

## Stanovení proteinu BAFF u pacientů s monoklonálními gamapatiemi - první zkušenosti

Heřmanová Z.<sup>1</sup>, Pika T.<sup>2</sup>, Lochman P.<sup>3</sup>, Ščudla V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ústav imunologie, FN a LF UP Olomouc

<sup>2</sup>III. interní klinika – nefrologická, revmatologická, endokrinologická, LF UP a FN Olomouc

<sup>3</sup>Oddělení klinické biochemie a imunogenetiky, FN Olomouc

### SOUHRN

**Cíle studie:** K významným proteinům ovlivňujícím vyzrávání, aktivaci a přežívání jak normálních B lymfocytů a plasmatických buněk, tak také tumorózních buněk, patří protein BAFF (B cell activating factor). Cílem práce bylo zavedení vyšetření proteinu BAFF v séru a provedení pilotní analýzy u jedinců s monoklonálními gamapatiemi.

**Materiál a metody:** Vyšetřený soubor tvořilo 66 vzorků od 58 pacientů s monoklonálními gamapatiemi (MG). Pět pacientů mělo stanovenou diagnózu Waldenströмова makroglobulinémie (MW), 10 jedinců mělo diagnostikovanou monoklonální gamapatii nejasného významu (MGUS), 51 vzorků bylo od pacientů s mnohočetným myelomem (MM) - 16 ve stádiu remise, 27 v době diagnózy a 8 s relapsem onemocnění. U 8 pacientů s MM bylo možno využít párové analýzy porovnávající naměřené hladiny BAFF v době stanovení diagnózy a při dosažení remise choroby. Hladiny proteinu BAFF byly stanoveny metodou ELISA. Pro vzájemné porovnání skupin byl použit neparametrický test Kruskal-Wallis. Následně byly provedeny Mann-Whitney U-testy mnohonásobného porovnání s Bonferroniho korekcí, Wilcoxonův párový test a Spearmanova korelační analýza.

**Výsledky:** Naměřené mediány hodnot proteinu BAFF v jednotlivých skupinách byly: MM v remisi 2520 ng/l, MM v době diagnózy 204 ng/l, MM v relapsu 331 ng/l, MGUS 257 ng/l, MW 120 ng/l. Pacienti ve skupině MM v remisi měli statisticky významně vyšší hodnoty parametru BAFF než pacienti ve všech následujících skupinách: MM v době diagnózy ( $p < 0,0001$ ), MM ve stádiu relapsu ( $p = 0,0001$ ), MGUS ( $p < 0,0001$ ), MW ( $p = 0,001$ ). Pacienti ve skupině MM ve stádiu relapsu měli statisticky významně vyšší hodnoty proteinu BAFF než pacienti ve skupině MM v době diagnózy ( $p = 0,004$ ). Mezi ostatními skupinami nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly. U pacientů s MM v době diagnózy jsme prokázali negativní středně silnou korelaci mezi proteinem BAFF a věkem.

**Závěr:** Oproti údajům v literatuře a našemu očekávání jsme naměřili nejvyšší hladinu proteinu BAFF u pacientů s MM ve stádiu remise. Je pravděpodobné, že výsledky analýzy BAFF bude nutno brát v kontextu dalších parametrů a spíše přispějí jen jako dílčí parametr při posuzování typu MG.

**Klíčová slova:** monoklonální gamapatie, mnohočetný myelom, monoklonální gamapatie nejasného významu, protein BAFF.

### SUMMARY

**Heřmanová Z., Pika T., Lochman P., Ščudla V.: The determination of BAFF protein in patients with monoclonal gammopathies - first experience.**

**Objective:** The B cell activating factor (BAFF) is an important protein influencing not only maturation, activation and survival of B lymphocytes and plasma cells but also malignant plasma cells. In the pilot study we compared the concentration of BAFF in the groups of patients with various types of monoclonal gammopathies.

