

Lyzosomální onemocnění

Lyzosomální onemocnění („střádavé choroby“) jsou vzácná, dědičně podmíněná onemocnění vedoucí ke stádání v lyzosomech v důsledku nedostatečné aktivity některého z lyzosomálních enzymů, popř. transportních proteinů. Jsou to **multisystémová onemocnění s trvalou progresí**, která se mohou manifestovat kdykoli v průběhu života. Postižené jsou především metabolicky aktivní orgány a tkáně (kostní dřeň, kosti, kosterní svaly, myokard a CNS). Bylo popsáno cca 60 různých lyzosomálních poruch. Časně formy mívají těžký průběh s rychlou progresí a infaustní prognózou. Výskyt v naší populaci se odhaduje na 1:8200 živě narozených dětí. Většinou se jedná o **autosomálně recesivně** dědičné choroby, vzácně gonosomálně recesivní (Fabryho nemoc a mukopolysacharidóza typu II). Lyzosomální enzymy, tzv. kyselé hydrolázy, umožňují postupné štěpení velkých komplexních molekul (sfingolipidů, glykoproteinů či mukopolysacharidů) z buněčných stěn zanikajících buněk. Nedostatečné množství či nedostatečná enzymatická aktivita vede k hromadění substrátu v lyzosomech různých buněk. Některé nemoci lze léčit **substitučním podáváním rekombinantních enzymů** (Gaucherova, Fabryho a Pompeho choroba, mukopolysacharidóza typ I, II a VI) či omezením množství stádavého substrátu („substrát redukční terapie“ – Gaucherova nemoc, Niemann-Pickova nemoc typu C). Ojediněle je indikována transplantace kostní dřeně (mukopolysacharidóza typ I).^[1]

Rozdělení

- Lyzosomální onemocnění z *poruch transportu proteinů do lyzosomů*
- Lyzosomální onemocnění z *deficitu lyzosomálních membránových proteinů*
- Lyzosomální onemocnění z *deficitu lyzosomálních hydroláz*
- Lyzosomální onemocnění z *deficitu enzymových aktivátorů lyzosomálních hydroláz*

Patofyziologické mechanismy lyzozomálních onemocnění a jejich příklady

- **Stádání sekundárních produktů**
 - Cholesterol (NPC C)
 - Sfingomyelin (NPC A, NPC B)
 - Mukopolysacharidy
- **Neuroinflamace**
 - aktivace díky mikrogliím, které fungují jako fagocyty v CNS, stádají materiál v lyzosomech, což vede k jejich bobtnání (jako pěnové buňky v ateromovém plátu) a následně uvolnění lytických enzymů po jejich "prasknutí" (lýze)
- **Porucha kalciového metabolismu**
 - patří sem například Gaucherova choroba, což je porucha enzymu **glukosilcerebrosidázy**, který moduluje funkci rhyadonidových receptorů v sarkoplasmatickém (respektive endoplasmatickém) retikulu, které se starají o rovnováhu kalcia uvnitř buňky. Pokud jsou receptory poškozeny dochází k efluxu kalcia z Er a tudíž aktivaci mimo jiné lytických enzymů, a kaspáz (apoptóza)
- **Kyslíkové radikály**
 - Souvisí asi s poruchami Er a mitochondrií a to hlavně v mozku
- **Zvýšená autofagie**
 - zvýšená autofagie v konečném důsledku vede k apoptóze a to díky mnoha faktorům. Jedním z nich je třeba špatná cirkulace složek plasmatické membrány, což vede k poškození buňky a jejich chemických i elektrických gradientů, a to vede k apoptóze.

Lyzosomální onemocnění z poruch transportu proteinů do lyzosomů

I-cell disease (mukolipidóza II)

- Deficit **GlcNAc-fosfotransferázy**.
- Man-6-P je chemickým markrem, kterým jsou enzymy adresovány do lyzosomů.
- Inclusion cell disease je způsobena poruchou transportu proteinů obsahujících Man-6-P signál do lyzosomů, která je způsobená mutacemi v N-acetylglukosamin 1-fosfotransferáze.
- Receptor pro Man-6-P je nepostižen, Man-6-P vázaná na enzym nevzniká.
- To vede ke zvýšené aktivitě lyzosomálních proteinů v extracelulární tekutině a v plazmě, a snížené aktivitě mnoha lyzosomálních enzymů ve tkáních.
- Lyzosomy jsou zvětšené díky lyzosomálnímu stádání.
- Vakuolizace lymfocytů („inkluzní buňky“) stádajících lyzosomy.
- Pacienti mají: hrubé obličejové rysy, ztlustělé dásně, malou hepatomegalii a splenomegalii, kostní onemocnění – dysostosis multiplex, psychomotorickou retardaci, zvýšené aktivity lyzosomálních hydroláz v plazmě, nízké aktivity ve tkáních.

