

INTENZIVNÍ MEDICÍNA

PŮVODNÍ PRÁCE

Hodnocení tkáňové perfuze metodou indikátorové mikrodialýzy se značenou vodou na modelu hemoragického šoku u potkanů

Šitina M., Černý V.

Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny, Univerzity Karlovy v Praze, Lékařské fakulty v Hradci Králové a Fakultní nemocnice Hradec Králové

Souhrn

Cíl: Posoudit schopnost indikátorové mikrodialyzační techniky s $^3\text{H}_2\text{O}$ detekovat změny regionální tkáňové perfuze v kosterním svalu a játrech na modelu hemoragického šoku u potkana.

Metodika: U 9 potkanů byla mikrodialyzační sonda zavedena do stehenních svalů a jater a byla perfundována roztokem obsahujícím $^3\text{H}_2\text{O}$. U 6 potkanů byl navozen hemoragický šok opakovanými odběry krve, 3 potkani byli použiti jako kontrolní skupina. Byly opakovaně měřeny poměry $A_{\text{out}}/A_{\text{in}}$ značené vody, laktát a pyruvát v dialyzátu a byl dopočítán poměr laktát-pyruvát (L/P). Statistická analýza byla provedena s použitím Spearmanova korelačního koeficientu a T-testu, $^*p = 0,05$.

Výsledky: Nebyla nalezena statisticky významná závislost mezi krevními ztrátami a poměrem $A_{\text{out}}/A_{\text{in}}$ ve svalu ($r = 0,49$) ani v játrech ($r = 0,23$), ani mezi koncentrací laktátu v dialyzátu a poměrem $A_{\text{out}}/A_{\text{in}}$ ve svalu ($r = 0,29$) ani v játrech ($r = -0,15$). Pro závažnější stupně krevních ztrát byl nalezen signifikantní rozdíl v koncentraci laktátu i poměru L/P mezi zvířaty s hemoragickým šokem a kontrolní skupinou.

Závěry: Mikrodialýza s $^3\text{H}_2\text{O}$ nemůže být použita jako senzitivní metoda pro posouzení změn regionální tkáňové perfuze během hemoragického šoku u potkana. Měření laktátu, pyruvátu a poměru L/P v mikrodialyzátu se zdá být vhodnější metodou pro posouzení tkáňové hypoperfuze u hemoragického šoku.

Klíčová slova: mikrodialyzační technika s $^3\text{H}_2\text{O}$ – poměry značené vody, laktátu a pyruvátu v dialyzátu – poměr laktát-pyruvát – závažný stupeň krevních ztrát

Abstract

Evaluation of tissue perfusion by microdialysis technique with $^3\text{H}_2\text{O}$ indicator in the rat model of haemorrhagic shock

Objective: To evaluate the indicator microdialysis technique with $^3\text{H}_2\text{O}$ as a method of estimation of local blood flow in skeletal muscle and liver in the rat model of haemorrhagic shock.

Methods: Microdialysis probes were inserted in the hind limb muscle and liver of 9 rats and perfused with perfusate containing $^3\text{H}_2\text{O}$. Haemorrhagic shock was induced in 6 rats by repeated exsanguinations and 3 rats were used as the control group. The outflow-to-inflow ratio of water activity, lactate and pyruvate in the dialysate were repeatedly measured and the lactate to pyruvate ratio (L/P) was calculated. Spearman correlation coefficient and T-test were used for statistical analysis, $^*P = 0.05$.

Results: There was no correlation between the blood loss and the outflow-inflow ratio in either the muscle ($r = 0.49$) or the liver ($r = 0.23$). Similarly there was no correlation between the lactate concentration in the dialysate and the outflow-inflow ratio in both the muscle ($r = 0.29$) and the liver ($r = -0.15$). Significant difference in both the lactate concentration ($P < 0.05$) and L/P ratio ($P < 0.05$) between the rats with haemorrhagic shock and the control animals was found in more severe grades of blood loss.