**Material and methods:** We investigated 66 samples of 58 patients with monoclonal gammopathies (MG). 5 patients had Waldenström's macroglobulinemia (MW), 10 patients monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), 51 samples were from patients with multiple myeloma (MM) – 16MM at remission, 27 MM at time of diagnosis, 8MM at relapse. Paired analysis was used at 8 patients with MM at time of diagnosis and MM at remission. The ELISA kit was used to determine serum levels of BAFF protein. Mann – Whitney test, Wilcoxon paired test and Spearman's correlation analysis were used for statistical calculation.

**Results:** The concentrations of BAFF in each group were: MM at remission 2520 ng/l, MM at time of diagnosis 204 ng/l, MM at relapse 331 ng/l, MGUS 257 ng/l, MW 120 ng/l. The values of BAFF protein at MM at remission were statistically significantly higher than the values at all the others groups : MM at time of diagnosis ( $p < 0,0001$ ), MM at relapse ( $p = 0,0001$ ), MGUS ( $p < 0,0001$ ), MW ( $p = 0,001$ ). Patients in the group with MM at relapse had statistically significantly higher BAFF concentration than in the group with MM at time of diagnosis. Spearman's correlation analysis revealed negative medium strong correlation between the concentration of BAFF and patient's age in the group with MM at time of diagnosis.

**Conclusion:** The highest concentration of BAFF protein was found in the group of patients with MM at remission and it was opposite to literature data and our expectation. It is probable that results of BAFF analysis should be considered in the context of other parameters.

**Key words:** monoclonal gammopathy, multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, protein BAFF.

## Úvod

Monoklonální gamapatie (MG) je značně heterogenní skupina onemocnění s překvapivě častým výskytem, kde prevalence narůstá s věkem. U pacientů dochází k monoklonální proliferaci konečných vývojových stádií B lymfocytů - plazmocytů, která je provázena tvorbou homogenního patologického imunoglobulinu (M-proteinu, paraproteinu) nebo jeho strukturálních komponent (lehkých řetězců, v menší míře těžkých řetězců) [1,2]. Proliferace B lymfocytárního klonu má maligní, potenciálně maligní nebo benigní charakter, kdy nezhooubnost procesu je prověřena dlouhodobým sledováním. K nejčastější MG patří monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS) [3,4]. Představují 59 % případů. Dnes se považuje za prokázané, že všem případům mnohočetného myelomu (MM) předchází právě MGUS [5,6]. Ve skupině maligních MG je nejčastěji zastoupen mnohočetný myelom (MM) a jeho variantní formy (výskyt ve 20 %) [2]. Klinický obraz MM je velmi pestrý, incidence v ČR se udává přibližně 4/100 000. Laboratorní vyšetření u MG má klíčové postavení nejen při stanovení diagnózy, a to zejména v případě, kdy je symptomatologie onemocnění necharakteristická, ale také při sledování průběhu a hodnocení prognózy onemocnění. Při vyšetřování paraproteinu je kladen důraz na jeho detekci, imunochemickou charakterizaci a kvantifikaci [7, 8]. Pro přežívání myelomových buněk se jeví jako velmi významná přítomnost řady solubilních stimulačních autokrinních nebo parakrinních faktorů; např. IL 6, IFN- $\alpha$ , IGF-1 (insulin-like growth factor-1), HGF (hepatocyte growth factor) [9, 10].