Lyzosomální onemocnění z deficitu lyzosomálních membránových proteinů

Dannonova choroba

- Deficit **LAMP2** (Lysosomal-associated membrane protein 2)

Cystinóza

- Deficit **cystinosinu**
- **Klinické projevy:**
- Ledvinné onemocnění s Fanconiho syndromem
- Renální selhání, nutná transplantace ledvin
- Krystaly v rohovce, fotofobie
- Porucha růstu
- Normální inteligence
- více na stránce poruchy metabolismu sirných AMK

Sialurie

- Deficit **sialinu**

Lyzosomální onemocnění z deficitu lyzosomálních hydroláz

- Lyzosomy obsahují různé hydrolázy podle toho, jaký skladovaný substrát štěpí. Poruchy funkce těchto enzymů vedou ke stádání substrátu v lyzosomálním aparátu buňky. Patří mezi ně:
- **Lipidózy a Sfgolipidózy**
 - **Mukopolysacharidózy**
 - **Mukopolysacharidózy a glykoproteinózy**
 - **Glykogenózy (sem patří jen glykogenóza II-Morbus Pompe)**
 - **Proteinózy**

Lipidózy

Lipidózy jsou **vrozené poruchy enzymů** (enzymopatie) lipidového metabolismu. Jde především o lyzosomální hydrolázy, které působí rozkládání složených lipidů – vyznačuje se hromaděním (stádáním, thesaurací) lipidů v lyzosomálním aparátu. Odbourávání sfingolipidových glykokonjugátů probíhá v lyzosomech postupným odštěpováním cukerných jednotek z neredukujícího konce řetězce specifickými exohydrolázami až na **ceramid**. Podobně **sfingomyelin** je degradován odštěpením fosforylcholinu. Ceramid je dále deacylován na **sfingosin**. Tyto konečné produkty opouští lyzozom a jsou použity znovu k biosyntéze, nebo jsou dále degradovány. **Estery cholesterolu** jsou hydrolyzovány, **cholesterol** je transportován do cytozolu a esterifikován.

Lipidózy bývají kvůli postižení nervového systému někdy označovány také jako **neurolipidózy**.

Mikroskopie

Hypertrofie lyzozomů – mikrovakuolární, pěnitý až voštinovitý vzhled buněk. Následně regresivní změny včetně sekundární tvorby lipopigmentů (ceroid i lipofuscin). Stádáním lipidy bývají **gangliosidy**, **cerebrosidy**, **sfingomyelin**, **ceramid**, **cholesterol** a jeho **estery**. Postihují především histiocyty RES, ale i epitelie a endotelie (viscerální lipidózy) nebo gangliové buňky (neuronální lipidózy).

Rozdělení

Podle místa postižení

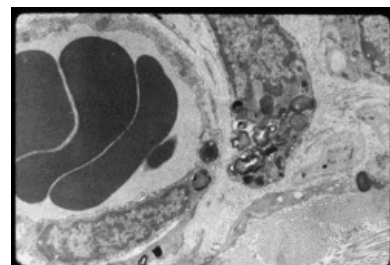
- Neuronální;
- viscerální;
- neuroviscerální;
- **podle stádáního lipidu** (a defektního enzymu).

Lyzosomální onemocnění CNS mají dvě formy:

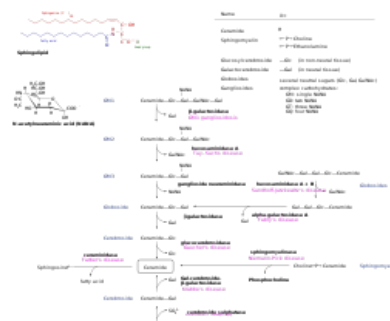
1. postižení **gangliových buněk** – thesaurující onemocnění;
2. postižení **bílé hmoty** – leukodystrofie (poruchy metabolismu myelinu).

