

30 let od popsání prvních případů AIDS: historie a současnost

Část II.

30 years since the first AIDS cases were reported: history and the present

Part II.

Marie Brůčková

Souhrn • Summary

V článku je popisována taxonomie, morfologické a biofyzikální vlastnosti viru HIV, jeho replikační cyklus a způsob šíření HIV infekce v lidské populaci. Jsou uvedeny současné možnosti laboratorní diagnostiky HIV/AIDS, základní klinická kritéria pro stanovení diagnózy AIDS a terapeutické postupy. Je diskutován současný stav globální epidemie HIV/AIDS a základní preventivní opatření.

The HIV taxonomy, morphology, biophysical properties, replication cycle, and mode of HIV transmission in the human population are described. The state of the art laboratory diagnosis of HIV/AIDS, major criteria for the clinical diagnosis of AIDS, and therapeutic options for patients with AIDS are presented. The global HIV/AIDS epidemic and relevant prevention activities are discussed.

Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2012; 21(2): 58–63.

Klíčová slova: HIV-1, virový genom, AIDS, antiretroviróvá terapie, globální epidemie, prevence
Keywords: HIV-1, viral genome, AIDS, antiretroviral therapy, global epidemic, prevention

ÚVOD

V I. části sdělení [Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2011; 20(12): 435–438] jsme krátce popsali výskyt prvních případů nového infekčního onemocnění- AIDS, objev jeho virového původce – HIV a základní charakteristiky šíření AIDS v lidské populaci. V této části se budeme podrobněji věnovat popisu některých taxonomických a biofyzikálních vlastností viru HIV, mechanismu jeho množení v cílových buňkách napadeného organismu, způsobech přenosu a důvodech jeho globálního epidemického šíření zejména v některých regionech a specifických populačních skupinách. Uvedeme některé charakteristické klinické projevy onemocnění AIDS podle definice užívané pro surveillance HIV/AIDS. Zmíníme též možnosti léčby a prevence šíření HIV/AIDS.

Virus HIV

Taxonomie HIV je uvedena v **tabulce 1**. HIV patří do skupiny retrovirů, kam se řadí jedny z nejdéle známých virů.

Tabulka 1: TAXONOMIE HIV – RETROVIRY

ČELEĎ <i>Retroviridae</i>	
PODČELEĎ:	<i>Oncovirinae</i>
ROD:	Onkovirus (RNA nádorové viry, HTLV - I, HTLV - II)
PODČELEĎ:	<i>Lentivirinae</i>
ROD:	Lentivirus (HIV - like viry, Maedi/visna - like viry)

Jejich společnou vlastností je schopnost přepisovat vlastní genetickou informaci, nesenou RNA, do DNA napadené buňky. V přírodě je tento proces velmi neobvyklý, obvyklý je postup opačný - přepis DNA na RNA. Retrovirům umožňuje tuto nezvyklou dráhu enzym *reverzní transkriptáza*, který je integrální součástí virového genomu.

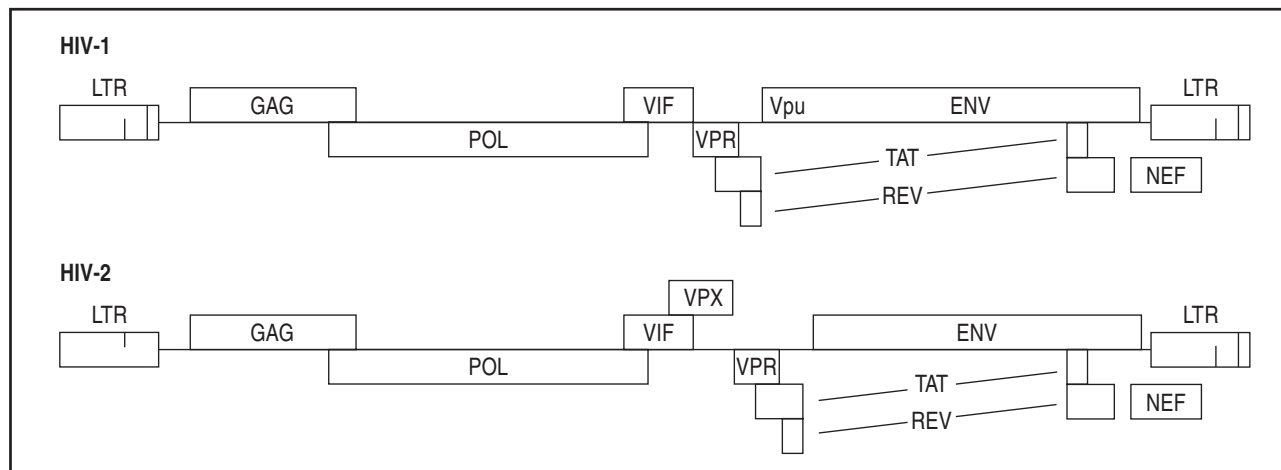
Další společnou charakteristikou retrovirů je dlouhé období latence, kdy virová genetická informace je sice zabudovaná do chromozomálního aparátu napadené buňky, společně s ní se množí, ale po dlouhou dobu infikované buňky přežívají bez zásadního funkčního poškození. Infekce se neprojevuje v tomto období klinickými příznaky a je rozpoznatelná pouze laboratorními testy. Proto do skupiny retrovirů spadají také tak zvané *pomalé viry*, „zabíjáci“, vyznačující se dlouhou perzistencí v organismu bez známek jeho poškození. Většinou mají afinitu k CNS, vyskytují se hlavně u zvířat. Dlouhodobý infekční proces končí smrtí (Visna, Maedi viry vykytující se u ovcí a aleutských minků). Někteří sebekritičtí virologové humorně tvrdí, že neexistují pomalé viry, pomalí jsou jen virologové!