K novějším růstovým faktorům myelomových buněk můžeme zařadit protein BAFF (B cell activating factor), dříve nazývaný BLYS. BAFF byl popsán v roce 1999, je řazen k TNF superfamili. Je produkován aktivovanými monocyty, makrofágy, dendritickými buňkami. Protein BAFF je významný pro vyžívání, aktivaci a přežívání jak normálních B lymfocytů a plazmatických buněk, tak také tumorózních buněk [11- 15]. Klidovému B lymfocytu je předkládán aktivovanými monocyty zpracovaný cizorodý materiál a současně se na povrchové receptory B lymfocytů váže uvolňovaný protein BAFF. Klidový lymfocyt se mění na plazmatickou buňku produkující imunoglobuliny. Protein BAFF sdílí signifikantní homologii s dalším proliferačním proteinem APRIL. Na povrchu B lymfocytu jsou umístěny společné receptory pro BAFF a APRIL – BCMA/TNFRSF17 (B-cell maturation antigen) a TACI/TNFRSF13B (transmembránový receptor) a dále receptor pouze pro BAFF – BAFF receptor (BAFF R/BR3/TNFRSF13C). Receptory jsou zvýšeně exprimovány u tumorózních buněk. Následná signální intracelulární cesta po navázání BAFF na příslušný receptor není dosud přesně charakterizována. Signál se přenáší do jádra buňky, posledním přenašečem je transkripční nukleární faktor NF- $\kappa$ B, aktivují se příslušné geny, jejichž produkty se účastní antiapoptotických pochodů. Pokud buňky neobdrží kostimulační signály nebo nejsou schopny na stimulační signály odpovědět, zahajuje se proces apoptózy. V pokusech u transgenických myší nadprodukce BAFF vedla k zvýšenému počtu

B lymfocytů ve slezině, uzlinách, ke zvýšenému počtu a velikosti zárodečných center. U pokusných zvířat byly zmapovány i známky autoimunitních pochodů (prokázána zvýšená hladina autoprotilátka a depozita imunoglobulinů v ledvinách). V odborné literatuře se již řadu let také hovoří o zvýšené hladině BAFF u pacientů se systémovým lupus erythematoses a Sjögrenovým syndromem [16, 17]. Molekula BAFF se rovněž jeví jako jeden z klíčových faktorů v patobiologii řady maligních B-lymfoproliferativních stavů (B chronické lymfatické leukémie, Waldenströmovy makroglobulinémie (MW), DLBCL) ovlivňující přežití a citlivost k terapii nádorových linií a mající jistý prognostický význam [18 – 20].

Stimulační molekuly a jejich receptory se stávají vhodným terčem pro terapeutické zásahy. U autoimunitních onemocnění je žádoucí eliminovat nadměrnou aktivitu B lymfocytů, a proto se používají medikamenty na bázi monoklonální protilátky proti BAFF blokující jeho stimulační vliv na B lymfocyty. U nádorových stavů molekula BAFF s navázanými radioizotopy ničí terčové B lymfocyty. Naopak u imunodeficitních stavů, jako je běžný variabilní imunodeficit nebo selektivní deficit imunoglobulinu A, se preparáty na bázi BAFF použijí ke stimulaci B buněk vedoucí následně k produkci imunoglobulinů.

V současnosti je u refrakterních/relabujících forem mnohočetného myelomu či Waldenströmovy makroglobulinémie v rámci klinických studií zkoušen rekombinantní fúzní protein (Atacicept, TACI-Ig) vážící BAFF, ale i molekuly APRIL [21].

## Cíl práce

Cílem práce bylo zavedení vyšetření proteinu BAFF v séru a v pilotní studii porovnání sérové hladiny proteinu BAFF u pacientů s různými typy MG – u pacientů s MGUS, s MW a MM v různém stádiu choroby.

## Soubor pacientů a metodika

Vyšetřený soubor tvořilo 66 vzorků od 58 pacientů s MG. Pět pacientů mělo stanovenou diagnózu MW, 10 jedinců mělo diagnostikovanou MGUS, 51 vzorků bylo od pacientů s MM - 16 ve stádiu remise, 27 v době diagnózy a 8 s relapsem onemocnění. U 8 pacientů s MM bylo možno využít párové analýzy porovnávací naměřené hladiny v době stanovení diagnózy a při dosažení remise choroby.