Zjednodušené rozdělení složených lipidů

- **Fosfolipidy:**



Biopsie ze spojivky pacienta s Fabryho chorobou. V pericytech jsou patrné laminární struktury – lysosomy stádající ceramidtrihexosid



Sfgolipidózy

- *glycerofosfolipidy* – kyselina fosfatidová (3-fosfo-1,2-diacylglycerol) + další složka (cholin, ethanolamin);
- *sfinhofosfolipidy* – ceramid (sfingosin + MK) + fosfát + další složka (je-li jí cholin, jde o sfingomyelin).
- **Glykolipidy** – obsahují ceramid (sfingosin + MK) s navázanou cukernou složkou:
 - *cerebrosidy* – vazba hexosy (Glc, Gal) na ceramid;
 - *gangliosidy* – vazba oligosacharidu s kys. sialovou (N-acetylneuraminovou) na ceramid.

Gaucherova choroba

 Podrobnější informace naleznete na stránce *Gaucherova choroba*.

- **Defekt:** deficit **glukocerebrosidázy** způsobuje hromadění glukocerebrosidů ve slezině (RES) a CNS.
- **Klinické příznaky:**
 - **typ 1:**
 - počátek onemocnění je v dětství, plná manifestace v dospělosti
 - typická je splenomegalie, hepatomegalie je jen mírná, ale je možný vznik cirhózy
 - dochází k infiltraci kostní dřeni, patologickým frakturám a aseptickým nekrózám
 - masivní postižení plic může vést až ke *cor pulmonale*; známa je též kožní hyperpigmentace a koincidence s různými malignitami
 - **typ 2:**
 - mezi základní znaky patří hepatosplenomegalie a těžká neurologická symptomatologie (trismus, strabismus, retroflexe hlavy, progresivní spasticita, hyperreflexie a vznik patologických reflexů, v terminálním stadiu 🧴 hypotonie)
 - **typ 3:**
 - delší průběh nemoci a neuroviscerální symptomatologie kolem 1 - 3 let života, hepatosplenomegalie a později neurologická symptomatologie - ataxie a spastické parézy, poruchy oční motility, mentální retardace a záchvaty (často myoklonie)
- **Mikroskopie:** charakteristickým nálezem jsou tzv. *Gaucherovy buňky* – velké makrofágy strádající lipidy, s „pomačkanou“ cytoplasmou, nejprve se objevují v kostní dřeni, později i jinde (podobné buňky, tzv. gaucheroidní, se vyskytují v kostní dřeni při CML)
- **Diagnóza:** je potvrzena stanovením deficitu aktivity b-glukosidázy v leukocytech izolovaných z periferní krve, nebo kultivovaných kožních fibroblastech; doplňujícím vyšetřením u případů s potvrzenou diagnózou je analýza DNA
- **Prenatální diagnostika:** v rodinách s enzymaticky prokázanou diagnózou je možná analýzou nativních a kultivovaných choriových klků nebo kultivovaných amniocytů
- **Léčba:** i.v. dodáním chybějícího enzymu, inhibice biosyntézy glukocerebrosidu

Farberova choroba

- jedná se o **AR onemocnění**
- **Defekt:** deficit aktivity kyselé **ceramidázy**
- **Klinické příznaky:** poškození podkoží a sliznic deformujícími uzly podmíněnými granulomatosním jizvícím procesem - maximum změn je na kloubech a v okolí šlachových pochev
 - postižení hrtanu vede k chraplivosti až k afonii
 - bylo popsáno též postižení srdečních chlopní, mírná hepatosplenomegalie, retinální změny podobné tzv. "třešňové skvrně"
 - neurologické postižení je méně časté - hypotonie, denervační atrofie a myopatické změny
 - mezi základní znaky forem s pozdním nástupem patří mitigované postižení s protrahovaným průběhem (klinicky podobné klasické Farberově chorobě)
- **Diagnóza:** je potvrzena stanovením deficitu aktivity kyselé ceramidázy v leukocytech izolovaných z periferní krve, nebo kultivovaných kožních fibroblastech
- **Prenatální diagnostika:** v rodinách s enzymaticky prokázanou diagnózou je možná analýzou nativních a kultivovaných choriových klků nebo kultivovaných amniocytů
- **Léčba:** není dostupná

Niemann-Pickova choroba

 Podrobnější informace naleznete na stránce *Niemann-Pickova choroba*.

Autosomálně recesivní dědičná strádavá porucha, patří mezi tzv. **lipidózy** – metabolické poruchy lipidů. Vzniká na podkladě ukládání **sfingomyelinu** v makrofázích retikuloendotelového systému – převážně v játrech, slezině a kostní dřeni.

