

MYKOTOXINY JAKO BOJOVÉ BIOLOGICKÉ LÁTKY?

¹Miroslav BRNDIAR, ¹Jaroslav KAČEROVSKÝ, ²František MALÍŘ, ³Alena VOSEČKOVÁ, ¹Ladislav JEBAVÝ

¹Katedra válečného vnitřního lékařství Vojenské lékařské akademie J. E. Purkyně, Hradec Králové

²Oddělení xenobiochemie, Zdravotní ústav, Hradec Králové

³Katedra vojenské hygieny Vojenské lékařské akademie J. E. Purkyně, Hradec Králové

Souhrn

Autoři práce upozorňují na základní obecná rizika bioterorismu. Podrobněji analyzují nefrotoxicitu mykotoxinu ochratoxinu A (OTA). Byla vyšetřena plazmatická hladina OTA u rozsáhlého souboru zdravých. Byly porovnány hladiny OTA u souborů nemocných s akutní a chronickou renální insuficiencí. Prokázána byla signifikantně vyšší hladina OTA u nemocných s chronickou renální insuficiencí. Zvažována možnost, zda retence OTA u chronické renální insuficience není dalším akcelerujícím faktorem progresu základní nefropatie, která vedla k chronickému selhávání ledvin.

Klíčová slova: Bioterrorismus; Mykotoxiny; Ochratoxiny; Nefrotoxicita ochratoxinu A (OTA); Plazmatické hladiny OTA u zdravé populace; Retence OTA u renální insuficience.

Mycotoxins as Biological Warfare Agents

Summary

The authors point out in their study the basic general risks of biological terrorism. They analyse in detail the nephrotoxicity of mycotoxin ochratoxin A (OTA). The OTA plasmatic level has been examined in a large group of healthy individuals. The OTA levels have been compared in a group of patients with chronic renal insufficiency. A significantly higher OTA level has been proven in patients with chronic renal insufficiency. The possibility of whether OTA retention in chronic renal insufficiency is not an additional accelerating progression factor of basic nephropathy which leads to chronic renal failure has been considered.

Key words: Bioterrorism; Mycotoxins; Ochratoxins; Renal toxic effect of ochratoxin A; Plasma ochratoxin A in healthy population; OTA retention in renal insufficiency.

Úvod

Moderní euroatlantická civilizace, závislá na technickém pokroku, a centralizace obyvatelstva ve městech jako její přímý důsledek jsou ve své podstatě velice zranitelné. Nemusí se ani jednat o vyhlášenou válku mezi dvěma státy nebo koalicemi, kde se tato civilizační zranitelnost projevuje. V poslední době se totiž do popředí dostává tzv. terorismus, což je nejzákeřnější metoda boje za zájmy určité skupiny lidí, organizací, nebo dokonce i státu (tzv. státní terorismus). Využívá nejrůznější prostředky, mj. i bojové biologické látky – tzv. bioterorismus. Ve srovnání s ostatními zbraněmi jsou biologické zbraně unikátní co do rozmanitosti. Jejich příprava je relativně lehká a levná, proto se někdy nazývají atomovou zbraní chudých. Podle vyvolávajícího původce se tyto zbraně člení na bakteriální, virové, rickettsiové, mykotické a toxinové. Toxiny mají některé vlastnosti chemických zbraní a některé z nich jsou produkovány plísněmi (mykotoxiny) (25). V tabulce 1 jsou uvedeny některé mykotoxiny účinné především u lidí (27).

Tabulka 1

Účinky některých mykotoxinů u lidí

Agens	Produkt	Biologický efekt
Aspergillus flavus	aflatoxin	hepatotoxicita, kancerogenita
Penicillium tricinatum	T-2 toxin	kožní nekrózy, hemoragie
Aspergillus ochraceus Penicillium viridicatum	ochratoxin A	nefrotoxicita, hepatotoxicita, genotoxicita, teratogenita
Sclerotinia sclerotiorum	psoraleny	kožní toxicita
Fusarium graminearum	vomitoxin	profuzní zvracení
Phoma sorghina	zatím neidentifikován	hemoragie, rychlá smrt
Penicillium oxalicum	kyselina secalonová	smrt
Stachybotrys atra	satratoxin	hemoragie

Z uvedeného neúplného přehledu je zřejmé, že účinky některých mykotoxinů jsou tak závažné, že za určité situace mohou být použity jako bojové biologické látky. K nejvýznamnějším mykotoxinům patří ochratoxiny, produkované mikromycetami rodu *Aspergillus* a *Penicillium* (*Aspergillus ochraceus*, *Penicillium viridicatum*) (23). Ochratoxikóza je celosvětově se vyskytující mykotoxikóza zvířat i lidí, způsobená příjmem ochratoxinu A (OTA) v krmivu a potravinách. Nejdůležitější zdroje OTA jsou zachyceny v tabulce 2.