Velkou podskupinou retrovirů jsou **lidské onkogenní viry**, způsobující některé druhy leukemií. Mezi ně také američtí autoři HIV původně řadili pod názvem HTLV-III (viz I. část publikace). Stejně tak do skupiny retrovirů patří viry vyvolávající nádorová onemocnění u zvířat, zejména drůbeže.

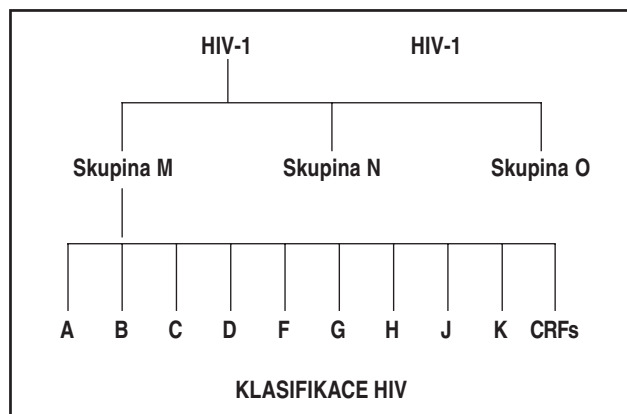
Při dalších studiích bylo zjištěno, že virus HIV se vyskytuje ve dvou typech, označovaných jako HIV-1 a HIV-2. Rozdíly v genetické skladbě virů HIV-1 a HIV-2 jsou velmi malé (**Obr. 1**). Podrobně charakterizované kmeny HIV-1 se pak řadí do 3 velkých skupin - podtypů HIV-1 značených M, N a O. Skupina M (Major) je největší a dělí se dále na různé kmenové varianty označované alfabeticky (dosud A- L, CRF - Cirkulující Rekombinantní Formy). U viru HIV-2 nebyly rozpoznány žádné subtypy. **Obr. 2**

Virus HIV patří mezi malé až středně velké viry (30-100 nm). **Obr. 3** Jeho partikule mají sférický tvar s jasně

Obrázek 1: GENETICKÁ SKLADBA HIV-1 A HIV-2



Obrázek 2: SUBTYPY HIV-1 a HIV-2

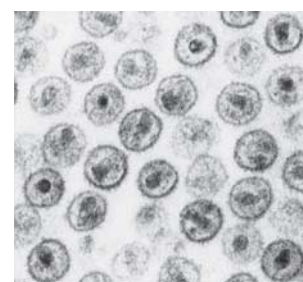


vyznačenými povrchovými strukturami (spikes) a denzním jádrem v podobě malého oříšku (snad čínského), jak morfologicky vystižně popsala jedna z nejznámějších elektronových mikroskopiček June Almeida.