Jedná se o heterogenní skupinu onemocnění **typu A, B, C**, které se liší metabolickou poruchou – **deficit kyselé sfingomyelinázy** (typ A, B) vs. **porucha transportu lipidů** (typ C).

Akutní formy typické pro dětský věk postihují nervový systém, chronické se projevují později cholestatickým postižením jater, přecházejícím až do cirhózy. Sekundárně dochází ke zvýšení koncentrací neesterifikovaného cholesterolu.

Niemann-Pickova choroba, typ A a B: deficit aktivity kyselé **sfingomyelinázy** (je následkem mutace genu SMPD1, je známo více než 100 mutací)

- **typ A** – mezi základní znaky patří **neuroviscerální postižení** s úmrtím do 1-3 let věku (specifiky zvýšený

výskyt u etnické skupiny aškenázských židů)

- potíže se objevují již v prvních týdnech života
 - projevuje se zvracením, průjmy a celkovým neprospíváním novorozence až kachexií; během pár měsíců progreduje v lymfadenopatii a hepatosplenomegalii (vzácně v cholestatický ikterus)
 - objevuje se svalová slabost, hypotonie, psychomotorická retardace, postupně dochází ke ztrátě motorických funkcí, spasticitě a rigiditě svalstva; na kůži se mohou vyskytovat xantomy hnědožluté skvrny
 - asi u poloviny pacientů se na sítnici objevuje tzv. **třešňová skvrna**
 - pacienti většinou umírají do věku 3 let
- **typ B – chronické** onemocnění (častěji v jižní Evropě a severní Africe), může se projevit kdykoliv od pozdního dětského věku až do dospělosti
- většinou se projevuje **splenomegalii** nebo **hepatosplenomegalii** (těžší onemocnění jater je vzácné)
 - často dochází k **retikulonodulární RTG infiltraci plic** související s intersticiálním poškozením, které se může projevit v různé míře námahovou dušností
 - dochází také ke zpomalení růstu, opoždění kostní věku a puberty
 - intelekt a nervový systém nebývá poškozen
 - dospělí mívají patologický profil lipidů, trombocytopenii a zvýšenou aktivitu jaterních transamináz
 - existují různé závažné formy choroby, většinou s normální délkou života
- **Diagnóza Niemann-Pickovy choroby typu A a B:** je potvrzena stanovením deficitu aktivity kyselé **sfinomyelinázy** v leukocytech izolovaných z periferní krve, nebo kultivovaných kožních fibroblastech; doplňujícím vyšetřením u případů s potvrzenou diagnózou je analýza DNA
- **Prenatální diagnostika:** v rodinách s enzymaticky prokázanou diagnózou je možná analýzou nativních a kultivovaných choriových klků nebo kultivovaných amniocytů; doplňujícím vyšetřením je analýza ultrastruktury choriových klků
- **Léčba:** terapie rekombinantním enzymem se připravuje

Krabbeho choroba (leukodystrofie)

- **Defekt:** deficit aktivity **galaktocerebrosid b-galaktosidázy**
- **Klinické příznaky:** mezi základní znaky patří manifestace po půl roce života a rychlý průběh
 - nejprve je zvýšená iritabilita, hyperestézie, hyperakuzie a zvýšená fotosenzitivita, postupně nastupuje psychomotorická retardace, hypertonie a tonické a klonické záchvaty
 - ve finálním stadiu je decerebrace, opistotonus, slepota, popř. hluchota
 - exitus nastává okolo 2 let
 - laboratorně je nález zvýšené hladiny proteinu v likvoru (zejména albuminu a alfa-2-globulinu) při normálním počtu buněk, atrofie optiku a známky periferní neuropatie (snížena rychlost vedení periferním nervem); EEG může být abnormální, často s fokálními epileptickými záchvaty; na CT a NMR je difúzní atrofie bílé hmoty mozku
 - u forem s pozdním nástupem klinických příznaků patří mezi základní znaky - mentální retardace, pyramidové poruchy, poruchy reakce, porucha zraku
 - protein v likvoru nemusí být zvýšený, rychlost vedení periferním nervem může být normální, nebo snížena
- **Diagnóza:** je potvrzena stanovením deficitu aktivity galaktocerebrosid-b-galaktosidázy v leukocytech izolovaných z periferní krve, nebo kultivovaných kožních fibroblastech
- **Prenatální diagnostika:** v rodinách s enzymaticky prokázanou diagnózou je možná analýzou nativních a kultivovaných choriových klků nebo kultivovaných amniocytů
- **Léčba:** není dostupná