Ke stanovení hladiny proteinu BAFF (hodnoty v ng/l) byla použita kvantitativní sandwichová ELISA, souprava firmy R&D Systems. Na jamkách mikrotitrační desičky byla navázána monoklonální protilátka specifická pro BAFF, jako sekundární protilátka se použila polyklonální protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou, tetramethylbenzidin sloužil jako substrát. Plotnička byla měřena na fotometru Spectra Shell při 450 nm.

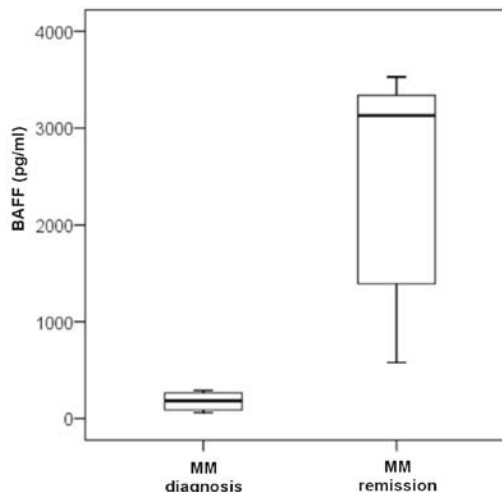
Při volbě vhodných statistických metod se vycházelo z testu normality Shapiro-Wilk, který prokázal, že sledovaná veličina není ve všech skupinách normálně

rozložena (signifikance < 0,05) a dále ze skutečnosti, že ve skupinách pacientů s MM v relapsu a MW bylo málo dat. Pro vzájemné porovnání skupin byl použit neparametrický test Kruskal-Wallis. Následně byly provedeny Mann-Whitney U-testy mnohonásobného porovnání s Bonferroniho korekcí, Wilcoxonův párový test a Spearmanova korelační analýza.

## Výsledky

Popisná statistika souboru je shrnuta v tabulce 1. Testem Kruskal-Wallis bylo zjištěno, že mezi skupinami jsou statisticky významné rozdíly v rozložení veličiny BAFF ( $p < 0,0001$ ). Následně provedené Mann-Whitney U-testy mnohonásobného porovnání s Bonferroniho korekcí ukázaly, že pacienti ve skupině MM v remisi mají statisticky významně vyšší hodnoty parametru BAFF než pacienti ve všech následných skupinách: MM v době diagnózy ( $p < 0,0001$ ), MM ve stádiu relapsu ( $p = 0,0001$ ), MGUS ( $p < 0,0001$ ), MW ( $p = 0,001$ ). Dále bylo prokázáno, že pacienti ve skupině MM ve stádiu relapsu mají statisticky významně vyšší hodnoty proteinu BAFF než pacienti ve skupině MM v době diagnózy ( $p = 0,004$ ). Mezi ostatními skupinami nebyly statisticky významné rozdíly v koncentraci proteinu BAFF prokázány. Statisticky významné výsledky jsou znázorněny svorkami (obr. 1).

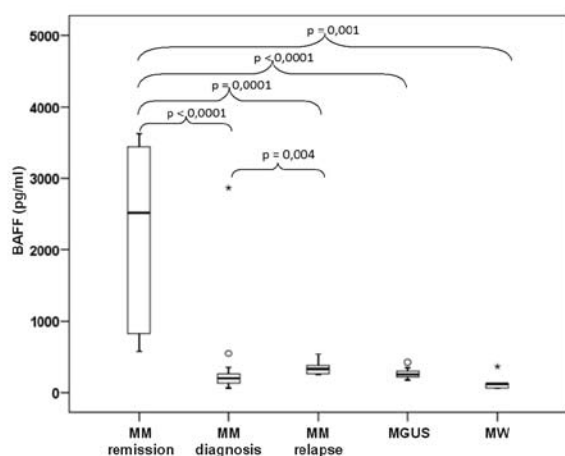
Výsledky 8 pacientů s MM, u kterých byly změřeny hladiny BAFF jak v době stanovení diagnózy, tak při dosažení remise choroby, byly využity k porovnání pomocí párové analýzy (Wilcoxonův párový test). Byly zjištěny signifikantně nižší hodnoty BAFF v době stanovení diagnózy (medián 185 ng/l) než v remisi (medián 3130 ng/l,  $p = 0,012$ ) (obr. 2).