Morfologií, velikostí, strukturálním uspořádáním, biofyzikálním složením i některými vlastnostmi je HIV podobný virům chřipky. Patří mezi tzv. obalené viry či viry s obálkou (envelope), tvořenou lipoproteiny. Z obalu vyčnívají výběžky (spikes), morfologií podobné houbičkám na tenké nožce - glykoproteiny o molekulové hmotnosti 40 a 120 kilodaltonů (gp 40 a gp 120). Tyto povrchové struktury jsou imunogenní (tvoří se proti nim protilátky) a velmi mutagenní – stejně jako podobné struktury u chřipkových virů. Udává se však, že viry HIV jsou až 100x mutagennější než viry chřipky. Vlastní jádro viru tvoří proteinový obal p24 a p17, který kryje virový genetický materiál, to je dvoušroubovice RNA a enzymové vybavení viru (jak znázorňuje schématický obr. 4). Podrobné molekulární studie genetické skladby viru HIV prokázaly přítomnost tří genů strukturálních, označených jako *env*, *gag*, *pol*, které kódují různé virové struktury a řadu genů regulačních, které kódují různé virové funkce (funkce některých z nich není dosud přesně známa). (Tab. 2, 3)

Virus HIV má velmi unikátní replikační cyklus. Zjednodušené schéma ukazuje obr. 5. Pro infekci buňky virem HIV je nutná přítomnost receptoru CD4+ na jejím povrchu a součinnost dalších buněčných koreceptorů jako CCR5,

Obrázek 3: ELEKTRONMIKROSKOPICKÝ SNÍMEK HIV



Tabulka 2: STRUKTURÁLNÍ GENY HIV

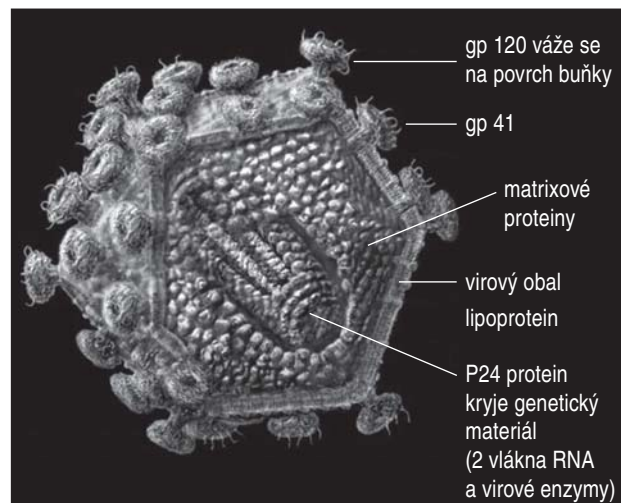
Gen a genový produkt	Popis a funkce
env (envelope)	
gp 160	prekurzor <i>env</i> glykoproteinu
gp 120	vnější <i>env</i> glykoprotein
gp 41	transmembránový glykoprotein
gag (core)	
p 55	prekurzor <i>gag</i> proteinů
p 24	kapsidový protein (CA)
p 17	matrix úproteín (MA)
p 15, p 9, p 7	protein vázící se na nukleovou kyselinu (NC)
pol (polymerase)	
p 66/51	reverzní transkriptáza (RT)
p 31	endonukleáza/integráza
p 11	proteináza

CXCR4. Povrchové virové struktury se spojí s povrchovými buněčnými receptory (zámek-klíč) a umožní průnik viru do buněčné cytoplasmy. Virus se tak zvaně svlékne, odhodí svůj plášť (uncoating), obnaží svůj genom a pomocí enzymu reverzní transkriptázy přepíše svou RNA na DNA. Ta se pomocí dalšího virového enzymu, integrázy zabuduje do jaderného chromozomálního vybavení napadené buňky. Virový genetický signál zůstává v buňce po celý její život a spolu s ní se dělí a přenáší na potomstvo. Kromě toho se HIV replikuje také horizontálně, kdy buňka začíná

Tabulka 3: REGULAČNÍ GENY HIV

Gen a genový produkt	Popis a funkce
Tat (transactivator) p 14	transaktivátor virových proteinů
Rev (regulator of expression of virion proteins) p 19/20	reguluje expresi virových proteinů
Vif (virion infectivity factor) p 23	určuje virovou infektivitu
vpr	neznámá funkce
nef (negative factor) p 27	redukuje virovou expresi
vpu (jen u HIV-1) p 14/16	morfogeneze a maturace
vpx (jen u HIV-2)	neznámá funkce (snížení patogenity ?)

