzheimerova choroba.....	34
5.3 α -1 kyselý glykoprotein	34
5.4 α -2 makroglobulin.....	34
5.5 Inhibitor C1	35
5.5.1 Struktura.....	35
5.5.2 Inhibiční kapacita.....	36
5.5.3 Deficit inhibitoru C1	36

5.5.4 Mutace.....	36
5.6 Antitrombin.....	36
5.6.1 Struktura.....	37
5.6.2 Funkce antitrombinu	37
5.7 Inhibitor aktivátoru plazminogenu 1.....	37
5.7.1 Vliv na nádorové onemocnění	38
5.7.2 Struktura.....	38
6 MEDIÁTORY ZÁNĚTLIVÉ REAKCE	39
6.1 Resolvin	39
6.1.1 Způsob interakce	39
6.2 Leukotrieny	39
6.2.1 Leukotrien B4	40
6.3 Prostaglandiny.....	40
6.3.1 Syntéza prostaglandinů	40
6.3.2 Prostaglandin D.....	41
6.4 Tromboxany.....	41
6.5 Nekrotické buňky jako induktor zánětu	41
7 BUNĚČNÉ SENZORY.....	42
7.1 NAD ⁺ -dependentní senzor SIRT1	42
7.2 Receptor P2X7	42
7.3 Rozpuslné cytokinové receptory	42
Citovaná literatura.....	45

1 ÚVOD

Správný průběh imunitní reakce při zánětu je bezpodmínečně nutný pro boj s patogeny. Jedná se o systematický proces, jehož částečné poškození způsobuje dysfunkci celé imunitní reakce. Největším nebezpečím pro imunitní systém jsou civilizační choroby typu diabetes mellitus, obezita a kardiovaskulární onemocnění (Hotamisligil, 2006).

Zánět, maligní bujení, autoimunitní reakce či poranění tkáně spouští reakci akutní fáze (Feelders, et al. 1998). Během zánětu dochází k migraci leukocytů z krevního oběhu do míst poškozené tkáně. Akutní zánět probíhá rychle a intenzivně v místě poškození, obvykle se místo poškození po залечení zhojí. V místě poškození nacházíme obvykle neutrofilní makrofágy, později monocyty. Na rozdíl od tohoto chronický zánět doprovází obvykle poškození tkáně a některé molekuly získávají jiné funkce (například interleukin 6). V místě chronického zánětu histologicky najdeme obvykle makrofágy a lymfocyty (Romani, et al. 1996). Byla prokázána souvislost mezi chronickým zánětem a inzulinovou rezistencí. Způsobuje to především tuková tkáň, která snižuje aktivitu produktů bílých krvinek (Xu, et al. 2003).

Reakce akutní fáze je jeden z klíčových mechanismů pro obranyschopnost organismu. Tento děj je doprovázen zvýšením některých sérových proteinů (Nishio, et al. 1993). Nejen zánět, ale zranění či nádor způsobují syntézu reaktantů akutní fáze a reakci organismu zvýšením teploty a leukocytózou. Dále také dochází k v zniku záporné dusíkové bilance. Za nejdůležitější orgán pro tvorbu plasmatických bílkovin jsou považována játra (Castell, et al. 1989).

2 ZÁNĚT

V historii byl zánět popisován jako červený, horký, oteklý, bolestivý a s poškozenou funkcí. Zánět rozlišujeme podle průběhu (akutní a chronický), podle původce (bakteriální, virový, autoimunitní) a dále také infekční a neinfekční (McCall, et al. 2011). Klinickým obrazem zánětu je leukocytóza a zvýšená sedimentace erytrocytů (Ledue, et al. 1998).

Organismus má mnoho bariér, jak čelit vzniku zánětu. Mezi nejdůležitější patří buněčná imunita především účinky makrofágů, monocytů a neutrofilů. Nezanedbatelné jsou též bariéry prostorové, sliznice a další (McCall, et al. 2011).

2.1 Reakce akutní fáze

Jedná se o složitý děj, na kterém se podílí velké množství složek imunity. Obrana organismu spočívá ve změnách fyziologických, biochemických a nutričních. Stále se zkoumá, mechanismus vzniku a obrany organismu. Dnes známe mnoho plasmatických bílkovin, u kterých sledujeme koncentrační změny v plasmě. Tyto proteiny označujeme jako reaktanty akutní fáze. Rozlišujeme pozitivní a negativní reaktanty akutní fáze. Přesný význam a funkce je u některých již vysvětlena, avšak u jiných se stále čeká na objasnění (Ceciliani, et al. 2002). Hlavními zástupci reakce akutní fáze jsou C-reaktivní protein (CRP) a sérový amyloid A (SAA) (Ledue, et al. 1998).

Proteiny reakce akutní fáze jsou důležitými ukazateli o délce, intenzitě a vytrvalosti infekce (Ledue, et al. 1998).

2.2 Fáze zánětu

Hlavní bariérou vůči patogenům je kůže, brání vstupu především bakteriím. Pokud dojde k jejímu poranění, mikroorganismy mohou snadno pronikat do tkáně a dále do krevního řečiště, popřípadě do lymfatického řečiště. Rozpoznáváme 4 fáze zánětu. První fázi nazýváme koagulační a nastupuje ihned po zranění. Další fází je vlastní zánět. Tato fáze plynule přechází do fáze proliferační, následuje hojení. Jakékoli narušení rovnováhy těchto procesů vede k prodlouženému hojení ran, nadměrnému zjizvení, popřípadě nezahojení chronických lézí (Landén, et al. 2016).

2.3 Induktory zánětu

2.3.1 Exogenní

Charakteristickým zástupcem exogenního induktoru zánětu je mikrob. Dělí se na dvě hlavní skupiny - patogen spojený s molekulárními modely (PAMPs) a virulentní patogen (Moreau, 2016).

2.3.2 Endogenní

Tyto složky imunity jsou tvořeny na základě podnětu o poškození tkáně. V místech traumat dochází k vylučování molekul z nekrotou zničených buněk, či se jedná o produkty rozpadu intracelulární matrix. Na tyto látky mají makrofágy na svém povrchu receptory. Tyto produkty obecně nazýváme „s nebezpečím spojené molekuly“ (DAMPs) (Moreau, 2016).

2.4 Bakteriální zánět

Gram negativní bakterie se svou lipopolysacharidovou jednotkou naváže na znak CD14, které nesou monocyty a makrofágy, popřípadě CD11 a CD18 či jiné receptory na povrchu lymfocytů. Touto vazbou se aktivuje panel nástrojů imunity, na předních místech cytokiny, které putují k cílovým tkáním a informují je o probíhající invazi bakterií (Arredouani, et al. 2005).

2.4.1 Patogen spojený s molekulárními modely

PAMPs jsou dané molekulární vzory, které je nespecifická imunita schopna detekovat a bojovat proti nim. K jejich detekci používají buňky speciální receptory umístěné na povrchu buňky nebo v jejím cytosolu. Jedná se o ustálené receptory zapsané v DNA. Po navázání patogenu na receptor se spouští kaskáda reakcí. Nejprve se aktivují transkripční faktory. Tyto spouštějí transkripci DNA a tvorbu cytokinů, chemokinů a dalších molekul vrozené zánětlivé reakce (Moreau, 2016).

2.4.2 Virulentní patogen

Faktory virulence jsou snímány nepřímě. Poté co dojde k poškození tkáně, jsou tyto faktory rozpoznány imunitním systémem. Narušují homeostázu, například porušováním cytoplazmatické membrány, z níž se počne vylívat draslík. Na jeho zvýšenou koncentraci reaguje receptor. Organismus má vytvořený systém receptorů pro snímání faktorů virulence patogenních bakterií. Například *Clostridium difficile* je snímáno

cytotoxinem. Mohou být sledovány také pigmenty typické například pro *Pseudomonas aeruginosa* (Moreau, 2016).

2.5 Virový zánět

V první fázi nastupuje nespecifická imunita. Dochází ke zvýšení teploty a snížení pH. První obranný mechanismus proti virům je neutralizace virů, ke které dochází pomocí složek v exudátu. Dalším mechanismem je fagocytóza buňkami, popřípadě unášení lymfou do nejbližší lymfatické uzliny a fagocytóza v uzlině. V uzlině jsou antigeny virů předány buňkám specifické imunity, které proti nim počínají tvořit protilátky, ale nyní se jedná o imunitu specifickou (Celer, et al. 201).

2.6 Chronický zánět

Dlouhodobě zvýšené proteiny akutní fáze značí přítomnost zánětu, který přešel do chronicity. Dále mohou značit kardiovaskulární onemocnění či inzulinovou rezistenci. Chronický zánět také může být spouštěčem diabetu 2. typu (Festa, et al. 2002).

2.7 Cíl imunitní reakce

Veškeré molekuly a buňky imunitní reakce se snaží kompletně zničit induktora zánětu. To znamená zničit viry, bakterie či jiné mikroby, popřípadě aktivovat apoptózu poškozených buněk. Dalším cílem organismu je napravit tkáň, aby byla umožněna jejich funkčnost. Například při aktivaci T-lymfocytů především cytotoxických může dojít k rozvinutí imunopatologie. Tyto buňky počnou napadat svou vlastní tkáň. Především bakteriální záněty jsou nebezpečné. Bakterie mají velké množství faktorů virulence včetně toxinů. Pokud pacient trpí imunodeficitem, bude s bakteriálním zánětem bojovat jen velmi obtížně (Moreau, 2016).

3 REAKTANTY AKUTNÍ FÁZE

3.1 Komplement

Komplement je zásadní složka imunity při zánětlivých autoimunitních onemocněních. Jeho nedostatek byl nalezen u 2-10 % všech imunodeficiencí. Avšak geneticky způsobený nedostatek je pouze v několika setinách procent. Nejčastějšími příčinami nedostatku komplementu jsou meningokoková meningitida, opakované bakteriální infekce a autoimunitní onemocnění. Bylo zjištěno, že při autoimunitním onemocnění dochází k poškození počátku kaskády (C1 – C4). Mimo poškození samotných složek komplementu může být narušená některá z drah aktivace komplementu (Prohászka, et al. 2016).

Postupnou aktivací jednotlivých složek komplementu dochází k opsonizaci cizorodých antigenů. Jednotlivé složky komplementu se aktivují vzájemně mezi sebou, a tím počinají imunitní odpověď. Díky enzymům, které jsou součástí komplementu, jsou schopné některé bakterie zabít (Janeway, et al. 2001).

Složky komplementu jsou v neaktivních formách tzv. zymogenů. Zymogeny jsou ve všech tekutinách těla a je nutné nejprve aktivovat v místě vznikajícího zánětu. Aktivováním jedné dochází ke štěpení substrátu. Enzymatický proces první složky aktivuje následující složku ve formě zymogenu. Takto se kaskádovitě postupuje až do aktivace posledního (Janeway, et al. 2001).

3.1.1 Aktivace komplementu

Aktivace je možná třemi různými cestami (Hořejší, et al. 2009).

Klasická cesta

Počíná navázáním protilátek na antigen, nebo může být aktivována pentaxinem. Tím se změní molekula protilátky a uvolní se vazebné místo pro C1 složku komplementu. C1 se naváže na Fc fragment imunoglobulinu. Tento komplex má proteolytickou funkci, díky které se aktivuje C2 a C4. C2a a C4a se naváže na povrch antigenu. Následuje vznik C3konvertázy (štěpí se na C3a a C3b) a dále C5konvertázy (štěpí se na C5a, C5b). C5b se váže do komplexu s C6, C7 a C8 tímto se započíná lytická fáze. Tento komplex se zanořuje do cytoplasmatické membrány opsonizované buňky a váže se na něj až 19 molekul C9. Ne všechny buňky jsou

vnímavé vůči tomuto mechanismu, mnoho bakterií má ochranu díky buněčné stěně (Hořejší, et al.2009).

Alternativní cesta

Jedná se o vývojově starší proces. Spočívá ve schopnosti složky C3 samovolně štěpit na C3b a C3a fragment. C3b se dále účastní reakce s faktorem B, který je v přítomnosti hořčíku a proteázy P štěpen na Ba a Bb fragmenty. Bb fragmenty se váží v C3b a vzniká C3konvertáza. Dále je postup úplně stejný jako při klasické cestě aktivace komplementu. Tato kaskáda se může snadno zvrhnout v autoimunitní reakci. Pokud totiž C3 složka komplementu, která se může štěpit samovolně, není namířena proti bakteriím, dochází k poškození vlastního organismu (Hořejší, et al. 2013).

Lektinová dráha

Manan vázající lektin se naváže na atakovanou buňku a aktivuje C1 složku. Dále pokračuje klasická cesta aktivace komplementu (Hořejší, et al. 2013).

3.1.2 Stanovení komplementu

Hledíme-li na komplement, jako na analyt, který má poukázat na funkci pacientovy imunity, popřípadě dopomoci stanovit diagnózu, může u něho sledovat mnoho vlastností (viz tab. 1) (Prohászka, et al. 2016).

Tabulka 3.1 Vyšetřované analyty komplementu (Prohászka, et al. 2016)

	Celková aktivita komplementu
	Aktivita jednotlivých složek komplementu
Kvantifikace	titr jednotlivých složek (pomocí ELISA, Western Blot)
Aktivace produktů	produkty štěpení
	komplex mezi složkou komplementu a inhibítozem
	makromolekulární komplexy
Autoprotilátky	ELISA (angioderma, funkční testy - nefrotický faktor)
Povrchové proteiny	Kvantifikace průtokovou cytometrií
Genetické mutace	Detekce genetických chorob komplementu, při jeho nedostatku či nefunkčnosti.