Conclusions: Microdialysis with $^3\text{H}_2\text{O}$ cannot be used as a sensitive method for estimation of the regional blood flow changes during haemorrhagic shock in rats. Measuring the lactate, pyruvate and L/P ratio in the microdialysate seems to be a better method for estimation of tissue hypoperfusion due to haemorrhagic shock.

Key words: microdialysis technique with $^3\text{H}_2\text{O}$ – ratio of water activity, lactate and pyruvate in the dialysate – lactate to pyruvate ratio – severe grades of blood loss

Anest. intenziv. Med., 17, 2006, č. 4, s. 203–207.

Úvod

Indikátorová mikrodialyzační technika [1] je jednou z metod měření regionální tkáňové perfuze, která využívá závislosti mezi tkáňovou perfuzí a rychlostí elimi-

nace indikátoru z mikrodialyzační sondy. Závěry dosud provedených studií [2, 3, 4, 5, 6, 7], zabývajících se indikátorovou mikrodialyzační technikou jako metodou k posouzení tkáňové perfuze, jsou rozporuplné.

Cílem studie bylo posouzení schopnosti indikátorové mikrodialyzační techniky detekovat změny tká-

ňové perfuze *in vivo* na modelu hemoragického šoku u potkana. Testovanou hypotézou byl předpoklad závislosti aktivity značeného indikátoru na stupni tkáňové hypoperfuze vzniklé v důsledku krevní ztráty.

Soubor a metody

Protokol studie byl schválen Odbornou komisí pro ochranu zvířat proti týrání Lékařské fakulty v Hradci Králové. Studie byla prováděna v souladu se standardními pravidly pro humánní zacházení s experimentálními zvířaty.

Jako experimentální zvířata byli použiti samci potkana kmene *Wistar* o hmotnosti 280–320 g (objem krve 6–7 ml/100 g). Den před zahájením experimentu byly v celkové anestezii Pentobarbitalem v dávce 50 mg/kg intraperitoneálně (i. p.) vypreparovány *a. carotis sin.* a *v. jugularis dx.*, do kterých byly zavedeny kanyly se zatavenými konci naplněné heparinem. Kanyly byly vyvedeny po stranách krku mimo operační ránu. Po odeznění anestezie byla zvířata umístěna zpět do chovné klece. Následující den před zahájením vlastního experimentu byl zvířatům podán Pentobarbital v dávce 50 mg/kg i. p. a zvíře bylo fixováno k operačnímu stolku. Bylo provedeno napojení arteriálního katétru na monitor, žilní kanyla byla napojena na injekční stříkačku s fyziologickým roztokem. Poté byla provedena horizontálním řezem ve výši pod štítnou chrupavkou tracheostomie. Do průdušnice byla zavedena periferní žilní kanyla 16 G, která byla zkrácena na délku cca 3 cm, vzdálenost zavedení kanyly byla cca 8–10 mm od úrovně stomatu; kanyla byla následně fixována cirkulárním stehem k průdušnici. Zvířata byla ponechána spontánně ventilující. Anestezie byla udržována podáním Pentobarbitalu 10 mg/kg i. p. při známkách nedostatečné hloubky anestezie (např. pohyb vousů, končetin, dolní čelisti, prudký nárůst arteriálního tlaku apod.).

Kontinuálně byl monitorován arteriální tlak a rektální teplota (monitor Datex-Ohmeda, USA), jejíž hod-

nota byla pomocí termolampy udržována v rozmezí 36,5–38,0 °C.

Zavedení mikrodialyzačních sond: První sonda (CMA20, CMA, Švédsko) byla zaváděna do levostranného *m. quadriceps femoris* po předchozí preparaci svalu do hloubky cca 2 cm a fixována stehem ke kůži. Druhá sonda (CMA20, CMA, Švédsko) byla zaváděna z horní střední laparotomie do *lobus dexter medialis* jater, punkce pouzdra jater před zavedením vlastní mikrodialyzační sondy byla provedena jehlou 18 G.