Obrázek 4: SCHÉMATICKÝ OBRÁZEK HIV



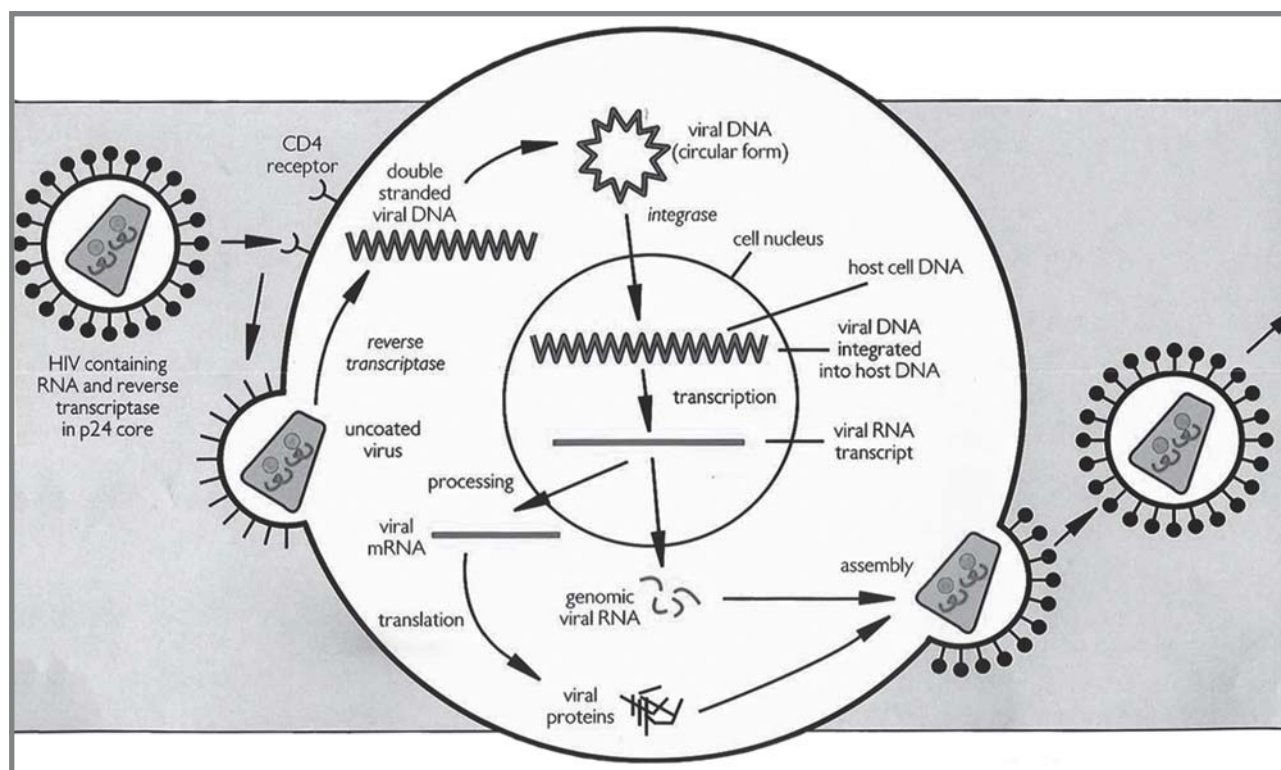
opačným pochodem přepisovat virovou DNA na RNA, která se shromažďuje v cytoplazmě, obaluje proteiny působením enzymu proteázy a shromažďuje se jako inkompletní virus u buněčné stěny. Tou posléze proniká procesem zvaným pučením a získává z ní glykoproteiny pro dokončení stavby kompletního virionu schopného infikovat další citlivé buňky.

Reakci buňky na infekci HIV ukazuje další schéma - viz obr. 6. Výše popsaným procesem se HIV virový signál zabuduje do jádra napadené buňky a v ní po určitou dobu přetrvává aniž by ji nějak funkčně poškozoval (latentní stádium). Po té následuje fáze chronická, kdy buňka intermitentně začne v malém množství vylučovat nové virové partikule, její metabolismus i funkce začínají být poškozené,

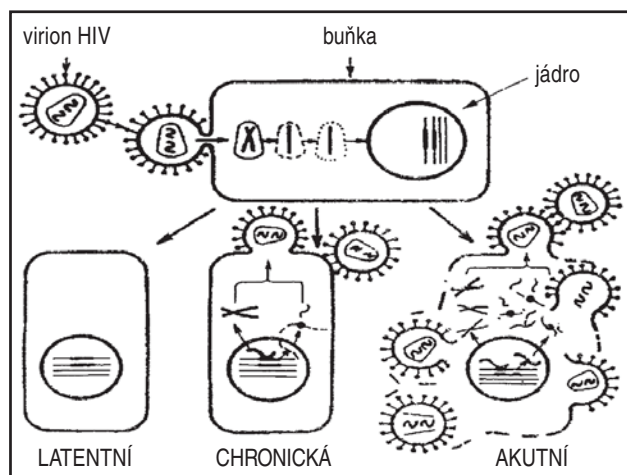
až posléze nastoupí fáze akutní, kdy buňka na úkor vlastního metabolismu a replikace syntetizuje velká kvanta nových virových partikulí a posléze zmírá.