**Fig. 2.** The concentrations of BAFF protein in the same patients with MM at the time of diagnosis and at remission. Difference in concentrations was statistically significant ( $p = 0.012$ ). (MM – multiple myeloma.)

**Table 1.** BAFF protein concentrations (ng/l) in the different groups of patients. (MM – multiple myeloma, MGUS – monoclonal gammopathy of undetermined significance, MW – Waldenström's macroglobulinemia.)

	n	min	max	median	mean	standard deviation
MM remission	16	579	3630	2520	2193	1268
MM diagnosis	27	63	2870	204	302	524
MM relaps	8	252	540	331	343	96
MGUS	10	180	424	257	269	73
MW	5	63	365	120	146	126

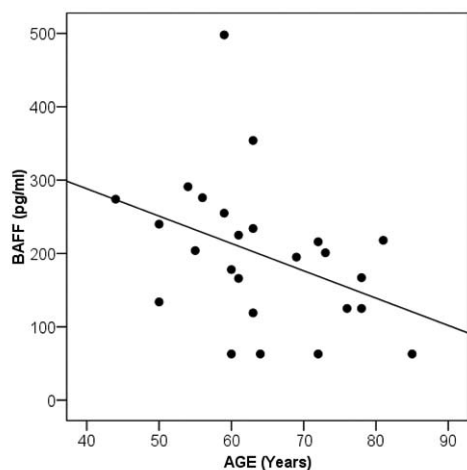


**Fig. 1.** Comparison of BAFF protein concentrations in different groups of patients including statistic significances. (MM – multiple myeloma, MGUS – monoclonal gammopathy of undetermined significance, MW – Waldenström's macroglobulinemia.)

U skupiny pacientů s MM v době stanovení diagnózy byl proveden rozbor věkového zastoupení a hladiny BAFF. Spearmanova korelační analýza prokázala negativní středně silnou korelaci mezi hodnotou proteinu BAFF a věkem ( $r = - 0,493$ ) (obr. 3).

## Diskuse

Byla provedena pilotní studie na stanovení hladin proteinu BAFF u pacientů s monoklonálními gamapatiemi. Ačkoli se jedná o problematiku známou již delší dobu, práce zabývající se stanovením této molekuly u monoklonálních gamapatií jsou ojedinělé, zaměřené spíše na in vitro studie buněčných linií, s omezeným využitím a analýzou v souborech nemocných s MG. Na základě literárních údajů jsme očekávali nejvyšší hladinu proteinu BAFF u pacientů s MM v době diagnózy onemocnění a při progresi/relapsu onemocnění. V na-



**Fig. 3.** Spearman's correlation between concentration of BAFF and age in patients with MM in the time of diagnosis showed negative medium strong correlation ( $r = -0.493$ ).

šem souboru vzorků jsme však změřili signifikantně vyšší hladinu proteinu BAFF u pacientů s MM v remisi než u MM v době diagnózy, relapsu a dále u MGUS a MW, což je v rozporu s prací publikovanou Moreaux et al. [12]. Dále ze statistického zhodnocení vyplynulo, že pacienti ve skupině MM ve stádiu relapsu mají statisticky významně vyšší hodnoty proteinu BAFF než pacienti ve skupině MM v době diagnózy. Mezi ostatními porovnávanými skupinami nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly. Snažili jsme se tuto skutečnost objasnit. Pracovní postup stanovení proteinu BAFF byl striktně dodržen podle návodu výrobce soupravy, kalibrační křivka odpovídala doporučeným parametrům, vzorky byly adekvátně uchovávány při mínus 80°C do doby vyšetření. Je možno podotknout, že i v původní práci Moreaux et al. [12] dochází k vzájemnému překrývání hladin BAFF mezi zdravými kontrolami a nemocnými s MM.