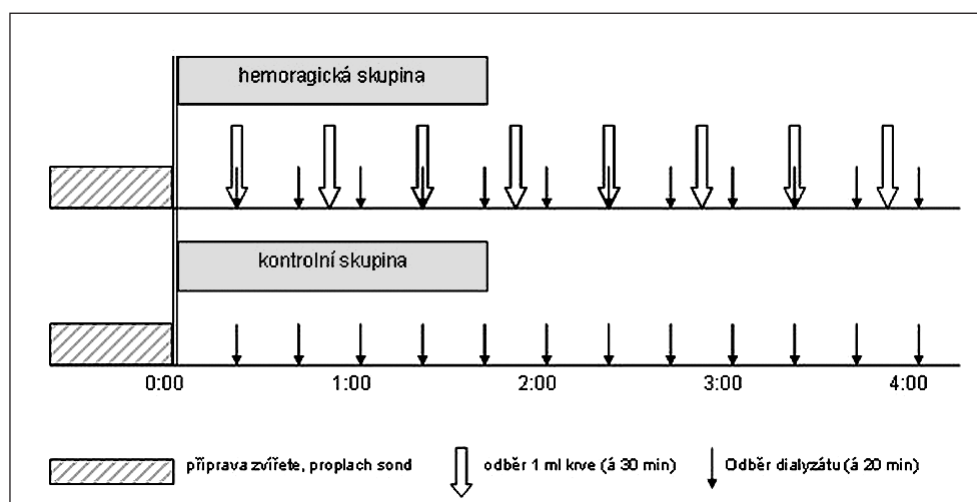
Zvířata byla rozdělena do dvou skupin – hemoragické a kontrolní. U hemoragické skupiny byl navozen kontrolovaný hemoragický šok opakovanými odběry (každých 30 minut) 1 ml krve z *v. jugularis* až do úmrtí zvířete. První odběr následoval 20 minut po zahájení experimentu. U kontrolní skupiny nebyly prováděny krevní odběry, po 4 hodinách trvání experimentu byla zvířata usmrcena vykrvením (obr. 1).

Mikrodialyzační sondy byly připojeny k originální 1 ml stříkačce (CMA102, CMA, Švédsko) naplněné fyziologickým roztokem s příměsí $^3\text{H}_2\text{O}$ technikou zabraňující vstupu vzduchu do sondy. Před zahájením vlastního experimentu byly sondy *in situ* 30 minut promývány fyziologickým roztokem s indikátorem (značená voda, $^3\text{H}_2\text{O}$, aktivita perfuzátu cca 15 kBq/ml) rychlostí 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ mikrodialyzační pumpou (CMA102, CMA, Švédsko). Během vlastního experimentu jsme pokračovali s perfuzí stejným roztokem rychlostí 2 $\mu\text{l}/\text{min}$. Dialyzát byl sbírán do plastových mikrozkrumavek ve 20minutových intervalech (cca 40 μl dialyzátu na vzorek). První výměna mikrozkrumavek (respektive odběr dialyzátu) proběhla 20 minut po zahájení experimentu, těsně před prvním odběrem krve.

Aktivita $^3\text{H}_2\text{O}$ ve vzorcích byla stanovena hned po dokončení experimentu tentýž den. 15 μl ze vzorku bylo napipetováno do 10 ml Brayova roztoku (převádí beta záření na světelné scintilace) a scintilace, respektive aktivita vzniklého roztoku, byla změřena na analyzátoru LS6000 Analyzer (Beckman Instruments, USA). Z naměřené aktivity dialyzátu (A_{out}) a perfuzátu (A_{in}) byl kalkulován poměr $A_{\text{out}}/A_{\text{in}}$. Zbýlý

objem vzorků s dialyzátem byl do následující analýzy zamrazen při teplotě -5°C . Po rozmrazení byla v dialyzátu stanovena koncentrace laktátu a pyruvátu a kalkulován poměr laktát/pyruvát. Analýza obou látek byla provedena na analyzátoru ISCUS (CMA, Švédsko) s využitím enzymatické metody.