Takto tedy probíhá HIV virová infekce (velmi zjednodušeně popsaná) na buněčné úrovni. Jak reaguje celý infikovaný organismus schematicky znázorňuje obr. 7. Po vstupu viru do cílových buněk začíná velmi rychlá replikace a vylučování viru – někteří autoři uvádějí, že k tomu dochází už za 3 hodiny po vstupu viru do organismu a že již v této fázi je infikovaný člověk vysoce infekční pro své okolí. Následuje tzv. akutní období, které se klinicky vyznačuje nikterak typickými příznaky, spíše upomínajícími na respirační onemocnění: zánět nosohltanu, bolesti hlavy, zvýšená teplota až horečka, zduření mízních uzlin (ponej-

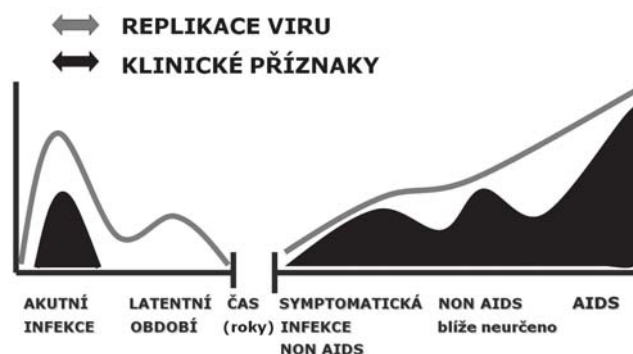
Obrázek 5: SCHÉMA REPLIKAČNÍHO CYKLU HIV



Obrázek 6: REAKCE BUŇKY NA INFEKCI HIV



Obrázek 7: PRŮBĚH INFEKCE HIV



více krčnic), celková únavnost, malátnost. Snad jediným typickým příznakem, ne však vždy přítomným, je prchavý exantém, který připomíná „lékovou vyrážku“ a obvykle velmi rychle vymizí. Někdy jsou tyto příznaky akutní infekce HIV tak nenápadné, že nevyžadují ani lékařskou konzultaci a obvykle spontánně mizí. Z hlediska epidemiologického je tato fáze velmi nebezpečná, protože zdánlivě zdravý člověk o své infekci neví a může ji tak bez zábran dále šířit.

Po akutní fázi dochází k omezenému vyplavování HIV virových partikulí do krevního oběhu, ačkoliv replikace viru intenzivně pokračuje, ale zůstává omezena na mízní uzliny. Hodnoty tzv. virové nálože (počet HIV RNA kopií v plazmě) se dostávají v tomto období k neměřitelným hodnotám. Nastává dlouhá doba latence („němá infekce“), dochází jen k intermitentnímu vylučování viru v nízkých koncentracích do krve a ani klinicky se infekce nikterak významně nemanifestuje. Toto období se v současné době, zejména se zdokonalováním specifické terapie, prodlužuje a počítá na roky.

Velmi zejména diagnosticky významným procesem je **tvorba protilátek**. Protilátky proti povrchovým glykoproteinům HIV se vytvářejí individuálně za různé dlouhou dobu, odhaduje se, že nejdříve za 10–21 dnů po vstupu HIV do organismu, nejpozději však do 2–3 měsíců po infekci. Vytvářejí se a spolehlivě identifikují u všech infikovaných osob. Přetrvávají po celý život infikovaného jedin-

ce, dají se prokazovat i v krvi odebrané post mortem. Tyto protilátky však, bohužel, nemají protektivní charakter. To je jedna ze zvláštností HIV infekce (někteří nazývali tyto zvláštnosti „mystérii“ HIV infekce).

Stanovení diagnózy AIDS

Po různě dlouhé době latence dochází na nějaký podnět, či spíše soubor podnětů, k extrémně vysokým hodnotám vylučování HIV do krve, úbytku buněk imunitního systému (zejména CD4 buněk) a nastupuje rozvoj klinických příznaků infekce. Ty jsou především vyjádřeny jako následek zhroucení imunitního systému výskytem nejprve malých, posléze i velkých oportunních infekcí bakteriálního, virového, mykotického a parazitárního původu, často se vyskytuje i nádorové bujení související se ztrátou imunity. V této době se již stanoví diagnóza plně rozvinutého onemocnění AIDS, které bohužel, dříve či později končí úmrtím. Podle klinických příznaků se HIV infekce zařazuje do 4 stádií, z nichž posledním je AIDS. Pro účely surveillance se používá mezinárodně stanoveného schématu, specifikujícího 32 oportunních infekcí a nádorových onemocnění, která HIV infikovaného pacienta řadí do množiny AIDS nemocných. Kromě oportunních infekcí a nádorových onemocnění sem patří i výrazné poškození CNS a tak zvaný wasting syndrom, celková zchátralost s enormním úbytkem hmotnosti (koncentračnický vzhled).