3.2 C-reaktivní protein

Byl objeven v roce 1930, kdy v pacientově séru reagoval s polysacharidem C, který nesou na svém povrchu bakterie *Streptococcus pneumoniae*. Podle tohoto faktoru

virulence byl nazván tento protein (Epstein, et al 1999). C-reaktivní protein (CRP) se účastní reakce akutní fáze v těle člověka. Patří do skupiny nespecifické imunity. Jeho koncentrace se významně zvyšuje po několika hodinách od poranění kůže či vniknutí cizorodých mikroorganismů. Je schopen rozpoznávat antigeny na buňkách a rozlišovat antigeny vlastní a cizí, na které se váže. Dále se váže na buňky, u kterých má proběhnout buněčná smrt (Black, et al. 2004). CRP slouží k diagnostice bakteriálních zánětů. Jeho syntéza probíhá v játrech na základě podnětu od interleukinu 6. Váže se na polysacharidové antigeny bakterií, spouští aktivaci komplementu klasickou cestou (Simon, et al. 2004). CRP během několika hodin po propuknutí reakce akutní fáze nabývá více než 100 násobnému zvýšení koncentrace u zánětů vyvolaných bakteriemi (Ledue, et al. 1998).

3.2.1 Metody stanovení

CRP stanovíme zákalometrickými metodami (ELISA a další) za použití monoklonálních protilátek proti CRP (Ledue, et al. 1998).

3.2.2 CRP jako marker onemocnění srdce a diabetu

Chronickým onemocněním srdce je chápána i vysoká koncentrace cholesterolu a vznik aterosklerotických plátů. V tomto stavu můžeme nalézat zvýšené zánětlivé markery včetně CRP (Ridker, 2003).

Mnoho lidí, kteří nespádají do rizikových skupin, prodělalo infarkt myokardu či jiné srdeční onemocnění. Vědci hledali, co mají společné. Zjistili, že společným markerem byl CRP. U zdravého člověka nalezneme referenční hodnoty do 1,1 mg/l, hodnoty od 1,1 do 3 mg/l považujeme za zvýšené pro zvýšené riziko srdečních onemocnění. Nelze jej posuzovat jako samostatný analyt. Vždy se posuzuje spolu s tradičními vyšetřovanými analyty (cholesterolem, ...). Byl proveden výzkum pacientů s chronicky zvýšeným CRP. U těchto lidí byl zvýšen výskyt onemocnění srdce. Dále byla prokázána souvislost zvýšeného CRP spolu s diabetem 2. typu (Ridker, 2003).

3.3 Cytokiny

Při studování zánětlivých procesů nás zajímají především cytokiny (Klyne, et al. 2017). Jedná se o endogenní mediátory imunitního systému (Kilpatrick and Harris, 2004). Stimulují průběh a snižují imunitní odpovědi na konci zánětu. Působením prozánětlivých cytokinů dochází k rozvoji některých symptomů, jako je nespavost,

deprese a další. Nejdůležitějším symptomem, který vyvolávají je bolest (Klyne, et al. 2017). Dále pozměňují v cílových buňkách expresi genů, a tím mění metabolismus buňky (Kilpatrick and Harris, 2004).

Prozánětlivé cytokiny zahrnují interleukin (IL)-1, -6 a tumor necrosis factor (TNF). Tyto cytokiny jsou tvořeny během fyziologických a patologických stavů i periferní nervovou soustavou (Smith, et al. 2009).

Cytokiny lze označit jako "hormony imunitního systému", nejedná se však o hormony, protože pocházejí z různých buněk v závislosti na podnětu. Mají rozmanité množství funkcí, které se mohou vzájemně překrývat. Endogenní mediátory nazýváme IL 1-4, podléhají přísné kontrole a regulaci. Mají poměrně krátkou dobu, při které jsou plně aktivní (Kilpatrick and Harris, 2004).

IL-23 je speciální cytokin, skládající se z podjednotky p19 typické pouze pro tento IL a dále z podjednotky p40, kterou má společnou s IL-12. Tento cytokin je velice důležitý pro rozvoj TH lymfocytů (helper). Bylo zjištěno, že IL-23 úzce spolupracuje s lymfocyty nesoucími na svém povrchu znak CD4+. Tyto lymfocyty tvoří cytokiny a nekrotizující faktory. CD4+ lymfocyty jsou vysoce patogenní a velice důležité pro vytvoření orgánově specifického zánětu, který je spojený s autoimunitou nervového systému (Langrish, et al. 2005).

IL-6 během akutního zánětu působí ochranně vůči tkáním, ale pokud zánět přejde do chronicity, nabývá prozánětlivých účinků. Jedním z nich je simulace T a B lymfocytů, jejichž přítomnost je charakteristická pro chronický zánět. Během akutní fáze podporuje tvorbu plasmatických bílkovin. Tento cytokin řídí rozsah poškození tkáně a simuluje buněčnou imunitní odpověď (Romani, et al. 1996). Trombin funguje jako prozánětlivá molekula, která výrazně ovlivňuje aktivaci endotelu, exkreci IL-8 a aktivaci adhezivních molekul (Horii, et al. 1989).

3.4 Imunoglobuliny

Imunoglobuliny jsou odpovědné za specifickou imunitní odpověď organismu na cizorodý antigen. Tvoří se v B-lymfocytech přeměněných na plasmatickou buňku (Schroeder, et al. 2010). Na B-lymfocyty jsou receptory pro antigen, pokud dojde k jeho navázání, buňka se začne dělit a přemění se v plasmatickou buňku. Tato buňka tvoří

velké množství monoklonálních protilátek proti antigenu, který se navázal na receptor. Typickým znakem B-lymfocytů jsou znaky CD19 a CD20 (Bartůňková, et al. 2011).

3.4.1 Složení

Imunoglobuliny mají tvar písmene Y s výkyvnými rameny. Jedná se o monomerní molekuly, skládající se z 2 lehkých a 2 těžkých řetězců. Těžké řetězce označujeme H (*heavy*) a mají molekulovou hmotnost 50 kDa. Lehké označujeme L (*light*), tyto mají molekulovou hmotnost 22-25 kDa. L a H řetězce jsou spojeny disulfidickými vazbami, stejně tak i H řetězce mezi sebou. Některé imunoglobuliny mohou obsahovat kratší sacharidové řetězce, které jsou vázány N- i O-glykosidově. Přesné složení se liší mezi jednotlivými třídami. Obecně můžeme říci, že v určité třídě mají velkou část řetězců H konstantní. U L řetězců mají společnou asi z 50 %, zbylé části, zvláště pak N-konce se mohou lišit. Jedná se o epitopy, které jsou zodpovědné za vazbu antigenu, a pořadí aminokyselin odpovídá specifikaci protilátky (Schroeder, et al. 2010).

L řetězce se vyskytují ve dvou modifikacích - κ a λ , κ řetězec je u člověka častější. U H řetězců je dělení variabilnější a podle druhu řetězce je dělíme do tříd: γ řetězec najdeme u třídy IgG, α u IgA, μ u IgM, δ u IgD a ϵ u třídy IgE (Schroeder, et al. 2010).

3.4.2 Funkce

IgM se při imunitní odpovědi tvoří jako první, jedná se o pentamer. Při navázání na složky komplementu aktivuje klasickou dráhu tvorby komplementu. Není nutná pomoc od T-lymfocytů. Fyziologická hodnota činí 0,9-2,5 g/l (Bartůňková, et al. 2011).

IgG se tvoří později než IgM a za přispění T-lymfocytů. IgG jsou paměťovými protilátkami, které nalzáme v koncentraci 8-18 g/l. jedná se o velice důležité složky imunity plodu a novorozence, protože přechází přes hemoplacentární bariéru a chrání dítě v prvních měsících života, než začne tvořit protilátky vlastní (Bartůňková, et al. 2011).

IgA nalezneme především na sliznicích v sekretech a v mateřském mléce. Jedná se o další důležitou část imunity novorozence. Jejich úkolem je neutralizace cizorodých antigenů. Fyziologická koncentrace je 0,9-3,5 g/l. IgE nalezneme pouze v nízkých koncentracích, ale zvyšuje se při parazitárních onemocněních a alergiích (Bartůňková, et al. 2011).

3.4.3 Metody stanovení

Elektroforéza

Základní vyšetření poskytuje čistě informativní výsledek. Pomocí ELFO se rozdělí sérové proteiny na frakce. Podle jejich složení lze směřovat další vyšetření, popřípadě imunoblotovací techniky. Pro ELFO potřebujeme vanu, stejnosměrné napětí udržované zdrojem. Proteiny migrují z jamek startu po nejčastěji vrstvě agarózy (Orsini, et al. 2016).

Westem blot

Nejprve se stanoví obsah celkové bílkoviny v séru, poté se elektroforeticky rozdělí na gelu při stejnosměrném proudu o napětí 90 V. Rozdělené bílkoviny se dále přenášejí na folii za konstantního proudu 0,8 mA/0,8 m². Nespecifická vazba na folii je dále blokována. Po zesílení vazeb na folii se vzorek promývá. Vzorek se inkubuje přes noc s protilátkami proti stanovovanému proteinu. Na tuto protilátku se navazuje značená protilátka a provede se kvantifikace (Orsini, et al. 2016).

3.5 Manóza vázající lektin

Manóza vázající lektin (mannose binding lectin, MBL) je bílkovina akutní fáze a váže se v trojitěm helixu. Po uvolnění do séra dochází k polymerizaci. Z dimeru se může stát až oktamer. Míra polymerizace odpovídá míře reaktivity. Účastní se vazby látek přirozené imunity na molekuly sacharidů na povrchu bakterií. MBL plní několik funkcí: I. aktivuje lektinkomplementovou dráhu, II. napomáhá fagocytóze cizorodých látek, III. moduluje zánět (Scorza, et al. 2014). Bylo objeveno, že tento mechanismus je zásadní po prodělané mozkové ischemii. Klíčovou roli zde sehrávají s manózou asociované proteázy vázající lektin (mannan-binding lectin-associated serine protease) MASP-1, MASP-2, MASP-3 (Orsini, et al. 2016).

Nedostatek časných bílkovin MBL vede ke zvýšení náchylnosti k infekcím. Snižuje se schopnost rozpoznat cizorodé antigeny a opsonizovat je. Pokud je v plasmě dostatek MBL, ale je podezření na poškození, provádí se analýza MASP-1 a MASP-2 (Orsini, et al. 2016).

3.5.1 Metody stanovení

Pro přesné stanovení koncentrace MBL se využívá imunochemických metod. Pro jejich citlivost a specifčnost (Bartůňková, et al. 2011). Využíváme komerčně vyráběných setů pro nefelometrická stanovení. Součástí setu jsou polyklonální protilátky proti MBL. Stanovení probíhá metodou ELISA s použitím kalibrační přímky a následným výpočtem skutečné koncentrace vzorku (Ledue, et al. 1998).

3.6 Sérový amyloid A

Jako SAA se označuje skupina proteinů, která je kódovaná různými geny s vysokou úrovní homologní sekvence. Jsou tvořeny v játrech během zánětlivého onemocnění, nebo při jiných onemocněních jako jsou metabolické poruchy, traumata aspod. Spektrum jejich působení je široké. Podílejí se na metabolismu cholesterolu, brání agregaci destiček, brání adhezi mikroorganismů a aktivují neutrofile. Jsou schopny se navázat na cytoplasmatickou membránu gramnegativních bakterií a vyvolat jejich pohlcení makrofágem. Při infekční žloutence typu C působí antivirotický proti zúčastněnému viru tím, že blokuje vstup viru do buňky. Během reakce akutní fáze může být koncentrace zvýšena až 1000x. Během léčby se sleduje snižování koncentrace, což značí správné podání léčiv (Piotti, et al. 2016).

3.6.1 Stanovení

Provádí se imunochemická vyšetření pomocí značených specifických protilátek metodou ELISA, nebo ještě citlivějšími metodami pomocí western blotu (Wan-Ibrahim, et al. 2016).

3.6.2 Sérový amyloid A a onemocnění

Byla provedena studie na přítomnost a aktivitu SAA. Byly použity vzorky pacientů s nejrůznějšími jaterními poruchami v různých stadiích vývoje. Výsledkem studie bylo, že vysoká koncentrace proteinů SAA je obecně v počátku onemocnění. Poté co dochází k fibróze jater se aktivita SAA snižuje. Zvýšení aktivity jaterních enzymů nezávisí na zvýšení SAA (Piotti, et al. 2016).

Mimo onemocnění jater je možné stanovovat SAA jako nádorový marker při rakovině kostí. Zvýšené koncentrace SAA v séru nalzáme u agresivnějších sarkomů (Wan-Ibrahim, et al. 2016).

3.7 Albumin

Albumin je nejhojnějším proteinem v lidském séru. Jeho nejdůležitější funkcí je transport lipoproteinových částic. Dále transportuje další látky krevním řečištěm, například léky či hormony. Byla objevena krystalická struktura albuminu, byla zde nalezena hydrofobní místa schopná vázat mastné kyseliny (Curry, et al. 1998). Koncentrace tohoto proteinu během reakce akutní fáze klesá, nazýváme jej negativním reaktantem akutní fáze (Lebreton, et al. 1979). Další funkcí albuminu je vyvazování volného hemoglobinu z krevního řečiště (Muller-Eberhard, 1970).

3.7.1 Negativní reaktant akutní fáze

Vědci provedli studii, aby zjistili, proč se koncentrace albuminu během reakce akutní fáze snižuje. Během ní byli sledováni pacienti s nádorovým onemocněním, kteří vykazovali reakci akutní fáze, při níž bylo zjištěno, že TNF a IL způsobují sníženou expresi genu pro albumin a následnou translaci albuminu. Naopak v játrech jsou tvořeny bílkoviny akutní fáze. Dále bylo zjištěno, že k hypoalbuminémii nedochází vlivem snížené rychlosti syntézy albuminu (Fearon, et al. 1998).