Statistické zpracování jsme provedli programem MedCalc version 8.1.1.0. Vý-



Obr. 1. Schéma experimentu

sledky jsou prezentovány jako skupinové průměry, případně jako 95% intervaly spolehlivosti. Normalita dat byla ověřena chí-kvadrát testem. Meziskupinové rozdíly v jednotlivých časech byly hodnoceny T-testem, nelineární korelaci mezi veličinami jsme hodnotili Spearmanovým koeficientem nelineární korelace. Hladina statistické významnosti byla zvolena 0,05.

Výsledky

K experimentu jsme použili 13 zvířat, 4 uhynula před začátkem nebo krátce po začátku experimentu, 6 zvířat bylo zařazeno do hemoragické skupiny, 3 zvířata byla kontrolní.

Krevní tlak

Hodnoty středního arteriálního tlaku (MAP) ukazuje graf 1. V hodnotách MAP nebyly po dobu prvních 120 minut nalezeny rozdíly mezi skupinami. Od 140. minuty dále jsou hodnoty MAP v hemoragické skupině signifikantně nižší než v kontrolní skupině ($p < 0,05$).

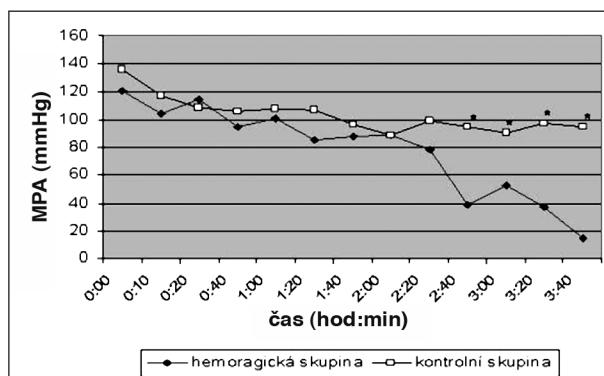
Značená voda

Časové vývoje poměrů A_{out}/A_{in} pro játra a sval jsou zobrazeny v grafech 2 a 3. Během celého experimentu se poměry A_{out}/A_{in} ze svalu i jater mezi kontrolní

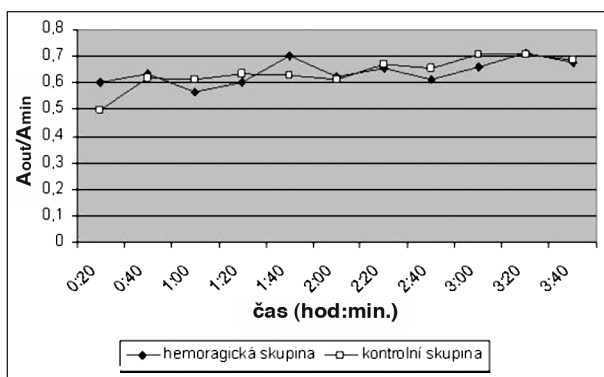
a hemoragickou skupinou statisticky významně nelišily. Nebyla nalezena statisticky významná závislost mezi krevní ztrátou a poměrem A_{out}/A_{in} ze svalu ($r = 0,49$), ani z jater ($r = 0,23$), ani mezi koncentrací laktátu a poměrem A_{out}/A_{in} ($r = 0,29$ pro sval resp. $r = -0,15$ pro játra). Poměry A_{out}/A_{in} se pohybovaly v rozmezí 0,62–0,66 u jater a 0,77–0,81 u svalu.