Kolik HIV infikovaných se dostane až do terminálního stádia AIDS, končícího smrtí, není dosud přesně známo. Někteří říkají že 100 % infikovaných, jiní se domnívají že ne všichni tak končí. Co je ale jisté, že AIDS nelze vyléčit, ale lze jej úspěšně léčit, život infikovaného zkvalitnit a prodloužit. Dosud se totiž přes veškerá úsilí nepodařilo virus HIV z napadeného organismu vyloučit, jen potlačit jeho množení. Nicméně ani 30 let výskytu a zkoumání AIDS není dostatečně dlouhá doba pro stanovení obecně platných závěrů.

Stejně tak není dosud přesně známo, jaké klinické projevy se u kterého z HIV infikovaných pacientů rozvinou. V začátcích to byla velmi často pneumocystová pneumonie (PPC-*Pneumocystis carinii* pneumonia) a Kaposiho sarkom, nyní vzhledem k možnostem profylaktického používání různých léčiv se spektrum infekcí mění. V případě *Pneumocystis carinii* je nutno uvést přínos našeho světově významného parazitologa akad. prof. O. Jírovce, který jako první popsal výskyt pneumocystové pneumonie u novorozenců, vesměs s fatálním koncem. Na jeho počest byl organismus *Pneumocystis carinii* posléze přejmenován na *Pneumocystis jiroveci* (posmrtně). Je však ironií osudu, že tento organismus, který prof. Jírovec celý život pokládal za parazita, byl po důkladných studiích zařazen mezi houby.

Základy terapie HIV/AIDS

V počátcích bylo onemocnění AIDS označováno jako „onemocnění mnoha tváří“, které postihovalo všechny tělesné orgány a systémy. V poslední době se AIDS specifikuje jako chronické systémové onemocnění. Jeho léčba je komplexní, individuálně „šitá na míru“ každému z HIV infikovaných pacientů. Základem je antiretrovirá terapie, která se snaží potlačit replikaci viru se všemi jejími nežádoucí-

mi účinky. Tato terapie využívá poznatků ze studia množení viru v buňce a snaží se zasáhnout v citlivých místech jeho replikace. Je to zejména blokáce viru při vstupu do cílové buňky, kdy vedoucí roli hraje virový enzym reverzní transkriptáza. V začátcích léčby byl jediným dostupným antiretrovirovým preparátem inhibitor reverzní transkriptázy pod názvem zidovudin. Jednalo se o klasickou monoterapii. Postupem doby se objevovaly další preparáty, zasahující v různých fázích virového replikačního cyklu (inhibitory virové proteázy, integrázy či inhibitory ovlivňující proces fúze viru s buňkou), až se došlo k tzv. cART (kombinovaná antiretrovirální terapie) – kombinaci několika účinných antiretrovirových preparátů. Jejich základem bývá často výše zmínovaný inhibitor reverzní transkriptázy. V otázce vývoje nových antiretrovirových preparátů je významným, světově uznávaným odborníkem prof. A. Holý, emer. ředitel Výzkumného ústavu organické chemie a biochemie ČAV, který se podílel na vývoji a syntéze několika úspěšných antiretrovirových preparátů

Otázkou zůstává, kdy tuto antiretrovirovou terapii nasadit. Její užívání není totiž bez vedlejších účinků a pro pacienta přináší zátěž a nepohodlí. Zdá se, že převládajícím názorem je započítí léčby jakmile HIV virová nálož (viral load) stoupne nad 200 HIV RNA kopií /ml plazmy. Komplikujícím faktorem je také snadný vzestup rezistence na podávaná antiretrovirovika. Adherence na léčebný postup je u HIV pozitivního pacienta nesmírně důležitým faktorem pro úspěšnost léčby.