3.7.2 Stanovení

Běžně se provádí stanovení pomocí reakce albuminu s bromkresolovou zelení. Jedná se o jednoduchou metodu s použitím stabilních reagensů. Používá se 0,075mol/l roztok bromkresolové zeleně, sukcinátový pufr o pH 4,2, měříme absorbanci při 620 nm. Reakce je lineární do 6 g/dl krve. Nyní je možné přidávat do reakce povrchově aktivní látky, které snižují absorbanci blanku a podporují linearitu reakce (Doumas, et al. 1971). Stanovení neruší vysoká chylozita séra. Byla provedena studie, při níž bylo zjištěno, že se bromkresolová zeleň neváže na sérové globuliny (Rodkey, 1965).

3.8 Interferon

Interferon je důležitý pro zotavení po virové infekci. Vylučuje se na počátku virové infekce. Indukuje v organismu antivirový stav. Aktivuje pomocné T-lymfocyty. Existuje transkripční faktor interferon 1, který reguluje syntézu interferonu (Panchanathan, et al. 2005).

Původně byla představa, že vrozený imunitní systém rozpoznává virus pomocí nukleových kyselin. Bylo však objeveno, že organismus disponuje speciálním

receptorem schopným navázat virus. Tento receptor poté indukuje syntézu interferonu. Takto se chovali protizánětlivé monocyty (Barbalat, et al. 2009).

3.8.1 *Lopus erythematodes*

Jedná se o jedno z nejčastějších kožních onemocnění na světě. Mnoho studií prokázalo, že interferon úzce souvisí s tímto onemocněním. Interferon tvoří plazmacytoidní buňky v kožních lézích, které vznikají při tomto onemocnění. Interferon dále indukuje produkci dalších chemokinů. Tyto molekuly dále zvyšují cytotoxickou kapacitu poškozených buněk. Onemocnění dále rozšiřují nejrůznější intracelulární adhezivní receptory, jejichž funkce je přenést do poškozené tkáně autoaktivní lymfocyty (Wenzel and Tüting, 2007).

Byla zpracována studie, zabývající se léčbou tohoto onemocnění. Mimo standardní využití léků s protizánětlivým účinkem proti chemokinům, adhezivním receptorům a dalším lze po bližším studiu najít další cesty léčby. Nabízí se léčba pomocí inhibice interferonu. Je možné inhibovat samotný interferon, jeho syntézu či jeho receptory. Další možnost je inhibice molekuly TLR9, která je schopná podpořit tvorbu chemokinů. Popřípadě lze použít jako léčbu přímé anti-interleukin protilátky (Wenzel and Tüting, 2007).

4 BÍLKOVINY SNIŽUJÍCÍ VZNIK A PŘÍSTUP K REAKTIVNÍM FORMÁM KYSLÍKU

4.1 Haptoglobin

Jedná se o reaktant akutní fáze. Jeho nárůst je spojený se zvýšenou hemolýzou, která je způsobena zánětlivým procesem. Haptoglobin je antioxidant. Tato bílkovina má za úkol vyvazovat volný hemoglobin. Transportuje jej do jater, kde je dále zpracováván (Sadrzadeh and Bozorgmehr, 2004). Vazba hemoglobinu na haptoglobin je nevratná (Wejman, et al. 1984). Tato bílkovina je syntetizována játry, po stimulaci IL-6. Nárůst koncentrace haptoglobinu může v některých stavech vést k útlumu produkce cytokinů. Útlum imunitní reakce je způsoben schopností vázat se na buňky imunity a tím zpomalovat jejich působení (Arredouani, et al. 2005).

4.1.1 Struktura

Molekula se skládá ze dvou H řetězců, které jsou spojeny dvěma L řetězci. Každý H řetězec vyvazuje $\alpha\beta$ dimer hemoglobinu. Obecně lze připodobnit haptoglobin k čince, kdy 2 kulaté konce představují H řetězec a spojení odpovídá dvěma L řetězcům spojeným uprostřed. Informace o struktuře tohoto proteinu byly zjištěny pomocí elektronové mikroskopie (Wejman, et al. 1984).

Existují 3 hlavní fenotypy: haptoglobin 1-1, 1-2, 2-2. Aktivita klesá podle pořadí výše. 1-1 je biologicky nejaktivnější, nejlépe ze všech váže hemoglobin uvolněný při zánětlivé reakci (Sadrzadeh and Bozorgmehr, 2004). Referenční mez haptoglobinu pro dospělé je u fenotypu 1-1 0,77-1,94 g/l, u fenotypu 2-1 0,32-1,84 g/l a u fenotypu 2-2 0,15-1,49 g/l (Masopust, 1998). Haptoglobin, který vyváže hemoglobin na svůj povrch, vyvazují makrofágy díky znaku CD136. Tyto buňky dále hemoglobin metabolizují (Hvidberg, et al. 2005).

4.1.2 Mechanismus působení

Mezi primární poškození volným hemoglobinem patří toxicita vůči endotelu kapilár. Toxické působení je vedeno dvěma cestami. První cesta poškození je způsobena globin degradačními produkty. Druhá cesta se týká poškození modifikovanými lipoproteiny (Schaer, et al. 2013). Během jedné studie bylo zjištěno, že haptoglobin nejen vyvazuje hemoglobin, ale také působí výrazně antioxidantně in vivo. Zabraňuje vzniku železem stimulovaných radikálů (Gutteridge, 1987).

4.1.3 Stanovení

Haptoglobin stanovíme imunochemickými metodami pomocí zákalových metod s monoklonální či polyklonální protilátkou. Známe 3 fenotypy haptoglobinu, proto musíme použít sety a výsledky interpretovat podle pokynů od výrobce (Masopust, 1998).

4.2 Hemopexin

Tato plasmatická bílkovina vykazuje nejvyšší afinitu k hemu. Hlavní funkcí hemopexinu je vázat volný hem, aby nedošlo k tvorbě volných radikálů, které by mohly dále reagovat s buněčnými strukturami. Nejnebezpečnější je vznik hydroxylového radikálu ve fosfolipidových membránách. Jedná se o nejdůležitější transportní protein v plasmě pro transport hemu. Na svém povrchu má specifický receptor, který umožňuje velice pevnou vazbu (Tolosano and Altruda, 2002). Stanovujeme jej pomocí imunochemických metod, například ELISA (Oh, et al. 2016).

4.2.1 Protein vázající hem

Tento protein najdeme nejen v buňkách krevního řečiště, ale také v mozko-míšním moku. Protein vázající hem byl objeven na buňkách, jako jsou například makrofágy, hepatocyty či neurony. Má charakter lipoproteinového receptoru. Hemopexin vyváže hem a poté je sám vázán na speciální receptor, ke kterému má vysokou afinitu (Hvidberg, et al. 2005).

Byla provedena studie, při níž byl komplex hemopexin-hem označen radioaktivním izotopem. Takto připravený materiál byl přidán ke kultivovaným monocytům. Vhodnými zobrazovacími metodami na principu konfokální mikroskopie byla pozorována interakce mezi tímto komplexem a monocyty. Byla zpozorovaná podobná clearance jako u komplexu hemoglobin-haptoglobin. Hemopexin-hem komplex byl vychytáván díky znaku CD91 na monocytech (Hvidberg, et al. 2005).

4.2.2 Hemopexin a periferní nervová tkáň

Hemopexin může být tvořen i poškozenými nervovými buňkami, kde napomáhá jejich reparaci. Ve Schwannových buňkách a fibroblastech nalezneme mRNA kódující tento protein. Vytvořený hemopexin se kumuluje v extracelulárním prostoru. Byla provedena studie, při které byla sledována regenerační schopnost hemopexinu v nervové tkáni. Bylo zjištěno, že se koncentrace hemopexinu výrazně zvyšuje během

prvních 2 dní a poté rychle klesá, na rozdíl od plasmatického hemopexinu, který klesá postupně (Madore, et al. 1999).

4.3 Ceruloplasmin

Ceruloplasmin je další velice důležitý protein akutní fáze (Golenkina, et al. 2017). In vitro byl zkoumán účinek ceruloplasminu při zánětlivé reakci. Bylo zjištěno, že polymorfonukleáry při reakci akutní fáze adherují na endoteliální buňky. K adhezi potřebují molekuly ceruloplasminu. Tímto však funkce tohoto proteinu nekončí. Během interakce polymorfonukleárů s endotelem vznikají velice nebezpečné hydroxylové radikály, které přítomný ceruloplasmin redukuje a tím inaktivuje. V buňkách endotelu sice najdeme superoxidodismutázu, ale této reakce nebyla prokázána spoluúčast. Polymorfonukleáry adherují na endoteliální buňky, aby mohly prostoupit blíže k zánětu a působit v místě poškození. Adherační schopnosti ovlivňují další zánětlivé proteiny jako je IL-24 a leukotrien B4 (Broadley and Hoover, 1989).

Ceruloplasmin má strukturu 2a-globulinu (Schoslnsky, et al. 1974). Skládá se z 1046 zbytků aminokyselin, dále má 4 místa pro navázání oligosacharidových zbytků. Celková molekulová hmotnost ceruloplasminu je 132 kDa (Takahashi, et al. 1984).

4.3.1 Stanovení

Stanovení koncentrace a aktivity ceruloplasminu je důležité pro diagnostiku chorob. Mezi nejdůležitější patří Wilsonova choroba a Mankešův syndrom. Dále se využívá jako marker akutní fáze. Byla vyvinuta jednoduchá a snadno automatizovatelná metoda ke stanovení ceruloplasminu (Schoslnsky, et al. 1974).

Dříve se používala složitější metoda, která vyžadovala čištění substrátu. Pro zjednodušení a k automatizaci byla vyvinuta metoda se substrátem o-dianisidin dihydrochloridem. Měří se aktivita ceruloplasminu po přidání substrátu. Tento substrát již nevyžaduje další čištění a je dodáván ve vodném roztoku. V přítomnosti ceruloplasminu a kyslíku dojde ke vzniku žlutohnědého produktu. Reakce běží při pH 5. Pro zastavení reakce je nutné roztok okyselit. Produkt změní barvu v purpurově červenou. Roztok měříme při 520 nm (Schoslnsky, et al. 1974).

Dodnes se využívá metoda s o-dianisidin dihydrochloridem. Využívá se oxidační schopnosti mědi. Tato metoda je mnohem citlivější než imunochemické metody, proto ji

používáme pro stanovení ceruloplasminu u Wilsonovy choroby a při sledování účinnosti léčby (Stepien and Guy, 2017).

4.3.2 Ceruloplasmin a těhotenství

Enzymatická aktivita ceruloplasminu odráží koncentraci mědi v séru pacienta. Dále se předpokládá, že není ovlivněna hormony či pohlavím. Proto byl ceruloplasmin využit jako základní analyt u jedné ze studií, kde byly sledovány těhotné ženy a ženy, které neužívají hormonální antikoncepci, ale těhotné nejsou. Byl sledován poměr mědi/aktivitě ceruloplasminu. U těhotných žen byla nalezena vyšší koncentrace mědi i ceruloplasminu. Závěrem bylo řečeno, že během těhotenství dochází ke zvýšené syntéze ceruloplasminu tzn. zvýšení sérové koncentrace mědi. Postupně se ale snižuje oxidázová aktivita, která značí postupné vyčerpání zásob (Louro, et al.2001).

4.4 Ferritin

Tato bílkovina je úzce spjata s metabolismem železa. Železo jako takové je bezpodmínečně důležité pro organismus, ale pokud je uvolněný v plasmě, může způsobovat tvorbu volných radikálů. Proto buňky získávají železo, které je dopravováno transportními bílkovinami, nejčastěji transferinem. Většina železa vázaného na transferin je využita pro syntézu hemoglobinu (Ponka, et al. 1998). Mechanismus ukládání železa ve ferritinu či transferinu si vyvinuli všechny organismy včetně bakterií a vyšších rostlin. Z toho vyplývá, že železo má nezastupitelnou roli ve všech živých organismech (Boyer, 1986).

4.4.1 Molekula ferritinu

Feritin slouží jako protein nesoucí zásobní železo (Ponka, et al. 1998). Tato bílkovina je schopna navázat až 4500 molekul Fe^{3+} . Proteinová složka je nazývána apoferritin. Skládá se z 24 polypeptidových jednotek, které mají stejnou strukturu. Molekuly železa jsou zde v rozpustném stavu, aby bylo možné je snadno použít (Crichton, 1973). Molekula feritinu se skládá z podjednotek lehkých a těžkých (Curtis, et al. 2001). V molekule jsou kanály, které vedou z povrchu do centra molekuly. Byly zde objeveny 2 typy kanálů. 6 kanálů má na svém vnitřním povrchu hydrofobní zbytky a dalších 8 je lemováno hydrofilními zbytky. Předpokládá se, že uspořádání kanálů má hlavní funkci při ukládání a vylučování železa (Boyer, 1986).

4.4.2 Ferooxidázová aktivita

Apoferitin katalyzuje oxidaci Fe^{2+} na Fe^{3+} . Fe^{3+} je poté možno zabudovat do molekuly transferinu či ferritinu. Rychlost oxidace závisí na koncentraci Fe^{2+} a apoferitinu. Jedná se o první reakci v procesu vyvázání volného železa. Inhibitorem ferooxidázové aktivity apoferitinu je Zn^{2+} (Boyer, 1986).

4.4.3 Regulace koncentrace ferritinu a transferinu

Příjem železa buňkou je regulován zpětnou vazbou na úrovni posttranskripčních mechanismů pomocí proteinů 1 a 2. Pokud je nedostatek železa v buněčných strukturách, dochází k navázání těchto proteinů na vhodné části molekuly mRNA, aby došlo k translaci transferinu. Pokud je situace opačná, tyto proteiny se navazují na opačné konce, aby došlo k syntéze ferritinu, který přebytečné železo vyloučí. Takto udržíme hladiny železa v ideální koncentraci pro správnou funkci organismu (Theil, 1990).

Během chronického zánětu dochází k vzniku anemie způsobené nedostatkem železa. Tato komplikace onemocnění je způsobena především zvýšenou tvorbou ferritinu. Ferritin je tvořen na základě stimulace cytokiny v játrech, které jsou během chronického zánětu syntetizovány dlouhodobě (Feelders, et al. 1998).