Laktát, pyruvát a poměr laktát/pyruvát (L/P)

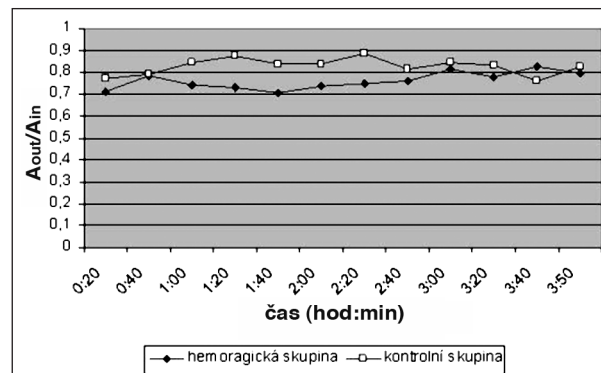
Koncentrace laktátu a pyruvátu ze svalu a jater ukazují tabulky 1 a 2. Chybějící údaj je důsledkem nedostatečného množství vzorku dialyzátu pro analýzu. Poměry L/P pro játra a sval ukazují grafy 4 a 5. Během prvních 150 minut nejsou hodnoty L/P v kontrolní a hemoragické skupině ve svalu ani játrech statisticky významně odlišné. Od 160. minuty dále jsou poměry L/P ze svalu i z jater v hemoragické skupině signifikantně vyšší ($p < 0,05$) než v kontrolní skupině, kde poměr L/P zůstává neměnný. Podobný časový profil se týká i laktátu ze svalu i jater, rovněž asi po 160 minutách narůstá koncentrace laktátu u hemoragické skupiny, beze změn u kontrolní skupiny. Koncentrace laktátu v játrech byly během celého experimentu 4–6násobně vyšší než ve svalu. Koncentrace pyruvátu u kontrolní i hemoragické skupiny byly po celou dobu experimentu totožné a v čase se neměnily.



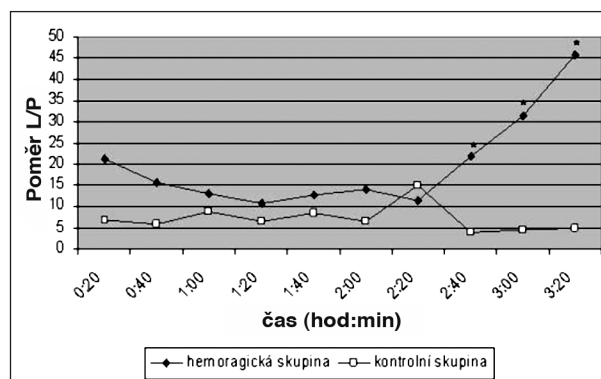
Graf 1. Časový vývoj středního arteriálního tlaku
MAP – střední arteriální tlak, * $p < 0,05$



Graf 2. Časový vývoj poměru A_{out}/A_{in} v játrech
 A_{out} – aktivita dialyzátu
 A_{in} – aktivita perfuzátu



Graf 3. Časový vývoj poměru A_{out}/A_{in} ve svalu
 A_{out} – aktivita dialyzátu
 A_{in} – aktivita perfuzátu



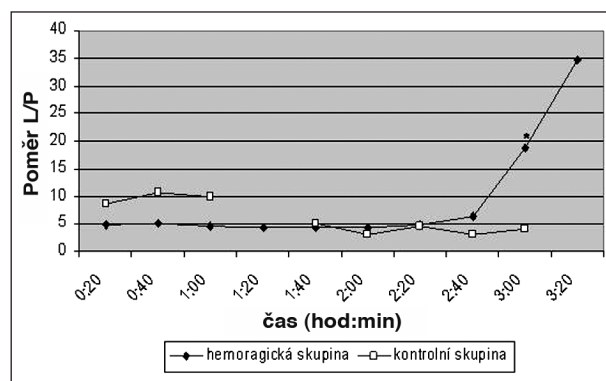
Graf 4. Časový vývoj poměru L/P v játrech
* $p < 0,05$

Tabulka 1. Časový vývoj koncentrace laktátu (v μmol) v dialyzátu z jater a svalu pro hemoragickou a kontrolní skupinu

čas	játra		sval	
	hemoragická skupina	kontrolní skupina	hemoragická skupina	kontrolní skupina
0:20	812	206	119	150
0:40	782	306	213	158
1:00	722	247	153	116
1:20	953	295	164	
1:40	692	505	230	181
2:00	736	292	206	121
2:20	704	260	224	193
2:40	1207	186	445	101
3:00	1403	250	512	107
3:20	1630	205	842	101
3:40	1625	451	838	344