Další nedílnou součástí terapie HIV/AIDS je podávání profylaktických preparátů k zamezení nejčastěji se vyskytujících doprovodných (oportunních) infekcí u HIV pozitivních osob. Klasickým případem této možnosti je např. profylaxe pneumocystové pneumonie, která prakticky vymizela v rozvinutých zemích jako příčina úmrtí u HIV pozitivních pacientů. Totéž se týká profylaxe toxoplazmové infekce a řady dalších (včetně TBC).

Samozřejmou součástí léčby jsou další běžné léčebné postupy používané u ostatních pacientů při řešení jejich aktuálních zdravotních potřeb.

Globální epidemie HIV/AIDS

Vzplanutí globální epidemie HIV/AIDS samozřejmě souvisí se způsobem přenosu viru HIV. Dosud platí jen 3 možné způsoby přenosu HIV: krevní cestou, pohlavním stykem a přenos z matky na dítě. Přenos **krevní cestou** se podařilo velmi brzy omezit testováním krve a krevních derivátů pro terapeutické podání na přítomnost HIV protilátek. Do této skupiny také patří přenos HIV mezi injekčními uživateli drog. **Sexuální styk**, zejména homosexuální praktiky, jsou v současné době nejčastějším způsobem přenosu HIV na celém světě. **Přenos HIV z matky na dítě** (vertikální přenos) se podařilo značně omezit, zejména v rozvinutých zemích, používáním specifické profylaxe u matky i novorozence a omezením kojení u HIV pozitivních matek.

K upřesnění je nutno dodat, že globální epidemie HIV/AIDS je způsobena virem **HIV-1**. Virus HIV-2 se vyskytuje jen v Africe, zejména na východním pobřeží (Pobřeží slonoviny). Má zřejmě méně agresivní patologii než HIV-1,

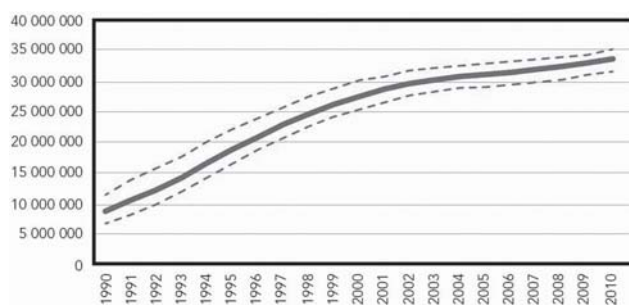
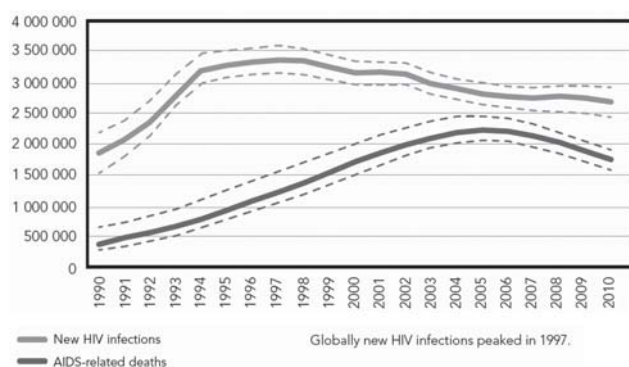
vyvolává mírnější klinické projevy (slim disease) a velmi pomalu se šíří. Jeho výskyt nebyl zaznamenán na americkém kontinentu, v Evropě jen v Portugalsku, kde epidemie HIV/AIDS je vyvolána u poloviny diagnostikovaných případů virem HIV-2. Plyne to z významného mořeplaveckého styku Portugalska se západním africkým pobřežím. Z Portugalska se HIV-2 dostal do Španělska spolu s portugalskými dělníky, ale dále do Evropy se nerozšířil. Výskyt několika málo případů byl vždy spojen s pobytem v inkriminované oblasti a dále se nešířil.

Globální epidemie HIV/AIDS se skládá z jednotlivých sukcesivních regionálních epidemií. První, nejvyšší a dosud přetrvávající vysoký výskyt byl zaznamenán v Africe, zejména její subsaharské části. K dalšímu rozšíření došlo v severní části amerického kontinentu (USA), kam se dostal HIV zřejmě jednak přímo z Afriky, jednak přes Haiti (viz I. část publikace). Poté nastoupila západní část Evropy, později část centrální a nejmladší je epidemie HIV/AIDS v Evropě východní (Ukrajina, Bělorusko, Rusko a Pobaltské státy). Později než Evropa byla také postižena Jižní Amerika a asijský kontinent, kde nejdříve byla epidemie HIV/AIDS hlášena z Jihovýchodní Asie.