4.4.4 Vazba železa

Volné železo způsobuje reakci s kyslíkem vznik volných radikálů, které kaskádovitě poškozují buňky. Existuje velké množství reparačních procesů zabraňujících této reakci. Jednou z nich je i ferritin (Theil, 1990). Vratná přeměna železa z pevného hydrátu oxidu železa způsobuje možnost nápravy reaktivních forem kyslíku a detoxikuje volné železo (Theil, 2003).

4.5 Hepcidin

Hepcidin je bílkovina, která je tvořena u pacientů při infekčních onemocněních, zánětech a dlouhodobém zatížení železem. Je tvořen v játrech a vylučován močí. U výše vyjmenovaných skupin pacientů byl nalezen ve zvýšeném množství v moči. Protein byl zkoumán in vitro a bylo nalezeno, že jeho tvorbu stimuluje IL-6, ale IL1 a TNF nikoli, což znamená, že jej řadíme mezi druhé reaktanty akutní fáze. Byla zjištěna souvislost mezi hepcidinem a anemií, v zánětlivém onemocnění (Torti, et al. 2002).

Hepcidin má mnoho funkcí. Snižuje vstřebávání železa v tenkém střevě, ale upřednostňuje jeho využití po recyklaci z makrofágů. Během vývoje plodu transportuje železo přes placentu (Torti, et al. 2002). Na buňkách enterocytů, placenty a hepatocytů nalezneme přenašeč železa tzv. ferroporting. Po navázání hepcidinu na tento přenašeč dochází k jeho degradaci a tím se zastavuje vylučování železa z dané buňky. Koncentrace hepcidinu je regulována koncentrací sérového železa a hepcidin reguluje koncentraci železa v buňce vyvázáním přenašeče (Nicolas, et al. 2002).

4.5.1 Recyklace železa

Tento proces probíhá během regulace plasmatické koncentrace železa. Transferin transportuje železo k buňkám, předá jim jej a zpět odebere přebytek. Tento přebytek přenáší do makrofágů, ti jej dále metabolizují (Ponka, et al. 1998).

4.5.2 Stanovení

Během studie byly použity především imunochemické metody. U pacientů byly stanoveny hodnoty krevního obrazu v laboratoři a poté byl proveden močový hepcidin test, pomocí protilátky a následným blotováním (Torti, et al. 2002).

5 BÍLKOVINY PŮSOBÍCÍ PROTI KOLATERÁLNÍMU POŠKOZENÍ TKÁNĚ

Tyto bílkoviny se nazývají serpiny a jejich úkolem je regulace imunitní reakce. Působí proti aktivaci komplementu, aktivaci koagulační kaskády atd. Všechny tyto inhibitory vykazují homologii s α -1 antitrypsinem z 30 %. Terciární struktura je u všech těchto proteinů stejná. Jedná se o 3 β skládané listy s reaktivní smyčkou, která představuje pseudosubstrát pro cílové proteázy. Pokud zde dojde k navázání cílového proteinu, dojde k jeho uzavření (tzv. „past na myši“). Poté je bílkovina rozpoznána jaterními receptory a odstraněna z oběhu. Takto uspořádané molekuly jsou vysoce náchylné ke změnám ve struktuře molekuly, bodovým mutacím, popřípadě vložení smyčky z jiného typu serpinu (Lomas, et al. 2002).

Serpiny jsou součástí imunity všech savců. Jejich nejdůležitější vlastností je schopnost vyvazovat volné proteázy a tím ochraňovat organismus před poškozením tkání. Proteázy během zánětu zvyšují virulenci. Proteázy vytvořené organismem samotným či parazitem způsobují silná poškození tkání, proto je nutné jejich působení regulovat (Armstrong and Quigley, 1999).

5.1 α -1 antitrypsin

Nejdůležitější funkcí α -1 antitrypsinu je ochrana plic před působením neutrofilní elastázy. Tento protein je tvořen v játrech, ale místo hlavního působení jsou plíce (Stoller and Aboussouan, 2005). Více než 20 alel přispívá k polymorfismu této proteázy. Většina alel udržuje normální koncentraci α -1 antitrypsinu v plazmě. Alela PIZ však způsobuje sníženou pohyblivost při elektroforéze a sníženou koncentraci α -1 antitrypsinu v séru. Substituce aminokyseliny v řetězci, nedostatek kyseliny sialové či změna struktury polysacharidového řetězce způsobuje atypickou mobilitu v elektroforetickém gelu (Jeppsson, 1976).

5.1.1 Vrozený deficit α -1 antitrypsinu

Jedná se o velice vzácné onemocnění, způsobené poškozením genetické informace. Při tomto onemocnění dochází k poškození, které může vyústit až v rozedmu plic. Onemocnění se charakterizuje jako chronické obstrukční onemocnění plic. Nemoc přechází dále v chronické onemocnění jater. Historicky bylo první stanovení diagnózy r.

1854. Vzorek byl zkoumán elektroforetický a byla zaznamenána absence proužku v zóně $\alpha 1$ sérových proteinů (Stoller and Aboussouan, 2005).

5.1.2 Clearance α -1 antitrypsinu

Stanovení vylučované bílkoviny se provádí podáním značených molekul a poté sledováním jejich úbytku v organismu a přítomností v moči či stolici. Byla objevena snadnější a levnější metoda, která využívá fekální clearance α -1 antitrypsinu. Ve výkalech a v krvi se radiální imunodifúzí měří koncentrace této bílkoviny. Nakonec se provádí přepočet a výsledek je uveden jako clearance. Bylo provedeno srovnání metody clearance a metody, kde byly plasmatické bílkoviny značeny izotopem ^{51}Cr . Byla zjištěna významná korelace mezi těmito dvěma metodami. Závěr srovnání metod byl, že provedení clearance je významně levnější a jednodušší metodou monitorování ztrát proteinů vylučovacím systémem (Florent, et al. 1981).

5.1.3 Glykosylace α -1 antitrypsinu

Glykosylací proteinů získáme stabilnější obtížně lyzovatelné a méně reaktivní sérové proteiny. Pro mnohé bílkoviny výhodná úprava molekuly je pro inhibitory proteáz nevhodná. Bylo zjištěno, že po glykosylaci těchto molekul ztrácí svou biologickou aktivitu. Nestabilita molekuly je nezbytná pro její správnou funkci. Glykosylace α -1 antitrypsinu na třech místech této molekuly ji plně stabilizuje. Tato molekula ztrácí ochrannou funkci v séru (Sarkar and Wintrode, 2011).

5.2 α -1 antichymotrypsin

Jedná se o specifickou antiproteázu. Reparační proces je zatím neznámý. Ale byl prokázán značný antiapoptický efekt, stejně jako u celé řady dalších inhibitorů proteáz. Tyto molekuly ochraňují buňky hladkého svalstva a cév před nástupem apoptózy (Ikari, et al. 2001). Granulocyty vykazují podobnou aktivitu jako chymotrypsin. α -1 antichymotrypsin vykazoval vysokou afinitu vůči proteinům granulocytů. Vzniklý komplex proteinu a α 1-antichymotrypsinu migruje v agarózovém gelu jako molekula β globulinu (Ohlsson and Åkesson, 1976).

5.2.1 Chronická obstrukční plicní nemoc

Mutace genu, kódujícího pořadí aminokyselin v bílkovině α 1-antichymotrypsin vede k onemocnění zvanému chronická obstrukční plicní nemoc. Jedná se o postupné poškozování plic, které může vést v krajních případech až ke smrti. Toto onemocnění

způsobuje výše zmíněná mutace, ale také velký podíl na onemocnění má kouření cigaret. Antichymotrypsin (typ IX) váže katepsin G z žírných buněk. IX-antichymotrypsin produkují játra a plicní makrofágy. Deficit tohoto ochranného proteinu má za následek proteolytické poškození plic, s následnou ztrátou elasticity a snížením kapacity plic (Sandford, et al. 1998).

5.2.2 Alzheimerova choroba

Jedná se o chronické onemocnění, které je způsobeno usazováním amyloidů v mozku, včetně α -1 antichymotrypsinu. Během studie bylo prokázáno, že α -1 antichymotrypsin podporuje usazování plaků na astrocytech. Tyto usazeniny poté způsobují chronické zánětlivé onemocnění (Yamin, et al. 1999).

5.3 α -1 kyselý glykoprotein

Jedná se o běžný sérový protein, který nalezneme v séru v přibližné koncentraci 650 ng/ml. Lze jej považovat za reaktant akutní fáze, protože jeho koncentrace se zvyšuje během zánětu či rakovinného bujení až 5x. Jedná se o glykoprotein, na jehož řetězci nalezneme vysoce polární kyselinu sialovou, která je důležitá pro funkci tohoto glykoproteinu. Bylo zjištěno, že působí jako inhibitory reaktivity lymfocytů, již při blastogenezi. Dále inhibují agregaci destiček vyvolanou ADP a adrenalinem. Bylo zjištěno, že během chronických onemocnění dochází k absenci kyseliny sialové v molekule kyselého glykoproteinu (Costello, et al. 1979).

V jedné studii byla snaha popsat mechanismus, jakým dojde k aktivaci transkripce kyselého glykoproteinu. Zjistili, že cytokiny a glukokortikoidy jsou schopny aktivovat tuto transkripci. Bylo zjištěno, že nukleární faktor pro IL-6, který je transkripčním faktorem pro IL-6, nejsilněji podporuje tvorbu kyselého glykoproteinu. Dále byl pozorován mechanismus, když reakcí dvou proteinů byla spuštěna transkripce kyselého glykoproteinu. Kyselý glykoprotein kódovaný DNA na svém 5' konci nese místo, které je citlivé k signálu od cytokinů a počne transkripce kyselého glykoproteinu (Nishio, et al. 1993).

5.4 α -2 makroglobulin

α -2 makroglobulin inhibuje v séru pam-proteázu, jejíž vysoká koncentrace způsobuje Alzheimerovu chorobu. Udržování stálé koncentrace pam-proteázy se provádí pomocí clearance a degradace. Tento makroglobulin je kódován genem A2M.

Jeho delece způsobuje zvýšené riziko pro vznik Alzheimerovy choroby. Tato mutace se dále dědí v potomstvu (Tanzi, et al. 1998). α -2 makroglobulin je širokospektrá bílkovina vázající proteázy. Tyto proteázy vyvazuje z tělních tekutin. Ty jsou dále přeneseny do lyzozomů degradujících buněk (Armstrong and Quigley, 1999).

Receptorem zprostředkovaná endocytóza α -2 makroglobulinu může být inhibována pomocí mnoha chemických sloučenin, které inhibují transglutaminázu. Dále bylo zjištěno, že receptor pro zesílení je důležitým faktorem pro endocytózu (Davies, et al. 1980). Receptor pro α -2 makroglobulin je charakteru lipoproteinu o nízké hustotě. Vazbou na tento receptor dojde k vyvázání komplexu α -2 makroglobulin–proteináza z plazmy. Dále existují dvě cesty degradace tohoto komplexu. První možností je degradace ligandů v játrech. Další možností je schopnost degradovat ligandy tohoto serpinu přímo v některých orgánech jako je například mozek (Moestrup, et al. 1992).

5.5 Inhibitor C1

Inhibitor C1 je jediným známým inhibitorem složky komplementu C1. Dále byla zkoumána ochranná funkce tímto proteinem a bylo zjištěno, že po mozkové příhodě inhibitor C1 esteráza velice rychle způsobuje nápravu ischemických buněk mozku a tím snižuje poškození (De Simoni, et al. 2003).

Inhibitory C1, C1r a C1q jsou komplexem inhibitorů působící proti aktivaci komplementové kaskády. Inhibitor C1 může inhibovat MBL či MASP 1-3. Pro své široké využití byl od roku 1970 používán čištěný inhibitor C1 jako léčivo u pacientů s vrozeným angioedémem. Jeho širší užití při léčbě zánětů, akutních infarktů myokardu a dalších se zdá být neúspěšné, z důvodu potřeby vysoké dávky tohoto proteinu. Dále bylo zjištěno, že v přítomnosti heparinu má vyšší účinnost. Nejúčinnější je však dextran sulfát. Dextranulfát zvyšuje účinnost inhibitoru C1 in vivo až 60krát. Avšak komplex dextranulfát-inhibitor C1 jsou velice brzy vyloučeny (Bos, 2002).

5.5.1 Struktura

Jedná se o bílkovinu skládající se ze 478 aminokyselin. Molekula je dále silně glykosylována až z 30 % (hmotnostních). Na N konci je N terminální struktura, jejíž funkce nebyla zatím zcela objasněna. Dále v molekule najdeme dva disulfidické můstky. Mezi determinantami N a C. N determinanta pravděpodobně hraje roli v clearance inhibitoru C1. Dále se v této oblasti nalézají nejvíce glykosylačních molekul.

Inhibiční kapacita může být rozšířena pomocí glykosaminoglykanů. Ale není známo, zda k tomu dochází v N determinantě (Bos, 2002).

5.5.2 Inhibiční kapacita

Kapacita je dána schopností vyvázat proteázy podle principu typického pro serpiny. Vazba vyžaduje správnou polohu reaktivní smyčky a vhodnou asociační konstantu, která udává míru závažnosti proteázy. Proteáza musí být vložena velice rychle do smyčky centrálního B listu. Dochází k rychlému dokončení zafixování molekuly pomocí hydrolyzace argininu v poloze 444. Udržení proteázy je určeno disociační konstantou. Proteáza, která má vysokou konstantu udávající míru závažnosti a vysokou disociační konstantu, je vhodná k využití jako substrát (Bos, 2002).