Metachromatická leukodystrofie

- **Defekt:** deficit aktivity **arylsulfatázy A**
- **Klinické příznaky:** mezi základní znaky patří poruchy chůze, mentální regrese, ataxie, ztráta řeči, periferní neuropatie, kvadruparéza, atrofie očního nervu, šedavé zbarvení makuly
 - choroba trvá několik měsíců
 - laboratorně je nález zvýšené hladiny proteinu v likvoru (zejména albuminu a alfa-2-globulinu) při normálním počtu buněk, atrofie optiku a známky periferní neuropatie (snížena rychlost vedení periferním nervem); EEG může být abnormální, často s fokálními epileptickými záchvaty; na CT a NMR je difúzní atrofie bílé hmoty mozku
 - u forem s pozdním nástupem klinických příznaků patří mezi základní znaky mentální retardace, psychotické příznaky, pyramidové poruchy, poruchy reakce, porucha zraku
 - protein v likvoru nemusí být zvýšený, rychlost vedení periferním nervem může být normální, nebo snížena
 - v moči je mnohonásobně zvýšená koncentrace sulfatidu
- **Diagnóza:** je potvrzena stanovením deficitu aktivity arylsulfatázy A v leukocytech izolovaných z periferní krve, nebo kultivovaných kožních fibroblastech; doplňujícím vyšetřením u případů s potvrzenou diagnózou je analýza DNA
- **Prenatální diagnostika:** v rodinách s enzymaticky prokázanou diagnózou je možná analýzou nativních a kultivovaných choriových klků nebo kultivovaných amniocytů
- **Léčba:** není dostupná

Tay-Sachsova choroba (GM2 gangliosidóza)

- **Defekt:** deficit aktivity **N-acetyl-beta-D-glukózaminidázy A**
- **Klinické příznaky:** existují klinické varianty podle doby nástupu choroby a závažnosti projevu
 - u *infantilní formy* patří mezi základní znaky progredující neurologická symptomatologie, hypotonie, myoklonie, křeče, dále třesňová skvrna na očním pozadí, progresivní psychomotorická deteriorace, makrocefalie, a exitus do 2-4 let; frekvence výskytu choroby je vysoká u aškenázských Židů
 - u *infantilního typu s pozdějším nástupem* patří k základním symptomům centrální neurologická symptomatologie a teaurizační retinopatie
 - neurologické postižení je velmi variabilní - může dominovat klasické postižení CNS (dystonie, extrapyramidové příznaky, ataxie), ale může být i obraz juvenilní spinální svalové atrofie (typu Kugelberga-Walanderové), systémové atrofie blízké amyotrofické laterální skleróze nebo progresivní spinocerebelární ataxie Friedreichova typu
 - typické je hromadění GM2 gangliosidu v mozku
- **Diagnóza:** je potvrzena stanovením deficitu aktivity N-acetyl-beta-D-glukózaminidázy A v leukocytech izolovaných z periferní krve, nebo kultivovaných kožních fibroblastech
- **Prenatální diagnostika:** v rodinách s enzymaticky prokázanou diagnózou je možná analýzou nativních a kultivovaných choriových klků nebo kultivovaných amniocytů
- **Léčba:** není dostupná

Fabryho choroba

 *Podrobnější informace naleznete na stránce Fabryho choroba.*

- jedná se o **X vázané** onemocnění, frekvence 1:40 000
- **Defekt:** deficit aktivity **alfa-galaktozidázy A**
- **Klinické příznaky:** mezi základní znaky patří u hemizygotů (mužů) trvalé nebo epizodické akroparestézie nebo palčivá bolest různé intenzity, mírně zvýšená teplota a sedimentace
 - charakteristické jsou výsevy kožních angiokeratomů, zákal rohovky a deformity retinálních a spojivkových cév
 - renální postižení zahrnuje lipidurii, proteinurii a progredující insuficienci
 - kardiovaskulární postižení zahrnuje hypertenzi (renální), hypertrofii myokardu (kardiomegalie) a ischemické změny různých orgánů, zejména mozku
 - může být přítomna centrální neurologická symptomatologie
 - u heterozygotů (žen) je postižení různé - plně vyvinuté příznaky až jejich úplná absence
 - v moči je mnohonásobně zvýšená koncentrace globotriaosylceramidu
- **Diagnóza:** je potvrzena stanovením deficitu aktivity a-galaktozidázy A v leukocytech izolovaných z periferní krve, nebo v kultivovaných kožních fibroblastech; doplňujícím vyšetřením u případů s potvrzenou diagnózou je analýza DNA, pro potvrzení heterozygotního stavu je však nezbytná
- **Prenatální diagnostika:** v rodinách s enzymaticky prokázanou diagnózou je možná v nativních a kultivovaných choriových klcích nebo kultivovaných amniocytech; doplňujícím vyšetřením je analýza ultrastruktury choriových klků
- **Léčba:** terapie je možná i.v. dodáním rekombinantní a-galaktozidázy A