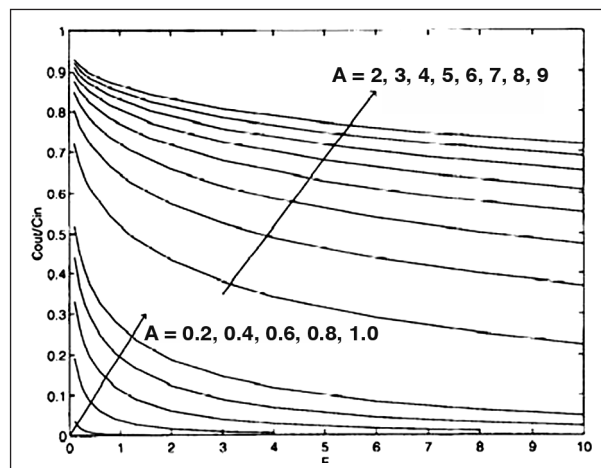
Tab. 2. Časový vývoj koncentrace pyruvátu (v μmol) v dialyzátu z jater a svalu pro hemoragickou a kontrolní skupinu

čas	játra		sval	
	hemoragická skupina	kontrolní skupina	hemoragická skupina	kontrolní skupina
0:20	75	41	24	17
0:40	53	35	37	17
1:00	61	36	37	13
1:20	96	59	37	24
1:40	61	43	54	37
2:00	53	57	55	24
2:20	56	25	50	44
2:40	56	56	46	32
3:00	46	63	50	26
3:20	59	49	46	26
3:40	31	33	15	22
3:50	31	33	25	22

**Graf 5.** Časový vývoj poměru L/P ve svalu* $p < 0,05$

Diskuse

Metoda indikátorové mikrodialýzy vychází z předpokladu, že molekuly indikátoru difundující přes dialyzační membránu ze sondy do intersticia jsou zčásti eliminovány resorpcí do krevních kapilár a to tím více, čím větší je průtok krve tkání [8, 9]. Poměr koncentrací indikátoru na výstupu a vstupu sondy

**Obr. 2.** Závislost poměru C_{out}/C_{in} na krevním průtoku tkáně při různých rychlostech perfuze sondy

F – normalizovaný krevní průtok (bezrozměrná veličina úměrná krevnímu průtoku)

A – normalizovaná rychlost perfuze sondy (bezrozměrná veličina úměrná perfuzi sondy)

(C_{out}/C_{in} , respektive A_{out}/A_{in}) by tedy měl být nepřímo úměrný perfuzi tkáně, což by bylo možné využít k jejímu měření (obr. 2).

Z dosažených výsledků ovšem vyplývá, že změny aktivity $^3\text{H}_2\text{O}$, respektive poměr A_{out}/A_{in} nejsou v korelaci s krevními ztrátami, ani s jinými markery hypoperfuze (laktát, poměr L/P). Významný pokles MAP i nárůst koncentrace laktátu i poměru L/P v dialyzátu přitom dokazují, že použitý model objemově kontrolovaného krvácení vedl k rozvoji šoku s tkáňovou hypoperfuzí [10].

Příčin neúspěchu indikátorové techniky můžeme nalézt mnoho. Prvotní metodická studie [3] indikátorové mikrodialýzy testovala metodu na modelu kontrolované perfuze s definovaným a časově neměnným průtokem končetinou. Autoři sice získali velmi přesnou lineární závislost poměru C_{out}/C_{in} na tkáňové perfuzi v určité oblasti perfuze, zároveň ale ukázali, že variace poměru při opakovaných odběrech z jedné sondy při identickém krevním průtoku (tzv. časová heterogenita) se pohybuje v rozmezí 3–18 % (střední koeficient variace) a variace poměrů mezi různými sondami ve stejném okamžiku při daném krevním průtoku (tzv. prostorová heterogenita) dokonce v rozmezí 4–59 %. Důvodem je zřejmě různá difuzibilita molekul v různých oblastech tkáně spolu s nehomogenitou (prostorovou i časovou) rozložení perfuze v tkáni. Připočteme-li fakt, že u živého zvířete není, na rozdíl od modelů s kontrolovanou perfuzí, ani globální perfuze (např. minutový srdeční výdej) konstantní, je zřejmé, že porovnávání výsledků mezi měřeními na různých zvířatech je značně obtížné.