5.5.3 Deficit inhibitoru C1

Deficit inhibitoru C1 je charakteristický opakovaným angioedémem. Jedná se o dědičné onemocnění. Dochází k syntéze poškozeného inhibitoru či poškození transkripce tohoto proteinu. Klinickým obrazem je nízká sérová koncentrace inhibitoru C1 či snížená funkce a nízká koncentrace inhibitoru C4. Tyto deficity mohou způsobit až fatální otok hrtanu. Akutně lze podat dávku inhibitoru C1 (Gompels, et al. 2005).

Poprvé byl v roce 2000 popsán angioedém, který nebyl způsoben deficitem inhibitoru C1. Jedná se o nové dědičné onemocnění. Angioedém při normální koncentraci inhibitoru C1 je dále zkoumán a hledá se příčina tohoto onemocnění (Zuraw, et al. 2012).

5.5.4 Mutace

Jsou možné 3 typy mutací, které jsou rozdělené do tříd. První třída zahrnuje takové molekuly, jež vedou ke změně expozičního místa. Do druhé třídy patří molekuly, které mají chybně uložené reaktivní místo. Tyto molekuly mohou sloužit pouze jako substrát. Třetí třída zahrnuje latentní molekuly, které váží smyčkou sebe či jiné molekuly (Bos, 2002).

5.6 Antitrombin

Antitrombin lze zařadit mezi markery zánětu proto, že zánět a koagulace jsou velmi úzce spjaty. Zánětem indukovaná koagulace má působit proti mikrobiálnímu agens. Přehnaná koagulační reakce může vést ke vzniku trombu a rozvinutí trombotických

stavů. Velice komplikovaným případem je vznik trombózy na aterosklerotickém plaku, který je sám o sobě chronickým zánětlivým ložiskem. Antikoagulační proteiny, které by se navázaly na mononukleární či endotelové buňky ty mohou spustit tvorbu cytokinů (Robson, et al. 1990). Bylo zjištěno na myších modelech, že odštěpený antitrombin má značné protinádorové účinky díky inhibici vzniku cév v nádoru (Lee, et al. 1998).

Heparin je aktivátorem antitrombinu. Oba jsou zásadními regulátory koagulace. Heparin indukuje konformační změny ve struktuře antitrombinu, tím jej aktivuje. Aktivovaný antitrombin je schopný vyvézt aktivovaný faktor X, za vzniku komplexu (Olson, 2002). Deficit antitrombinu a dalších antikoagulačních faktorů způsobuje trombofilní stavy. Především během těhotenství, porodu a šestinedělí je riziko vzniku trombóz vysoké (Montagud, et al. 1993).

5.6.1 Struktura

Molekula antitrombinu má charakter dimeru, kdy jedna molekula antitrombinu je aktivní a druhá je latentní. Latentní molekula má aktivní smyčky začleněny na konci β listů (Carrell, et al. 1994).

5.6.2 Funkce antitrombinu

Heparin nalezneme nejen na endotelu cév, ale lze jej užívat jako léčebný prostředek při trombofilních stavech. Jedná se o sulfátový polysacharid. Heparin se váže na antitrombin, čímž 300krát zvýší jeho inhibiční aktivitu. Protože navázáním heparinu dojde ke konformačním změnám na antitrombinu a zvýší afinitu vůči faktoru X. antitrombin, stejně jako všechny serpiny má reaktivní smyčku, která bez aktivace heparinem slouží jako substrát pro ostatní proteázy. Štěpením antitrombinu proteázou dojde k přesunutí smyčky do centra β listu. Tato konformace je latentní (Thunberg, et al. 1982). Heparin štěpí karboxylové konce na smyčce antitrombinu (Lee, et al. 1998).

5.7 Inhibitor aktivátoru plazminogenu 1

Tento protein je hlavním inhibitorem bílkoviny aktivující plazminogen. Aktivní forma spontánně přechází v latentní. Dále je známa také forma substrátu, který je štěpen enzymy, ale netvoří stabilní komplexy. Účinkuje nejen na hemostázu, ale v mnoha jiných procesech, které jsou závislé na aktivaci plazminogenu či plazminu (Lijnen, 2005). Dále napomáhá remodelaci tkání, které prochází hojícím procesem a zároveň reguluje rozpad krevní sraženiny (Sharp, et al. 1999).

Organismus má schopnost rozpouštět sraženinu. V plasmě koluje neaktivní proenzym plazminogen, který je aktivován na plazmin. Plazmin je aktivní forma schopná rozpouštět fibrinové vlákno za vzniku fibrin degradačních produktů. Inhibitor aktivátoru plazminogenu je důležitý regulátor tohoto mechanismu (Lijnen, 2005). Tento inhibitor působí na tkáňový i urokinázový plazminogen (Sharp, et al. 1999).

Poruchy fibrinolytických funkcí organismů jsou spojené především s vysokou koncentrací inhibitoru. Tyto stavy nalézáme běžně u pacientů s trombotickou chorobou. Regulace koncentrace inhibitoru není dodnes zcela zřejmá (Lijnen, 2005).

Trvale zvýšená koncentrace inhibitoru vede ke zvýšenému riziku vzniku infarktu myokardu. Dále vede ke vzniku aterosklerotických plátů v tepnách. Podáním inhibitoru aktivátoru angiotenzin konvertujícího enzymu dochází ke snížení rizika návratu infarktu (Vaughan, et al. 1995).

5.7.1 Vliv na nádorové onemocnění

Tento serpin má také nezastupitelnou úlohu při adhezivních vlastnostech buněk, které prochází přestavbou při nádorovém bujení a při zabudování metastáz. Působí jako podpůrný protein pro tvorbu nádorů. Tato funkce je spjata s vitronektinem. Jedná se o adhezivní glykoprotein. Aktivovaný inhibitor je metastabilní a spontánně přechází do latentní konformace. Zvýšená koncentrace inhibitoru odpovídá přítomnosti metastáz. Dochází k soutěži o vazebné místo mezi urokinázovým plazminogenem s vitronektinem. Během pokusu s myši byl odstraněn z genetického kódu gen kódující tento inhibitor a tím došlo k inhibici rozšiřování nádoru a vzniku cévního zásobení (Sharp, et al. 1999).

5.7.2 Struktura

Celková struktura tohoto inhibitoru je totožná s ostatními serpiny. β skládaný list se smyčkou je umístěn na jednom konci protáhlé molekuly. Při štěpení molekuly či při tvorbě její latentní struktury dochází k nečekaným změnám konformace (Nar, et al. 2000).

6 MEDIÁTORY ZÁNĚTLIVÉ REAKCE

6.1 Resolvin

Resolvin jsou speciální mediátory akutního zánětu. Molekula má charakter lipidu (Ohira, et al. 2010). Resolvin E1 (RvE1) je speciální molekula odvozená od omega-3 kyseliny eikosapentaenové. RvE1 působí jako protizánětlivý mediátor. Vzniká během rozlišování fáze zánětu. Jejich funkce spočívá především v regulaci migrace granulocytů mezi endoteliálními buňkami (Albert, et al. 2002). Tato molekula zlepšuje fagocytózu apoptických neutrofilů (Ohira, et al. 2010).

6.1.1 Způsob interakce

Byla objevena signální dráha, která způsobuje interakci granulocytu s mediátorem. Počíná reakcí RvE1 se specifickým receptorem ChemR23. Po navázání dochází k stimulované fosforylaci, na níž je vazba mezi receptorem a mediátorem závislá. Cílovým proteinem je translační regulátor S6. Během fosforylace, může dojít k inhibici fosforylace a tím narušení interakce (Ohira, et al. 2010).

6.2 Leukotrieny

Leukotrieny jsou molekuly odvozené od kyseliny arachidonové, ze které vznikají cyklooxygenací. Pokud je metabolizována pomocí lipoxygenázy, vznikají mono-, di- a trihydroxeikosatetraenoické kyseliny (HETES). HETES jsou velice důležité pro chemotaktické a chemokinetické vlastnosti leukocytů zvláště neutrofilů a eozinofilů. Studie prokázala, že agregace leukocytů a jejich aktivace není způsobena mono-hetes ale molekulou leukotrienu B (Ford-Hutchinson, et al. 1980). Leukotrieny byly poprvé nalezeny v leukocytech, proto je jejich název odvozen od leukocytů. Zvyšují adhezi leukocytů k endotelu a aktivují je. Působí během akutního zánětu (Samuelsson, 1983).

Podáním protizánětlivých nesteroidních léčiv je možné zastavit jejich syntézu a biologickou aktivitu. Receptorem pro tyto molekuly je receptor G-protein. Zde se uplatní regulační schopnosti organismu, protože na tento protein mohou působit antagonisté (Weggen, et al. 2001). Adrenalin noradrenalin a dopamin zabraňují vylučování leukotrienů, ale naopak podporují vylučování prostaglandinu. Katecholaminy jsou kofaktory antioxidantů, které způsobují redukci oxidovaných molekul, především železa, a tím zabraňují anafylaxi tkání, dále snižují poměr leukotrien/prostaglandin (Parantainen, et al. 1990).

6.2.1 Leukotrien B4

Jedná se o prozánětlivý mediátor, který je syntetizovaný v myeloidních buňkách. Jeho syntéza je katalyzována enzymy 5-lipoxygenázou a leukotrien A4-hydrolázou. Leukotrien B4 indukuje aktivaci neutrofilů, monocytů a eozinofilů. Dalším krokem je tvorba prozánětlivých faktorů a cytokinů, kteří mají za úkol prodloužit zánětlivou reakci. Na membráně myeloidní buňky je receptor 5-lipoxygenáza aktivující protein. Tento je kofaktorem výše zmíněnému enzymu (Crooks and Stockley, 1998).

6.3 Prostaglandiny

Prostaglandiny jsou chemicky eikosanoidy, které jsou tvořeny z kyseliny arachidonové pomocí prostaglandin H syntetázy (PGHS). Spolu s tromboxany jsou odpovědné za modulaci tonu cév. PGHS je specifický enzym, který ovlivňuje rychlost syntézy prostaglandinů a tromboxanu. Pokud dojde k vazokonstrikci simulované prekurzorem tromboxanu, tento děj není závislý na PGHS. K tomuto dochází při patologických stavech v mozku či plicích. Mechanismus působení PGHS je velmi důležitý pro použití protizánětlivých léčiv. Nesteroidní protizánětlivá léčiva například aspirin či ibuprofen působí právě na tento děj (Smith, et al. 2000).

Prostaglandiny působí v cévách především vasodilatačně. Nejvíce jej nalezneme na endotelu cév. Po stimulaci IL-1 dochází k simulaci endoteliálních buněk pupečnickové žíly k tvorbě prostaglandinů (Camacho and Vila, 2000). Pokud dochází k vystavení organismu například oxidačnímu stresu či jiné patologii dochází k poškození syntézy prostaglandinů. Nyní musí dojít k PGHS-dependentní vasodilataci (Chataigneau, et al. 1999).

6.3.1 Syntéza prostaglandinů

Nejprve musí být uvolněn arachidonát z fosfolipidové membrány pomocí fosfolipázy. Na arachidonát působí PGHS. Připojením O_2 pomocí PGHS vzniká prostaglandin G_2 . Nyní působením enzymu peroxidázy vzniká PGHS-2. Dalšími úpravami například isomerací vzniká metabolicky aktivní prostacyklin či tromboxan. Enzym PGHS je systematicky zařazen jako prostaglandin endoperoxid syntáza. Má 3 isoenzymy označené pořadovým číslem PGSH 1, 2, 3. Tento krok určuje rychlost samotné syntézy prostaglandinů. (Smith, et al. 2000).

6.3.2 Prostaglandin D

Tento mediátor ze skupiny prostaglandinů je odpovědný za vyvolání spánku a regulace změn vnímání bolesti během zánětu (Urade and Hayaishi, 2000).

6.4 Tromboxany

Nejenom destičky, ale také endoteliální buňky produkují tromboxany, které způsobují vazokonstrikci cév (Liou, 2000). Vznikají výše popsáním způsobem z kyseliny arachidonové (Smith, et al. 2000). Aby však došlo k tvorbě tromboxanu, musí být výrazně snížena tvorba prostacyklinů (Camacho and Vila, 2000). Struktura kruhového prostaglandinu endoperoxidu sama o sobě nestačí jako substrát pro vznik tromboxanu, záleží dále na nasycení uhlíkových řetězců, aby mohlo dojít k enzymatické reakci. Pokud jsou vhodné podmínky, působí na molekulu tromboxan syntetáza. Vznikají molekuly tromboxanu A2 a A3. Tromboxan A1 a jeho endoperoxidy takto syntetizován není. Tromboxany působí silně vazokonstrikčně a napomáhají agregaci destiček. K agregaci může dojít ale i bez působení tromboxanu (Needleman, et al. 1976).

6.5 Nekrotické buňky jako induktor zánětu

Buňky, u kterých byla smrt vyvolána nekrózou, vylučují do svého okolí protein, který se za fyziologických podmínek nachází v jádře. Jedná se o vysoce mobilní protein skupiny 1 (HGMB1). Tato bílkovina slouží v jádře ke stavbě histonů. Během nekrózy je vyloučena do okolí buňky. Imunitní systém jí rozpoznává jako nežádoucí a spouští kaskádu imunitních reakcí. Aktivace imunitního systému nenastává v případě, že dojde k apoptóze. Tato programovaná smrt buňky je doprovázená autolýzou, a proto nedojde k vylučování kompletních bílkovin do okolí (Scaffidi, et al. 2002).