Způsoby šíření HIV/AIDS se také regionálně liší. V opožděné epidemii HIV/AIDS v zemích východní Evropy se infekce nejvíce šířila a dosud šíří mezi injekčními uživateli drog. Klasickým příkladem tohoto způsobu přenosu HIV je Polsko, kde navíc zanechalo šíření HIV mezi narkomany těžké následky ve formě přenosu infekce z matky na dítě. Navíc bylo zjištěno, že virus HIV obsahovala vstříkovaná podomácku vyráběná halucinogenní látka tzv. „kompot“ (výluh ze zevního obalu makovic). Nicméně Polsko dokázalo s použitím širokého spektra intenzivních preventivních aktivit šíření epidemie efektivně zbrzdřit.

Homosexuální přenos HIV je daleko snadnější než přenos heterosexuální. Plyne to z rozdílného způsobu tohoto styku. Styk homosexuální je především styk anální. Je známo, že střevní sliznice je bohatá na buňky k infekci HIV vnímavé, navíc tento styk bývá často krvavý. Přináší tedy skutečně vysoké riziko s dobrými podmínkami pro přenos viru HIV. Poševní sliznice a sekret ženského genitálu obsahuje relativně nízký počet HIV infikovaných buněk a proto styk per vaginam je pro muže méně nebezpečný. Přenos HIV z muže na ženu je daleko vyšší – mužský ejakulát obsahuje vysoký počet virových partikulí a snadno infikuje slizniční buňky ženských genitálií. Je známo, že k infekci virem HIV je zapotřebí jeho velká koncentrace. Proto se také prokázalo, že prostitutky (komerční sexuální pracovnice) nejsou tím nejdůležitějším článkem v procesu šíření HIV/AIDS.

Obecně se zdá, že v současné době dosáhla epidemie HIV/AIDS svého vrcholu v zemích průmyslově vyspělých, nicméně v různých světových regionech a kontinentech jsou stále počty nově infikovaných osob a osob žijících s HIV/AIDS alarmující. Jak ukazují čísla UNAIDS (United Nations AIDS Programme) z r. 2010. **Grafy 1 a 2**. Co se týče dětí (děti = věková skupina do 15 let), jedná se většinou o infekce přenesené z HIV infikované matky na dítě i když aktivně získané infekce jsou také zaznamenávány (dětská prostituce).

Graf 1: POČET LIDÍ ŽIJÍCÍCH S HIV, 1990–2010
(UNAIDS, WHO 2011)**Graf 2: Počet nových HIV infekcí a počet úmrtí na AIDS v letech 1990–2010**
(UNAIDS, WHO 2011)

Prevence HIV/AIDS

Specifická prevence ve formě efektivní HIV vakcíny není dosud, přes velké celosvětové úsilí renomovaných pracov-

níků na nejrenomovanějších pracovištích, k dispozici. Byly sice vyvinuty nejrůznější typy vakcín na nejrůznějších podkladech, některé z nich se dostaly až do fáze klinických zkoušek. Některé navodily i vysokou tvorbu specifických protilátek, nicméně protektivní charakter nevykazovaly. Má to řadu konkrétních příčin včetně vysoké mutagenosti viru HIV (není účelem tohoto článku je rozebírat), nicméně někteří špičkoví světoví imunologové, vakcinologové a virologové jsou tak skeptičtí, že možnost konstrukce účinné HIV vakcíny popírají až vylučují.

Zbývá tedy prevence založená na výchově a osvětě, zejména populačních skupin ve vysokém riziku infekce. Široce založená, moderní osvětová činnost u mladistvých by měla jít ruku v ruce s výchovou morální a etickou. To je úkol přetěžký, který nespočívá jen na bedrech odborníků, ale celé lidské společnosti.

Závěrem je možno říci, že odhadnout další průběh globální epidemie HIV/AIDS je nesnadný úkol. Přímou se nabízí hezký anglický výraz, „unpredictable“, který někteří v tomto případě užívají. Epidemii, její konec či další vzplanutí, skutečně předpovědět nelze. Nicméně pesimismus v boji proti ní rozhodně není na místě.

Po domluvě autorky i šéfredaktorů, bude článek uveřejněn souběžně i v časopise *Epidemiologie, mikrobiologie a imunologie*.

Marie Brůčková
emeritní vedoucí NRL pro AIDS
marie.bruckova@centrum.cz

Pozn. Použité obrázky, tabulky, schémata a grafy jsou z archivu autorky textu. Za pomoc při jejich grafickém zpracování a uspořádání děkujeme Mgr. Martě Marešové.