Lyzosomální onemocnění z deficitu enzymových aktivátorů lyzosomálních hydroláz

Existují dva druhy aktivátorů:

- Saposiny = SAP (sfingolipid activator protein) – jedná se spíše o peptidy, obsahují okolo 80 aminokyselin
- GM2 aktivátor

Saposiny

Saposiny vznikají ze společného prekursoru **prosaposinu** (kódován PSAP genem), který je ve fázi časného endosomu proteolyticky rozštěpen na jednotlivé saposiny – saposin A, B, C a D. Saposiny jsou velmi stabilní proteiny – odolávají silným proteázám, vysokým teplotám, jsou extrémně kompaktní a rigidní.

Saposiny jsou aktivátory hydroláz štěpící sfingolipidy

- **SAP A** – aktivátor enzymu galaktosylceramidasy a laktosylceramidasy
- **SAP B** – také GM1, neaktivuje enzym jako takový, ale reaguje se substrátem; jeho funkcí je "vytáhnout" glykolipid (substrát) z membrány lysosomu, tj. bez SAP B je sice hydroláza aktivní, ale nemá co štěpit
- **SAP C** – aktivuje glykosylceramidasy a galaktosylceramidasy; funkcí SAP C je aktivace a připoutání enzymu k membráně
- **SAP D** – účast na degradaci ceramidu

GM2

Funkcí GM2 je "vytáhnutí" glykolipidu (GM2 gangliosidu) z membrány a dovoluje kontakt substrátu s β -hexosamidase; jeho funkce je tedy obdobná jako u SAP B (GM1) – s tím rozdílem, že „vytahuje“ jiný substrát.

Nemoci způsobené deficitem lysosomálních aktivátorů

Obecně jsou tyto onemocnění velmi vzácná, počet nemocných se počítá v řádu desítek, deficit či mutace aktivátorů způsobuje fenotyp příslušné lysosomální sfingolipidosy

- Defekt prosaposinu – působí logicky chybění všech SAP, tj. velmi těžká kompletní sfingolipidosa a novorozenec, popř. kojenec umírá do 4 – 17 týdnů; celosvětově popsáno 6 případů; AR onemocnění
- Deficit nebo mutace **SAP A** způsobuje obraz **Krabbeho choroby**
- Deficit nebo mutace **SAP B** způsobuje obraz **Fabryho nemoci** nebo **metachromatické leukodystrofie** (celosvětově popsáno 15 případů)
- Deficit nebo mutace **SAP C** způsobuje obraz **Gaucherovy choroby** (celosvětově popsány 3 případy)
- Deficit nebo mutace **GM2** způsobuje obraz **Sandhoffovy choroby**
- Deficit **SAP D** nebyl zaznamenán

Podezření na deficit aktivátorů padá v úvahu tehdy, je-li enzym v pořádku, ale i tak jsou přítomny znaky lysosomálního onemocnění.

Odkazy

Použitá literatura

1. MALINOVÁ, Věra a Tomáš HONZÍK. Lysosomální onemocnění - současné možnosti diagnostiky a terapie. *Pediatric pro praxi*. 2013, roč. 14, vol. 2-3, s. 99-103, ISSN 1213-0494.
 - MURRAY, Robert K., Daryl K. GRANNER a Peter A. MAYES, et al. *Harperova biochemie*. 4. vydání. Jinočany : H & H, 2002. 872 s. ISBN 80-7319-013-3.
 - MUDR. M. HŘEBÍČEK, PHD.,. *Dědičné poruchy lyzosomů a peroxisomů* [online]. [cit. 2010-10-30]. <<https://ubeo.lf1.cuni.cz/cesky.htm>>.
 - PASTOR, Jan. *Langenbeck's medical web page* [online]. ©2006. [cit. 2009-09-01]. <<https://langenbeck.webs.com/>>.