7 BUNĚČNÉ SENZORY

7.1 NAD⁺-dependentní senzor SIRT1

Během akutního systematického zánětu jsou buňky přeprogramovány. Nejprve můžeme zaznamenat vysokou produkci ATP a zvyšuje se NADH. Toto je způsobeno glykolýzou. Poté dochází ke snižování hmotnosti mitochondrií a náhlému úbytku ATP. Dochází ke změně poměru ATP/AMP a NAD⁺/NADH. Nastává fáze útlumu a přeprogramování úloh v buňce. Snižuje se glykolýza, fosforylace a buňka se dostává do fáze klidu. Popisovaný mechanismus nalezneme v hepatocytech, makrofázích a buňkách kosterního svalstva. Redoxní změny, způsobené útlumem buněk byly pozorovány na buňkách kosterního svalstva myši. Zde byl nalezen senzor NAD⁺-dependentní senzor Redox SIRT1. Senzor SIRT1 pochází ze skupiny senzorů SIRT, první senzor byl pozorován u kvasinek a označen jako SIRT2, který je označován jako NAD⁺ senzitivní deacetyláza. Jeho funkce je tvořit heterochromatin. Lidský SIRT1 je velice podobný senzoru SIRT2, ale má jiné funkce. Tento senzor koordinuje epigenetické posuny během akutního zánětu a reguluje zánět na epigenetické úrovni. Dále ovlivňuje aktivaci komplementu a interleukinů. NAD⁺ je hybnou silou pro NAD⁺-dependentní senzor SIRT1. Skupina senzorů SIRT je odpovědná za metabolické a protizánětlivé účinky v závislosti změn NAD⁺ (McCall, et al. 2011).

7.2 Receptor P2X7

Tento receptor najdeme na membránách buněk především imunitního systému, makrofázích či myeloidních buněk. Tento receptor je aktivován přítomností extracelulárního ATP. Po jeho aktivaci dochází ke zpracování sekretovaných cytokinů a při reakci akutní fáze (Wiley, et al. 2011). Byla prokázána souvislost mezi aktivovaným receptorem P2X7 a chronickými bolestmi. Na tento receptor se soustředí nová analgetika, která působí antagonisticky (Karasawa and Kawate, 2016).

7.3 Rozpustné cytokinové receptory

Tyto receptory jsou velice důležité k regulaci průběhu zánětu. Brání především nadměrné imunitní odpovědi. Pro každý cytokin je znám specifický receptor, jehož přítomnost na membráně buněk způsobuje zesílení či zeslabení jeho účinků. Například IL-6 má specifický receptor s IL-6R, je syntetizován dvěma možnými cestami:

proteolytickým štěpením na membráně navázaného proreceptoru IL-6R, nebo může být syntetizován pomocí sestřihu a následnou syntézou IL z mRNA (Levine, 2004).

8 ZÁVĚR

V této bakalářské práci jsem se zabývala zánětem. Zánět lze rozdělit podle mnoha hledisek. Z časového hlediska na akutní a chronický, dle původce onemocnění na virový, bakteriální či mykózní. nakonec také zánět autoimunitní, který je v dnešní době velmi zkoumán. Dále lze zánět rozdělit, podle místa či orgánu, který je zasažen atd.

Mezi hlavní zánětlivé markery patří reaktanty akutní fáze, jejichž koncentrace se zvyšuje na začátku onemocnění. Podle koncentrací některých z nich lze již na počátku usoudit, zda se jedná o zánět bakteriálního či virového charakteru. Dále sem patří protilátky, které během průběhu zánětu mění své složení, a tak pomocí nich lze monitorovat průběh. Dalšími důležitými bílkovinami jsou transportéry volného hemoglobinu, železa a mědi. Pokud by totiž tyto bílkoviny v organismu chyběly nastal by oxidační stres, který průběh onemocnění výrazně komplikuje. Velice důležitou složkou imunity jsou serpiny, které vyvazují volné proteázy a zabraňují celkovému poškození tkání. oproti těmto proteinům působí tzv. mediátory zánětlivé reakce, které naopak zvyšují reaktivitu molekul a snaží se co nejvíce bojovat s patogenem. Jejich reakce musí být umírněna těmito serpiny. Na konci jsem svou práci doplnila několika zajímavými buněčnými receptory.

Zánětlivá reakce je komplexní děj, zasahují do mnoha vědních oborů. Tato práce může být úvodem do této problematiky. Probíhající výzkum zánětlivých molekul přispívá k lepšímu pochopení souvislostí a k efektivnější léčbě.

CITOVANÁ LITERATURA

- Albert C.M., Campos H., Stampfer M.J., Meir, Ridker P.M., Manson J. E., Willett W.C., Ma J. "Blood Levels of Long-Chain N-3 Fatty Acids and the Risk of Sudden Death." *The New England Journal of Medicine*, 2002, 346, 15, s. 1113–1118. Retrieved March 21, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11948270>), ISSN 1533-4406.
- Armstrong P.B., Quigley J.P. "α2-Macroglobulin: An Evolutionarily Conserved Arm of the Innate Immune System." *Developmental & Comparative Immunology*, 1999, 23, 4, s. 375–390. Retrieved March 28, 2017 (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145305X9900018X>), ISSN 0145305X.
- Arredouani M.S., Kasran A., Vaanoirbeek J.A., Berger F.G., Bau mann H., Ceuppens J.L. "Haptoglobin Dampens Endotoxin-Induced Inflammatory Effects Both in Vitro and in Vivo." *Immunology*, 2005, 114, 2, s. 263–271. Retrieved February 21, 2017 (<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2567.2004.02071.x>) ISSN 0019-2805.
- Barbalat R., Lau L., Locksley R.M., Barton G.M. "Toll-like Receptor 2 on Inflammatory Monocytes Induces Type I Interferon in Response to Viral but Not Bacterial Ligands." *Nature Immunology*, 2009 10, 11, s. 1200–1207. Retrieved March 29, 2017 (<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ni.1792>) ISSN 1529-2908.
- Bartůňková J., Paulík M., Hrušák O., Smetana K., Šedivá A., Špísek R. Šprongl L., Vernerová E. *Vyšetřovací Metody v Imunologii*. 2nd ed. Praha : Grada 2011, s. 172. Retrieved February 6, 2017 (https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=37a-AgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA12&dq=imunochemické+metody+elisa&ots=Rm4F-Lwbjd&sig=YU4h6JcUwmQVWRzMjGfEaw1YScl&redir_esc=y#v=onepage&q=elisa&f=false) ISBN 978-80-247-7089-5.
- Black S., Kushner I., Samols D. "C-Reactive Protein." *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279, 47, s. 48487–48490. Retrieved February 8, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15337754>) ISSN 0021-9258.
- Bos I. "Structural and Functional Aspects of C1-Inhibitor." *Immunobiology*, 2002, 205, 4–5, s. 518–533. Retrieved March 27, 2017 (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S017129850470100X>) ISSN 01712985.
- Bakker R.F., Boyer G.R. "Iron Incorporation into Apoferritin. The Role of Apoferritin as a Ferroxidase". *The Journal of Biological Chemistry*, 1986, 140, 3, s. 13182–13188. Retrieved March 24, 2017 (<http://www.jbc.org/content/261/28/13182.short>) ISSN 1083-351X.
- Broadley C., Hoover R.L. "Ceruleplasmin Reduces the Adhesion and Scavenges Superoxide During the Interaction of Activated Polymorphonuclear Leukocytes with Endothelial Cells." *American Journal of Pathology*, 1989, 135, 4, s. 647–655. Retrieved February 23, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2552811>) ISSN 0002-9440.
- Camacho M., Vila L. "Transcellular Formation of Thromboxane A2 in Mixed

- Incubations of Endothelial Cells and Aspirin-Treated Platelets Strongly Depends on the Prostaglandin I-Synthase Activity.” *Thrombosis Research*, 2000, 99, 2, s. 0155–164. Retrieved March 22, 2017 (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0049384800002413>) ISSN 00493848.
- Carrell R.W., Stein E.P., Fermi G., Wardell R.M.. “Biological Implications of a 3 Å Structure of Dimeric Antithrombin.” *Structure*, 1994, 2, 4, s. 257–270. Retrieved March 28, 2017 (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969212600000289>) ISSN 09692126.
- Castell J.V., Gómez-Lechón M.J., David M., Andus T., Geiger T., Trullenque R., Fabra R., Henrich P.C. “Interleukin-6 Is the Major Regulator of Acute Phase Protein Synthesis in Adult Human Hepatocytes.” *FEBS Letters*, 1989, 242, 2, s. 237–239. Retrieved March 20, 2017 ([http://doi.wiley.com/10.1016/0014-5793\(89\)90476-4](http://doi.wiley.com/10.1016/0014-5793(89)90476-4)) ISSN 00145793.
- Cecilian F., Giordano A., Spagnolo V. “The Systemic Reaction During Inflammation: The Acute-Phase Proteins.” *Protein & Peptide Letters*, 2002, 9, 3, s. 211–223. Retrieved November 11, 2016 (<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=0929-8665&volume=9&issue=3&spage=211>) ISSN 09298665.
- Celer V., Celer V. ml. *Obecná Virologie*. Nucleus HK : Hradec Králové, 2010, s. 148. ISBN 978-80-87009-70-3.
- Costello M., Fiedel B.A., Gewurz H. “Inhibition of Platelet Aggregation by Native and Desialised Alpha-1 Acid Glycoprotein.” *Nature*, 1979, 281, 5733, s. 677–678. Retrieved March 13, 2017 (<http://www.nature.com/doi/10.1038/281677a0>) ISSN 0028-0836.
- Crichton R.R. “Structure and Function of Ferritin.” *Angewandte Chemie International Edition in English*, 1973, 12, 1, s. 57–65. Retrieved March 6, 2017 (<http://doi.wiley.com/10.1002/anie.197300571>) ISSN 0570-0833.
- Crooks S.W., Stockley R.A. “Leukotriene B4.” *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 1998, 30, 2, s. 173–178. Retrieved March 21, 2017 (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272597001234>) ISSN 13572725.
- Curry S., Mandelkow H., Brick P., Nick F. “Crystal Structure of Human Serum Albumin Complexed with Fatty Acid Reveals an Asymmetric Distribution of Binding Sites.” *Nature Structural Biology*, 1998, 5, 9, s. 827–835. Retrieved February 22, 2017 (<http://www.nature.com/doi/10.1038/1869>) ISSN 1072-8368.
- Curtis A.R.J., Fey C., Morris C.M., Bindoff L.A., Ince P.G., Chinnery P.F., Coulthard A., Jackson M.J., Jackson A.P., McHale D.P., Hay D., Barker W.A., Markham A.F., Bates D., Curtis A., Bum J. “Mutation in the Gene Encoding Ferritin Light Polypeptide Causes Dominant Adult-Onset Basal Ganglia Disease.” *Nature Genetics*, 2001, 28, 4, s. 350–354. Retrieved March 6, 2017 (<http://www.nature.com/doi/10.1038/ng571>) ISSN 10614036.
- Davies P.J., Davies D.R., Levitzki A., Maxfield F.R., Milhaud P., Willingham M.C., Pastan I.H. “Transglutaminase Is Essential in Receptor-Mediated Endocytosis of Alpha 2-Macroglobulin and Polypeptide Hormones.” *Nature*, 1980, 283, 5743, s.

- 162–167. Retrieved March 13, 2017
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6153122>) ISSN 0028-0836.
- Doumas B.T., Watson W.A., Biggs H. G. “Albumin Standards and the Measurement of Serum Albumin with Bromocresol Green.” *Clinica Chimica Acta*, 1971, 31, 1, s. 87–96. Retrieved February 22, 2017
(<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0009898171903652>).
- Epstein F.H., Gabay C., Kushner I. 1999. “Acute-Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation.” *New England Journal of Medicine*, 1999, 340, 6, s. 448–454. Retrieved February 17, 2017
(<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM199902113400607>) ISSN 0028-4793.
- Fearon K.C., Falconer J.S., Slater C., McMillan D.C., Ross J.A., Preston T. “Albumin Synthesis Rates Are Not Decreased in Hypoalbuminemic Cachectic Cancer Patients with an Ongoing Acute-Phase Protein Response.” *Annals of Surgery*, 1998, 227, 2, s. 249–254. Retrieved March 20, 2017
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9488524>).
- Feelders R.A., Vreugdenhil G., Eggermont A.M., Kuiper-Kramer P.A., van Eijk H.G., Swaak A.J. “Regulation of Iron Metabolism in the Acute-Phase Response: Interferon Gamma and Tumour Necrosis Factor Alpha Induce Hypoferraemia, Ferritin Production and a Decrease in Circulating Transferrin Receptors in Cancer Patients.” *European Journal of Clinical Investigation*, 1998, 28, 7, s. 520–527. Retrieved March 6, 2017 (<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2362.1998.00323.x>)ISSN 0014-2972.
- Festa A., Ralph D., Russell P.T., Steven M.H. “Elevated Levels of Acute-Phase Proteins and Plasminogen Activator Inhibitor-1 Predict the Development of Type 2 Diabetes.” *Diabetes*, 2002, 51, 4, s. 1131-1137. Retrieved March 28, 2017
(<http://diabetes.diabetesjournals.org/content/51/4/1131.short>).
- Florent C., L’Hirondel C., Desmazures C., Aymes C., Bernier J.J. “Intestinal Clearance of Alpha 1-Antitrypsin. A Sensitive Method for the Detection of Protein-Losing Enteropathy.” *Gastroenterology*, 1981, 81, 4, s. 77–80. Retrieved March 10, 2017
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6973500>) ISSN 0016-5085.
- Ford-Hutchinson A.W., Bray M.A., Doig M.V., Shipley M.E., Smith M.J.H. “Leukotriene B, "A Potent Chemokinetic and Aggregating Substance Released from Polymorphonuclear Leukocytes.” *Nature*, 1980, 286, 5770, s. 264–265. Retrieved March 21, 2017 (<http://www.nature.com/doi/10.1038/286264a0>) ISSN 0028-0836.
- Golenkina E., Livenskyi A., Viryasova G., Romanova Y., Sud’ina G., Sokolov A. “Ceruloplasmin-Derived Peptide Is the Strongest Regulator of Oxidative Stress and Leukotriene Synthesis in Neutrophils.” *Biochemistry and Cell Biology*, 2017, doi 10.1139/bcb-2016-0180. Retrieved February 23, 2017
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28177760>) ISSN 0829-8211.
- Gompels M.M., Lock R.J., Abinum M., Bethune C.A., Davies G., Grattan C., Fay A.C., Longhurst H.J., Morrison L., Price A., Price M., Watters D. “C1 Inhibitor Deficiency: Consensus Document.” *Clinical & Experimental Immunology*, 2005, 139, 3, s. 379–394. Retrieved March 24, 2017
(<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2249.2005.02726.x>) ISSN 00099104.