Podobná studie [2] s kontrolovanou perfuzí zjistila, že trojnásobné zvýšení perfuze mění poměr C_{out}/C_{in} pouze o 0,05, tj. o 5 % z maxima, z čehož pro *in vivo* studie plyne požadavek téměř nedosažitelné přesnosti provedení mikrodialýzy i analýzy vzorků. Např. chyba měření aktivity přístrojem LS Beckmann se

pohybuje okolo 2 %, pro poměr aktivit ještě více. Dalším možným zdrojem chyb může být nepřesnost pipetování velmi malých objemů vzorku. Řešením je buď zvýšení rychlosti perfuze sondy, což ovšem zvyšuje poměr C_{out}/C_{in} a snižuje tak přesnost metody, nebo prodloužení doby sbírání dialyzátu, což ovšem znemožňuje detekci rychlých změn perfuze. Hlavním zdrojem nehomogenity pro *in vivo* studie je však zřejmě samo. Intenzita šokového stavu koreluje jen částečně s velikostí krevních ztrát a středním arteriálním tlakem, nelze tedy určit, které hodnoty ve kterém čase odpovídají stejné intenzitě šokového stavu, a měli bychom je tedy nejlépe použít pro porovnávání mezi jednotlivými zvířaty a pro statistické zpracovávání. Přírovnatelnější než průměrné výsledky skupiny zvířat by bylo sledování individuálních trendů měřených parametrů, ale např. i faktor jako pohyb tkání, kde je sonda zavedena (např. souhyb jater s dýcháním), ovlivňuje poměr C_{out}/C_{in} velmi výrazně, jak prokázala studie [4] na zdravých dobrovolnících.

Pro reálné využití je důležitá přesnost metody v oblasti nízkých tkáňových perfuzí. Vzhledem k nelineární závislosti poměru C_{out}/C_{in} na tkáňové perfuzi [8] (obr. 2) sice poměr C_{out}/C_{in} s klesající perfuzí rychle narůstá, zároveň se však prodlužuje doba do ustavení stacionárního stavu, kdy se při dané perfuzi poměr C_{out}/C_{in} už dále nemění. Ovšem poměr C_{out}/C_{in} je úměrný tkáňové perfuzi pouze ve stacionárním stavu, před jeho ustavením úměrný není. Tato skutečnost znesnadňuje zejména měření rychlých změn v oblasti nízké tkáňové perfuze, protože tkáňová perfuze se pak mění rychleji, než se ustavuje stacionární stav v difuzi indikátoru, a poměr C_{out}/C_{in} pak neodráží tkáňovou perfuzi [2].

Určitým limitem výsledků může být i počet zvířat použitých ve studii. Bylo použito pouze 6 zvířat v hemoragické skupině a 3 v kontrolní skupině; považujeme to ovšem za počet dostatečný. Vycházíme z úvahy, že byla-li by metoda dostatečně přesná pro potenciální využití v klinické medicíně, pak 6, respektive 3 zvířata musí stačit ke statisticky významným výsledkům. A naopak, pokud nebudou v experimentu dosaženy statisticky významné výsledky, nevylučuje to využitelnost metody v experimentu při použití vyššího počtu zvířat, ale prakticky je vyloučena možnost použití v reálné klinické praxi.