U 8 pacientů s MM byla provedena párová analýza. Oproti očekávání byly zjištěny vysoké hladiny proteinu BAFF u nemocných s MM v remisi. Pět pacientů z tohoto počtu podstoupilo vysokodávkovanou chemoterapii s podporou autologního štěpu. Vysvětlením pro tyto výsledky bude zřejmě krátká doba odběru krve od ukončené chemoterapie (zvykle +100 dní). Je známo, že období dosažené remise, zejména časné posttransplantační období s navozením maximální remise je spojeno s mohutnou cytokinovou „bouří“, jež má za následek nejen restituci hemopoiezy v kostní dřeni a postupné znovuoživení imunitního systému, ale i tu okolnost, že některé excesivní stimulační faktory mohou mít pozitivní vliv i na perzistenci a následnou proliferaci reziduálních nádorových populací [22]. Proto dalším cílem této práce bude i vyhodnocení chování hladin BAFF v delším časovém úseku.

Doplňili jsme porovnání hladin proteinu BAFF ve vztahu k věku nemocných s MM v době diagnózy, přičemž bylo zjištěno, že s narůstajícím věkem dochází k poklesu hladin BAFF. Tento nálezný, i když zjištěný na malém souboru vzorků, může vysvětlovat agresivnější chování onemocnění u mladších nemocných, nežli

u pacientů pokročilého věku. Stejně tak klesající hladiny BAFF mohou souviset s postupnou involucí buněčných populací kostní dřene spojených se stárnutím, mající za následek klesající produkci cytokinů, včetně molekuly BAFF. Proto plánované další analýzy na rozšířeném souboru pacientů budou zahrnovat i kontroly, věkem adjustované vůči vyšetřovanému souboru.

Předběžně získané výsledky při porovnání hladin BAFF u jedinců s MGUS a MM ukazují, že tento parametr zřejmě nebude možno do budoucna využít jako diferenační faktor mezi oběma stavy. Nicméně pro definitivní závěry bude nutno provést multiparametrickou analýzu se zhodnocením dalších zvyklých parametrů a zejména sledováním dynamiky hladiny BAFF u transformujících se jedinců.

Námi získaná data jsou předběžná, získaná na omezeném souboru nemocných, a proto plánujeme rozšíření souboru, sledování dynamiky hladin proteinu BAFF a v neposlední řadě i obohacení o současné stanovení proliferanční molekuly APRIL, jež má obdobný vliv jako výše zmíněná molekula BAFF [12].

## Závěr

Oproti údajům v literatuře a našemu očekávání jsme naměřili nejvyšší hladinu proteinu BAFF u pacientů s MM ve stádiu remise. Vysvětlení této skutečnosti se nám nepodařilo nalézt. Je pravděpodobné, že výsledky analýzy BAFF bude nutno brát v kontextu dalších parametrů a spíše přispějí jen jako dílčí parametr při posuzování typu MG.

## Literatura

1. **Špička, I. et al.** *Mnohočetný myelom a další monoklonální gamapatie*. Galén 2005, Praha, p. 39-60.
2. **The International Myeloma Working Group.** Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Brit. J. Haematol.*, 2003; 121: 749-757.
3. **Kyle, R. A., Therneau, T. M., Rajkumar, S. V. et al.** Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N. Engl. J. Med.*, 2006; 354: 1362-9.
4. **Ščudla, V., Pika, T.** Monoklonální gamapatie nejistého významu ve světle současných poznatků. *Klin. Biochem. Metab.*, 2009; 38: 62-71.
5. **Weiss, B. M., Abadie, J., Verma, P. et al.** A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients. *Blood*, 2009; 113: 5418-5422.
6. **Landgren, O., Kyle, R. A., Pfeiffer, R. M. et al.** Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood*, 2009; 113: 5412-5417.
7. **Tichý, M.** *Laboratorní analýza monoklonálních imunoglobulinů (paraproteinů)*. Český Těšín: FINIDR s.r.o., 1997, ISBN 80-902022-1-7.
8. **Tichý, M., Maisnar, V.** Laboratorní průkaz monoklonálních imunoglobulinů. *Vnitř. Lék.*, 2006; 52: 41-45.
9. **Bačovský, J., Ščudla, V.** Cytokinová síť u mnohočetného myelomu. *Vnitř. Lék.*, 1994; 40: 517-520.