- Gutteridge J.M.C. “The Antioxidant Activity of Haptoglobin towards Haemoglobin-Stimulated Lipid Peroxidation.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1987, 917, 2, s. 219–223. Retrieved March 24, 2017 (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0005276087901251>) ISSN 00099104.
- Horii Y., Muraguchi A., Iwano M., Matsuda T., Hirayama T., Yamada H., Fujii Y., Dohi K., Ishikawa H., Ohmoto Y. “Involvement of IL-6 in Mesangial Proliferative Glomerulonephritis.” *Journal of Immunology*, 1989, 143, 12, 3949–3955. Retrieved March 11, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2592764>) ISSN 0022-1767.
- Hořejší V., Bartůňková J. 2013. *Základy Imunologie*. 5th ed. Praha: Triton, 2013, s. 330, ISBN 9788073877132.
- Hotamisligil G.S. “Inflammation and Metabolic Disorders.” *Nature*, 2006, 444, 7121, s. 860–867. Retrieved February 17, 2017 (<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature05485>) ISSN 0028-0836.
- Hvidberg V., Maniecki M.B., Jacobsen C., Højrup P., Møller H.J., Moestrup, S.K. “Identification of the Receptor Scavenging Hemopexin-Heme Complexes.” *Blood*, 2005, 106, 7, 2572–2579. Retrieved February 23, 2017 (<http://www.bloodjournal.org/content/106/7/2572.short?sso-checked=true>).
- Janeway C.A., Travers P., Walport M., Shlomchik M. 2001. *Immunobiology* 5th ed., Garland Science : New York, 2001, s. 910. Retrieved November 14, 2016 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27100/>) ISBN 0-8153-3642-X.
- Chataigneau T., Félétou M., Huang P.L., Fishman M.C., Duhault J., Vanhoutte P.M. “Acetylcholine-Induced Relaxation in Blood Vessels from Endothelial Nitric Oxide Synthase Knockout Mice.” *British Journal of Pharmacology*, 1999, 126, 1, s. 219–226. Retrieved March 22, 2017 (<http://doi.wiley.com/10.1038/sj.bjp.0702300>) ISSN 00071188.
- Ikari Y., Mulvihill E., Schwartz S.M. “Alpha 1-Proteinase Inhibitor, Alpha 1-Antichymotrypsin, and Alpha 2-Macroglobulin Are the Antiapoptotic Factors of Vascular Smooth Muscle Cells.” *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276, 15, s. 11798–11803. Retrieved March 11, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11096092>) ISSN 0021-9258.
- Jeppsson J.O. “Amino Acid Substitution Glu→Lys in α_1 -Antitrypsin PiZ.” *FEBS Letters*, 1976, 65, 2, s. 195–197. Retrieved March 24, 2017 (<http://doi.wiley.com/10.1016/0014-5793%2876%2980478-4>) ISSN 00145793.
- Karasawa A., Kawate T. “Structural Basis for Subtype-Specific Inhibition of the P2X7 Receptor.” *eLife*, 2016, 5, e22153. Retrieved February 8, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27935479>) ISSN 2050-084X.
- Kilpatrick L., Harris M.C. 2004. *Fetal and Neonatal Physiology*, 5th ed. Elsevier : Amsterdam, 2004, s. 1928, ISBN 9780721696546.
- Klyne D.M., Barbe M.F., Hodges P.W. “Systemic Inflammatory Profiles and Their Relationships with Demographic, Behavioural and Clinical Features in Acute Low Back Pain.” *Brain, Behavior, and Immunity*, 2017, 60, s. 84–92. Retrieved January, 13, 2017 (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889159116304597>) ISSN 08891591.
- Landén N.X., Dongqing L., Ståhle M. “Transition from Inflammation to Proliferation:

- A Critical Step during Wound Healing.” *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2016, 73, 20, s. 3861–3885. Retrieved November, 11, 2016 (<http://link.springer.com/10.1007/s00018-016-2268-0>) ISSN 1420-682X.
- Langrish C.L., Chen Y., Blumenschein W.M., Mattson J., Basham B., Sedgwick J.D., McClanahan T., Kastelein R.A.C., Daniel J. “IL-23 Drives a Pathogenic T Cell Population That Induces Autoimmune Inflammation.” *Journal of Experimental Medicine*, 2005, 201, 2. Retrieved February, 21, 2017 (<http://jem.rupress.org/content/201/2/233.short>).
- Lebreton J.P., Joisel F., Raoult J.P., Lannuzel B., Rogez J.P., Humber G. “Serum Concentration of Human Alpha 2 HS Glycoprotein during the Inflammatory Process: Evidence That Alpha 2 HS Glycoprotein Is a Negative Acute-Phase Reactant.” *The Journal of Clinical Investigation*, 1979, 64, 4, s. 1118–1129. Retrieved February 22, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/90057>) ISSN 0021-9738.
- Ledue T.B., Weiner D.L., Sipe J.D., Poulin S.E., Collins M.F., Rifai N. “Analytical Evaluation of Particle-Enhanced Immunonephelometric Assays for C-Reactive Protein, Serum Amyloid a and Mannose-Binding Protein in Human Serum.” *Annals of Clinical Biochemistry: An International Journal of Biochemistry and Laboratory Medicine*, 1998, 35, 6, s. 745–753. Retrieved February 11, 2017 (<http://acb.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/000456329803500607>) ISSN 0004-5632.
- Lee T.H., Rhim T., Kim S.S., Dvorak A.M. “Prothrombin Kringle-2 Domain Has a Growth Inhibitory Activity against Basic Fibroblast Growth Factor-Stimulated Capillary Endothelial Cells.” *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273, 44, s. 28805–28812. Retrieved March 27, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9786880>) ISSN 0021-9258.
- Levine S.J. “Mechanisms of Soluble Cytokine Receptor Generation.” *The Journal of Immunology*, 2004, 1735343, 9, s. 5343–48. Retrieved March 11, 2017 (<http://www.jimmunol.org/content/173/9/5343>) ISSN 1550-6606.
- Lijnen H.R. “Pleiotropic Functions of Plasminogen Activator Inhibitor-1.” *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2005, 3, 1, s. 35–45. Retrieved March 28, 2017 (<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1538-7836.2004.00827.x>) ISSN 1538-7933.
- Liou J.Y. “Colocalization of Prostacyclin Synthase with Prostaglandin H Synthase-1 (PGHS-1) but Not Phorbol Ester-Induced PGHS-2 in Cultured Endothelial Cells.” *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275, 20, s. 15314–15320. Retrieved March 22, 2017 (<http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.275.20.15314>) ISSN 00219258.
- Lomas D.A., Ravi M., Tew D.J., Lomas D.A., Bottomley S.P. “Alpha1-Antitrypsin Polymerization and the Serpinopathies: Pathobiology and Prospects for Therapy.” *The Journal of Clinical Investigation*, 2002, 110, 11, s. 1585–1590. Retrieved March 24, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12464660>) ISSN 0021-9738.
- Louro M.O., Cocho J.A., Tutor J.C.. “Assessment of Copper Status in Pregnancy by Means of Determining the Specific Oxidase Activity of Ceruloplasmin.” *Clinica Chimica Acta*, 2001, 312, 1–2, s. 123–127. Retrieved March 24, 2017 (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898101006076>) ISSN 00098981.

- Madore N., Camborieux L., Bertrand N., Swerts J.P. “Regulation of Hemopexin Synthesis in Degenerating and Regenerating Rat Sciatic Nerve.” *Journal of Neurochemistry*, 1999, 72, 2, s. 708–715. Retrieved February 21, 2017 (<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1471-4159.1999.0720708.x>) ISSN 00223042.
- Masopust J. *Klinická Biochemie : Požadování a Hodnocení Biochemických Vyšetření*. Karolinum : Praha, 1998, s. 832, ISBN 80-7184-649-3.
- McCall C.E., El Gazzar M., Liu T., Vachharajani V., Yoza B. “Epigenetics, Bioenergetics, and microRNA Coordinate Gene-Specific Reprogramming during Acute Systemic Inflammation.” *Journal of Leukocyte Biology*, 2011. 90, 3, s. 439–446. Retrieved October 28, 2016 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21610199>) ISSN 1938-3673.
- Moestrup S.K., Gliemann J., Gorm P. “Distribution of the 2-Macroglobulin Receptor/low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein in Human Tissues.” *Cell & Tissue Research*, 1992, 269, 3, s. 375–382. Retrieved March 28, 2017 (<http://link.springer.com/10.1007/BF00353892>) ISSN 0302-766X.
- Montagud M., Montserrat I., Oliver A., Adelantado J.M., Mateo J., Borrell M., Fontcuberta J. “Pregnancy and Thrombophilia in Women with Congenital Deficit of Antithrombin III, Protein C, Protein S or Plasminogen: Analysis of 39 Cases.” *Medicina Clinica*, 1993, 100, 6, s. 201–204. Retrieved March 27, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8429723>) ISSN 0025-7753.
- Moreau R. “The Pathogenesis of ACLF: The Inflammatory Response and Immune Function.” *Seminars in Liver Disease*, 2016, 36, 2, s. 133–140. Retrieved February 13, 2017 (<http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0036-1583199>) ISSN 0272-8087.
- Muller-Eberhard U. “Hemopexin.” *New England Journal of Medicine*, 1970, 283, 20, s. 1090–1094. Retrieved February 23, 2017 (<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM197011122832007>) ISSN 0028-4793.
- Nar H., Bauer M., Stassen J.M., Lang D., Gils A., Declerck P. J. “Plasminogen Activator Inhibitor 1. Structure of the Native Serpin, Comparison to Its Other Conformers and Implications for Serpin Inactivation.” *Journal of Molecular Biology*, 2000, 297, 3, s. 683–695. Retrieved March 28, 2017 (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283600936040>) ISSN 00222836.
- Needleman P., Minkes M., Raz A. “Thromboxanes: Selective Biosynthesis and Distinct Biological Properties.” *Science*, 1976, 193, 4248, s. 163-165. Retrieved March 29, 2017 (<http://science.sciencemag.org/content/193/4248/163>).
- Nicolas G., Chauvet C., Viatte L., Danan J.L., Bigard X., Devaux I., Beaumont C., Kahn A., Vaulont S. “The Gene Encoding the Iron Regulatory Peptide Hepcidin Is Regulated by Anemia, Hypoxia, and Inflammation.” *The Journal of Clinical Investigation*, 2002, 110, 7, s. 1037–1044. Retrieved March 24, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12370282>) ISSN 0021-9738.
- Nishio Y., Isshiki H., Kishimoto T., Akira S. “A Nuclear Factor for Interleukin-6 Expression (NF-IL6) and the Glucocorticoid Receptor Synergistically Activate Transcription of the Rat Alpha 1-Acid Glycoprotein Gene via Direct Protein-Protein Interaction.” *Molecular and Cellular Biology*, 1993, 13, 3, s. 1854–1862.

- Retrieved March 13, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8441418>) ISSN 0270-7306.
- Oh J.Y., Hamm J., Xu X., Genschmer K., Zhong M., Lebensburger J., Marques M., Kerby B., Jeffrey D., Pittet J.F., Gaggari A., Patel R.P. “Absorbance and Redox Based Approaches for Measuring Free Heme and Free Hemoglobin in Biological Matrices.” *Redox Biology*, 2016, 9, s. 167–177. Retrieved February, 21, 2017 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27566280>) ISSN 22132317.
- Ohira T., Arita M., Omori K., Recchiuti A., Van Dyke T. E., Serhan Ch.N. “Resolvin E1 Receptor Activation Signals Phosphorylation and Phagocytosis.” *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285, 5, s. 3451–3461. Retrieved March 21, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19906641>) ISSN 1083-351X.
- Ohlsson K., Ulla Å. “ α_1 -Antichymotrypsin Interaction with Cationic Proteins from Granulocytes.” *Clinica Chimica Acta*, 1976, 73, 2, s. 285–291. Retrieved March 11, 2017 (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0009898176901741>).
- Olson S. “Heparin Activates Antithrombin Anticoagulant Function by Generating New Interaction Sites (Exosites) for Blood Clotting Proteinases.” *Trends in Cardiovascular Medicine*, 2002, 12, 8, s. 331–338. Retrieved March 24, 2017 (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1050173802001834>) ISSN 10501738.
- Orsini F., Chrysanthou E., Dudler T., Cummings W.J., Takahashi M., Fujita T., Demopoulos G., De Simoni M.G., Schwaeble W. “Mannan Binding Lectin-Associated Serine Protease-2 (MASP-2) Critically Contributes to Post-Ischemic Brain Injury Independent of MASP-1.” *Journal of Neuroinflammation*, 2016, 13, 1, s. 213. Retrieved November 14, 2016 (<http://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12974-016-0684-6>) ISSN 1742-2094.
- Panchanathan V., Geeta Ch., Gunasegaran K. “Interferon Function Is Not Required for Recovery from a Secondary Poxvirus Infection.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102, 36, s. 12921–12926. Retrieved March 29, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16123129>) ISSN 0027-8424.
- Parantainen J., Alanko J., Moilanen E., Metsä-Ketelä T., Zaini A.M., Vapaatalo H. “Catecholamines Inhibit Leukotriene Formation and Decrease Leukotriene/prostaglandin Ratio.” *Biochemical Pharmacology*, 1990, 40, 5, s. 961–966. Retrieved March 21, 2017 (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006295290904809>) ISSN 00062952.
- Piotti K.C., Rhonda K.Y., Zhengming Ch., Jessurun J. “Serum Amyloid A Immunohistochemical Staining Patterns in Hepatitis.” *Histopathology*, 2016, 69, 6, s. 937–942. Retrieved January 6, 2017 (<http://doi.wiley.com/10.1111/his.13016>) ISSN 03090167.
- Ponka P., Beaumont C., Richardson D.R. “Function and Regulation of Transferrin and Ferritin.” *Seminars in Hematology*, 1998, 35, 1, s. 35–54. Retrieved March 6, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9460808>) ISSN 0037-1963.
- Prohászka Z., Nilsson B., Frazer-Abel A., Kirschfink M. “Complement Analysis 2016: Clinical Indications, Laboratory Diagnostics and Quality Control.” *Immunobiology*, 2016, 221, 11, s. 1247–1258. Retrieved November, 11, 2016