Za pozornost stojí změny v koncentracích laktátu, pyruvátu a poměru L/P, kde, v kontrastu s poměry C_{out}/C_{in} , dochází k několikanásobnému a rychlému zvýšení koncentrace laktátu i poměru L/P při rozvoji šokového stavu. Sledování laktátu, pyruvátu a poměru L/P mikrodialýzou se proto jeví jako vhodnější metoda pro sledování tíže šokového stavu než indikátorová mikrodialyzační technika.

Závěr

Na modelu objemově kontrolovaného hemoragického šoku u potkana jsme testovali schopnost indika-

torové mikrodialyzační techniky kvantitativně posoudit tkáňovou perfuzi. Zjistili jsme, že zatímco střední arteriální tlak signifikantně klesá a koncentrace laktátu v mikrodialyzátu i poměr L/P signifikantně rostou s krevními ztrátami, korelace mezi krevními ztrátami a poměrem C_{out}/C_{in} nedosahuje statistické významnosti a poměr C_{out}/C_{in} se během celého experimentu neliší mezi hemoragickou a kontrolní skupinou. Schopnost indikátorové mikrodialyzační techniky posuzovat změny tkáňové perfuze se zdá být nízká a v klinické praxi je technika podle našeho názoru prakticky nepoužitelná.

Literatura

1. Černý, V., Šitina, M. Hodnocení tkáňové perfuze indikátorovou mikrodialyzační technikou – možnosti metody. *Anest. intenziv. Med.*, 2006, 17, č. 3, s. 171–175.
2. Stallknecht, B., Donsmark, M., Enevoldsen, L. H., Fluckey, J. D., Galbo, H. Estimation of rat muscle blood flow by microdialysis probes perfused with ethanol, [^{14}C]ethanol, and $^3\text{H}_2\text{O}$. *J. Appl. Physiol.*, 1999, 86, p. 1054–1061.
3. Hickner, R. C., Ekelund, U., Mellander, S., Ungerstedt, U., Henriksson, J. Muscle blood flow in cats: comparison of microdialysis ethanol technique with direct measurement. *J. Appl. Physiol.*, 1995, 79, p. 638–647.
4. Radegran, G., Pilegaard, H., Nielsen, J. J., Bangsbo, J. Microdialysis ethanol removal reflects probe recovery rather than local blood flow in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.*, 1998, 85, p. 751–757.
5. Newman, J. M., Di Maria, C. A., Rattigan, S., Clark, M. G. Nutritive blood flow affects microdialysis O/I ratio for [(14)C]ethanol and (3)H(2)O in perfused rat hind limb. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, 2001, 281, p. 2731–2737.
6. Luchette, F. A., Jenkins, W. A., Friend, L. A., Su, C., Fischer, J. E., James, J. H. Hypoxia is not the sole cause of lactate production during shock. *J. Trauma*, 2002, 52, p. 415–419.
7. Dewachter, P., Jouan-Hureau, V., Franck, P., Menu, P., de Talance, N., Zannad, F., Laxenaire, M. C., Longrois, D., Mertes, P. M. Anaphylactic shock: a form of distributive shock without inhibition of oxygen consumption. *Anesthesiology*, 2005, 103, p. 40–49.
8. Wallgren, F., Amberg, G., Hickner, R. C., Ekelund, U., Jorfeldt, L., Henriksson, J. A mathematical model for measuring blood flow in skeletal muscle with the microdialysis ethanol technique. *J. Appl. Physiol.*, 1995, 79, p. 648–659.
9. Stahle, L. On mathematical models of microdialysis: geometry, steady-state models, recovery and probe radius. *Adv. drug deliv. rev.*, 2000, 45, p. 149–167.
10. Eldridge, F. L. Relationship between lactate turnover rate and blood concentration in hemorrhagic shock. *J. Appl. Physiol.*, 1974, 37, p. 321–323.

Práce byla podpořena Výzkumným záměrem MZO 00179906.

Došlo 2. 5. 2006.

Přijato 26. 6. 2006.

Adresa pro korespondenci:
MUDr. Michal Šitina
KARIM FN Hradec Králové
Sokolská 581
500 05 Hradec Králové
e-mail: sitinam@medics.cz