10. **Lauta, V. M.** A review of the cytokine network in multiple myeloma. *Cancer*, 2003; 97: 2440 – 52.
11. **Chang, S. K., Arendt, B. K., Darce, J. R., Wu, X., Jelinek, D. F.** A role for BLys in the activation of innate immune cells. *Blood*, 2006; 108: 2687-2694.
12. **Moreaux, J., Legouffe, E., Jourdan, E. et al.**: BAFF and APRIL protect myeloma cells from apoptosis induced by interleukin 6 deprivation and dexamethasone. *Blood*, 2004; 103: 3148 -3157.
13. **Raje, N., Kumar, S., Hideshima, T. et al.** The role of B cell-Activating factor (BAFF) in the biology of multiple myeloma. *Blood*, 2005; 106: 3380a.
14. **Novak, A. J., Darce, J. R., Arendt, B. K. et al.** Expression of BCMA, TACI, and BAFF-R in multiple myeloma: a mechanism for growth and survival. *Blood*, 2004; 103: 689-694.
15. **Tai, Y-T., Li, X-F., Breutkreutz, I. et al.** Role of B Cell-Activating factor in adhesion and growth of human multiple myeloma cells in the bone marrow microenvironment. *Cancer. Res.*, 2006; 66: 6675-82.
16. **Stohl, W.** Systemic Lupus Erythematosus: A Blissless Disease of Too Much BLyS (B Lymphocyte Stimulator) Protein. *Curr. Opin. Rheumatol.*, 2002; 14: 522-528.
17. **Pers, J. O., Daridon, C., Devauchelle, V. et al.** BAFF Overexpression Is Associated with Autoantibody Production in Autoimmune Diseases. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2005; 1050: 34-39.
18. **Haiat, S., Billard, C., Quiney, C., Ajchenbaum-Cymbalista, F., Kolb, J.-P.** Role of BAFF and APRIL in human B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Immunology*, 2006; 118: 281-292.
19. **Elsawa, S. F., Novak, A. J., Grote, D. M. et al.** B-lymphocyte stimulator (BLys) stimulates immunoglobulin production and malignant B-cell growth in Waldenström macroglobulinemia. *Blood*, 2006; 107: 2882-2888.
20. **Kim, S.J., Lee S.J., Choi I.Y. et al.** Serum BAFF predicts prognosis better than APRIL in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with rituximab plus CHOP chemotherapy. *Eur. J. Haematol.*, 2008; 81: 177-184.
21. **Rossi, J-F., Moreaux, J., Rose, M. et al.** A phase I/II study of atacicept (TACI-Ig) to neutralize APRIL and BLys in patients with refractory or relapsed multiple myeloma or active previously treated Waldenström's macroglobulinemia. *Blood*, 2006; 108: 3578a.
22. **Barlogie, B., Shaughnessy, J., Tricot, G. et al.** Treatment of multiple myeloma. *Blood*, 2004; 103: 20-32.

*Tato práce vznikla s podporou grantu  
IGA MZ ČR NT 12451/5.*

Do redakce došlo 17. 2. 2012

*Adresa pro korespondenci  
MUDr. Zuzana Heřmanová  
Ústav imunologie, Fakultní nemocnice  
a LF UP v Olomouci  
I. P. Pavlova 6  
775 20 Olomouc  
Email: zuzana.hermanova@fnol.cz*