- (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27475991>) ISSN 01712985.
- Ridker P.M. “C-Reactive Protein.” *Circulation*, 108, 12, s. 81-85. Retrieved February, 9, 2017 (<http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.CIR.0000053730.47739.3C>).
- Robson S.C., Saunders R., Kirsch R.E. “Monocyte-Macrophage Release of IL-1 Is Inhibited by Type-1 Plasminogen Activator Inhibitors.” *Journal of Clinical & Laboratory Immunology*, 1990, 33, 2, s. 83–90. Retrieved March 24, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1967070>) ISSN 0141-2760.
- Rodkey F.L. “Direct Spectrophotometric Determination of Albumin in Human Serum.” *Clinical Chemistry*, 1965, 11, 4, s. 478-487 Retrieved February, 22, 2017 (<http://clinchem.aaccjnls.org/content/11/4/478.short>).
- Romani L., Mencacci A., Cenci E., Spaccapelo R., Toniatti C., Puccetti P., Bistoni F., Poli V., Remington J.S., Hashimoto K. “Impaired Neutrophil Response and CD4+ T Helper Cell 1 Development in Interleukin 6-Deficient Mice Infected with *Candida Albicans*.” *Journal of Experimental Medicine*, 1996, 183, 4, s. 1345–1355. Retrieved March 10, 2017 (<http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.183.4.1345>) ISSN 0022-1007.
- Sadrzadeh S., Hossein M., Bozorgmehr J. “Haptoglobin Phenotypes in Health and Disorders.” *American Journal of Clinical Pathology*, 2004, 121, s. 97-104. Retrieved February 21, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15298155>) ISSN 0002-9173.
- Samuelsson B. *Leukotrienes and Prostacyclin*, Boston, MA : Springer, 1983. Retrieved March 21, 2017 (http://link.springer.com/10.1007/978-1-4684-4391-2_2) ISBN 978-1-4684-4391-2.
- Sandford A.J., Chagani T., Weir T.D., Parè P.D., Peter D. “Antichymotrypsin Mutations In Patients With Chronic Obstructive Pulmonary Disease.” *Disease Markers*, 1998, 13, 4, s. 257–260. Retrieved March 13, 2017 (<http://www.hindawi.com/journals/dm/1998/867620/abs/>).
- Sarkar A., Wintrode P.L. “Effects of Glycosylation on the Stability and Flexibility of a Metastable Protein: The Human Serpin α 1-Antitrypsin.” *International Journal of Mass Spectrometry*, 2011, 302, 1–3, s. 69–75. Retrieved March 24, 2017 (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1387380610002836>) ISSN 13873806.
- Scaffidi P., Misteli T., Bianchi M. E. “Release of Chromatin Protein HMGB1 by Necrotic Cells Triggers Inflammation.” *Nature*, 2002, 418, 6894, s. 191–195. Retrieved February 17, 2017 (<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature00858>) ISSN 0028-0836.
- Scorze M., Liguori R., Elce A., Salvatore F., Castaldo G. “Biological Role of Mannose Binding Lectin: From Newborns to Centenarians.” *Clinica Chimica Acta*, 2014, 451, s. 78–81. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2015.03.007>) ISSN 18733492.
- Sharp A.M., Stein P.E., Navraj P.S., Carrell R.W., Berkenpas M.B., Ginsburg D., Lawrence D.A., Randy R.J. “The Active Conformation of Plasminogen Activator Inhibitor 1, a Target for Drugs to Control Fibrinolysis and Cell Adhesion.” *Structure*, 1999, 7, 2, s. 111–118. Retrieved March 28, 2017

(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969212699800185>) ISSN 09692126.

- Schaer C.A., Deuel J.W., Bittermann A.G., Rubio I.G., Schoedon G., Spahn D.R., Wepf R.A., Vallelian F., Schaer D.J. "Mechanisms of Haptoglobin Protection against Hemoglobin Peroxidation Triggered Endothelial Damage." *Cell Death and Differentiation*, 2013, 20, 11, s. 1569–1579. Retrieved February 21, 2017 (<http://www.nature.com/doi/10.1038/cdd.2013.113>) ISSN 1350-9047.
- Schoslinsky K.H., Lehmann H.P., Beeler M.F. "Measurement of Ceruloplasmin from Its Oxidase Activity in Serum by Use of O-Dianisidine Dihydrochloride." *Clinical Chemistry*, 1974, 12, s. 1556–1563. Retrieved February 23, 2017 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4214636>) ISSN 0009-9147.
- Schroeder H.W., Cavacini L. "Structure and Function of Immunoglobulins." *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2010, 125, 2, s. 41-52. Retrieved October 28, 2016 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20176268>) ISSN 1097-6825.
- Simon L., Gauvin F., Amre D.K., Saint-Louis P., Lacroix J.. "Serum Procalcitonin and C-Reactive Protein Levels as Markers of Bacterial Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Clinical Infectious Diseases*, 2004, 39, 2, s. 206–217. Retrieved February 9, 2017 (<https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/421997>) ISSN 1058-4838.
- De Simoni M.G., Storini C., Barba M., Catapano L., Arabia A.M., Rossi E., Bergamaschini L. "Neuroprotection by Complement (C1) Inhibitor in Mouse Transient Brain Ischemia." *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2003, 23, 2, s. 232–239. Retrieved March 24, 2017 (<http://jcb.sagepub.com/lookup/doi/10.1097/01.WCB.0000046146.31247.A1>) ISSN N 0271-678X.
- Howard S.S., Zhang J.M., Baccei M.L. *Current Therapy in Pain*. Elsevier health science : Amsterdam, 2009, 674. Retrieved February 14, 2017 (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978141604836700002X>) ISBN 9781416048367.
- Smith W.L., DeWitt D.L., Garavito R.M. "Cyclooxygenases: Structural, Cellular, and Molecular Biology." *Annual Review of Biochemistry*, 2000, 69, 1, s. 145–182. Retrieved March 22, 2017 (<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.biochem.69.1.145>) ISSN 0066-4154.
- Stepien K.M., Guy M. "Annals express: Ceruloplasmin Oxidase Activity-Measurement in Serum by Use of O-Dianisidine Dihydrochloride on a Microplate Reader." *Annals of Clinical Biochemistry*, 2017, doi 10.1177/0004563217695350. Retrieved February 23, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28166667>) ISSN 0004-5632.
- Stoller J.K., Aboussouan L.S. "α1-Antitrypsin Deficiency." *The Lancet*, 2005, 365, 9478, s. 2225–2236. Retrieved March 6, 2017 (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673605667815>) ISSN 01406736.
- Nobuhiro T., Ortel T.L., Putnam F.W. "Single-Chain Structure of Human Ceruloplasmin: The Complete Amino Acid Sequence of the Whole Molecule

- (Multicopper Oxidase/gene Evolution/glucosamine Oligosaccharide/genetic Polymorphism/copper Binding).” *Biochemistry*, 1984, 81, s. 390–394. Retrieved March 24, 2017 (<http://www.pnas.org/content/81/2/390.full.pdf>).
- Tanzi R.E., Blacker D., Wilcox M.A., Laird N.M., Rodes L., Horvath S.M., Go R.C.P., Perry R., Watson B. “Alpha-2 Macroglobulin Is Genetically Associated with Alzheimer Disease.” *Nature Genetics*, 1998, 19, 4, s. 357–360. Retrieved March 13, 2017 (<http://www.nature.com/doi/10.1038/1243>) ISSN 10614036.
- Theil E.C. “Regulation of Ferritin and Transferrin Receptor mRNAs.” *The Journal of Biological Chemistry*, 1990, 265, 9, s. 4771–4774. Retrieved March 6, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2156853>) ISSN 0021-9258.
- Theil E.C. “Ferritin: At the Crossroads of Iron and Oxygen Metabolism.” *The Journal of Nutrition*, 2003, 133, 5 Suppl 1, s. 1549–1553. Retrieved March 6, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12730463>) ISSN 0022-3166.
- Thunberg L., Bäckström G., Lindahl U. “Further Characterization of the Antithrombin-Binding Sequence in Heparin.” *Carbohydrate Research*, 1982, 100, 1, s. 393–410. Retrieved March 27, 2017 (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008621500810502>) ISSN 00086215.
- Tolosano E., Fiorella A. “Hemopexin: Structure, Function, and Regulation.” *DNA and Cell Biology*, 2002, 21, 4, s. 297–306. Retrieved February 21, 2017 (<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/104454902753759717>) ISSN 1044-5498.
- Torti F.M., Torti S.V., Ganz T., Vogel H.J., Lichtenstein A., Ganz T. “Regulation of Ferritin Genes and Protein.” *Blood*, 2002, 99, 10, s. 3505–3516. Retrieved March 6, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11986201>) ISSN 0006-4971.
- Urade Y., Osamu H. “Prostaglandin D Synthase: Structure and Function.” *Vitamines and Hormons*, 2000, 58, s. 89–120. Retrieved March 21, 2017 (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0083672900580224>).
- Vaughan D.E., Lazos S.A., Tong K. “Angiotensin II Regulates the Expression of Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Cultured Endothelial Cells. A Potential Link between the Renin-Angiotensin System and Thrombosis.” *The Journal of Clinical Investigation*, 1995, 95, 3, s. 995–1001. Retrieved March 28, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7884001>) ISSN 0021-9738.
- Wan-Ibrahim W.I., Ashrafzadeh A., Singh V.A., Hashim O.H., Abdul-Rahman P.S. “Contrasting Increased Levels of Serum Amyloid A in Patients with Three Different Bone Sarcomas: An Indicator of Tumor Malignancy?” *Electrophoresis*, 2016, 37, 17–18, s. 2328–2337. Retrieved February 6, 2017 (<http://doi.wiley.com/10.1002/elps.201500522>).
- Weggen S., Eriksen J.L., Das P., Sagi S.A., Wang R., Pietrzik C.U., Findlay K.A., Smith T.E., Murphy M.P., Bulter T., Kang D.E., Marquez-Sterling N., Golde T.E., Koo E.H. “A Subset of NSAIDs Lower Amyloidogenic A β 42 Independently of Cyclooxygenase Activity.” *Nature*, 2001, 414, 6860, s. 212–216. Retrieved March 21, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11700559>) ISSN 0028-0836.
- Wejman J.C., Hovsepian D., Wall J.S., Hainfeld J.F., Greer J. “Structure of Haptoglobin and the Haptoglobin-Hemoglobin Complex by Electron Microscopy.” *Journal of*

- Molecular Biology*, 1984, 174, 2, s. 319–341. Retrieved March 24, 2017 (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022283684903413>) ISSN 0028-0836.
- Wenzel J., Tüting T. “Identification of Type I Interferon-Associated Inflammation in the Pathogenesis of Cutaneous Lupus Erythematosus Opens up Options for Novel Therapeutic Approaches.” *Experimental Dermatology*, 2007, 16, 5, s. 454–463. Retrieved March 29, 2017 (<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0625.2007.00556.x>) ISSN 0906-6705.
- Wiley J.S., Sluyter R., Gu B.J., Stokes L., Fuller S. J. “The Human P2X7 Receptor and Its Role in Innate Immunity.” *Tissue Antigens*, 2011, 78, 5, s. 321–332. Retrieved February 8, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21988719>) ISSN 00012815.
- Xu H., Barnes G.T., Yang Q., Tan G., Yang D., Chou Ch.J., Sole J., Nichols A., Ross J.S., Tartaglia L.A., Chen H. “Chronic Inflammation in Fat Plays a Crucial Role in the Development of Obesity-Related Insulin Resistance.” *The Journal of Clinical Investigation*, 2003, 112, 12, s. 1821–1830. Retrieved March 10, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14679177>) ISSN 0021-9738.
- Yamin R., Malgeri E.G., Sloane J.A., McGraw W.T., Abraham C.R., Matsushita M., Mizusawa H., Holtzman D.M., Goldgaber D., Roses A.D., Moss T., Griffin W.S. T., Franceschi M., Khan K., Lee M., Leibowitz P., Lieberburg I., Little S., Masliah E., McConlogue L., Montoya-Zavala M., Mucke L., Paganini L., Penniman E., Power M., Schenk D., Seubert P., Snyder B., Soriano F., Tan H., Vitale J., Wadsworth S., Wolozin B., Zhao J., Wegrzyniak B., Wenk G., Wyss-Coray T. “Metalloendopeptidase EC 3.4.24.15 Is Necessary for Alzheimer’s Amyloid-Beta Peptide Degradation.” *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274, 26, s. 18777–18784. Retrieved March 24, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10373494>) ISSN 0021-9258.
- Zuraw B.L., Bork K., Binkley K.E., Banerji A., Christiansen S.C., Castaldo A., Kaplan A., Riedl M., Kirkpatrick Ch., Magerl M., Drouet Ch., Cicardi M. “Hereditary Angioedema with Normal C1 Inhibitor Function: Consensus of an International Expert Panel.” *Allergy and Asthma Proceedings*, 2012, 33, 6, s. 145–156. Retrieved March 24, 2017 (<http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=1088-5412&volume=33&issue=S1&page=145>) ISSN 10885412.