Tabulka 2

Možné zdroje OTA v potravinách

Cereálie	Mouka, kroupy
Živočišné zdroje	Vepřové maso, játra, slezina, ledviny, krev
Ostatní	Káva, pivo, koření, luštěniny

Tento mykotoxin byl objeven asi před třiceti lety a postupně byly prokázány jeho závažné toxikologické účinky (20). V tabulce 3 je přehled hlavních nežádoucích účinků OTA bezpečně prokázaných na podkladě experimentálních poznatků. Akutní intoxikace OTA jako bojové biologické látky je za mírových podmínek málo pravděpodobná, nicméně musíme s ní počítat. V experimentu byl jako biologický materiál použit pes, kterému byl podáván OTA v denní dávce 0,2 mg/kg hmotnosti. Smrt nastala za 10–14 dní. Při pitvě byly zjištěny patologické změny na střevě, lymfatických uzlinách a v ledvinách (hemoragická enteritida, nekróza lymfatických uzlin, nekróza proximálního tubulu) (14, 30).

Do popředí se v dnešní době dostává chronická intoxikace OTA se všemi svými nežádoucími účinky (tab. 3). Ta je aktuální hlavně v důsledku globalizace potravinového řetězce.

Tabulka 3

Přehled hlavních nežádoucích účinků OTA

	Citace
Možnost akutní intoxikace	4, 30
Nefrotoxicita	1, 7, 15
Genotoxicita	2, 13
Teratogenita	5, 19
Imunosupresivní účinky	17, 18
Potenciální kancerogenita	24
Neurotoxicita	2, 13

Cíle práce

V naší práci se zabýváme jmenovitě nefrotoxickou OTA. Zájem o tuto oblast byl vyvolán především nálezem významně vyšších sérových koncentrací OTA (v některých sestavách až v 80 %) u nemocných s balkánskou endemickou nefropatií, tj. u jednoho z podtypů tubulointersticiální nefritidy (15). Tato hypotéza byla později podpořena průkazem přítomnosti OTA ve stravě zasažené populace (21, 22). Navíc u části nemocných byl OTA nalezen i v jejich moči, a to bez ohledu na stav renálních funkcí (6). Existují také práce o častějším výskytu nádorů vývodných močových cest u lidí s vyššími hodnotami OTA v séru a v moči (24). Experimentální práce o nefrotoxické OTA ve svém souhrnu dokumentují, že tento mykotoxin narušuje intracelulární metabolické pochody s následnou apoptózou renálních buněk (1, 8, 10, 29, 31), narušuje renální hemodynamiku a vede k poklesu glomerulární filtrace i tubulární resorpce (7). Znalosti o globálním působení OTA na ledviny u člověka a vlastní klinické důsledky tohoto toxického působení nejsou ještě úplně známy.

Konkrétním cílem naší práce – vzhledem k časté frekvenci poklesu snížených renálních funkcí – bylo:

1. zjistit koncentraci OTA ve vzorku zdravé populace,
2. zjistit, zda – a do jaké míry – dochází k retenci OTA v séru nemocných se sníženými renálními funkcemi, u nichž však jejich pokles nevyžadoval dialyzační léčbu,
3. zvažovat možné klinické důsledky našich nálezů.

Soubor nemocných a metodika

Byly vyšetřeny tři soubory osob:

- a) soubor zdravých osob ($n_1 = 1750$),
- b) soubor nemocných s přechodnou renální insuficiencí bez preexistující nefropatie ($n_2 = 25$),
- c) soubor nemocných se stabilizovanou chronickou renální insuficiencí na podkladě různých typů chronických nefropatií ($n_3 = 103$).

U všech tří souborů byla stanovena hladina kreatininu v séru a sérová koncentrace OTA. Kreatininémie byla stanovena na automatickém analyzátoru Hitachi (Japonsko). Pro vlastní analytické stanovení OTA bylo odebráno 10 ml krve současně s odběrem na kreatininemii a další biochemická vyšetření, která byla 20 min temperována na pokojovou teplotu, 20 min centrifugována při 3000 otáčkách/min, sérum bylo slito do nových skleněných zkumavek, které byly zmrazeny a uloženy v mrazničce při teplotě $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Pro stanovení OTA byla použita metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí po předchozí extrakci OTA z 5 ml séra, založené na dělicím koeficientu OTA ve vodných (roztok chloridu hořečnatého a kyseliny chlorovodíkové, roztok 0,1 mol.l⁻¹ hydrogenuhličitanu sodného) a organických rozpouštědlech (chloroform) ve vztahu k hodnotě pH (cca 2,5). Po odpaření chloroformu ve vodní lázni byl odparek rozpuštěn v metanolu a napipetován do Eppendorfových špiček.

Jeden díl byl použit pro přímou analýzu OTA, druhý díl pak k potvrzení OTA, např. po jeho rozkladu enzymem karboxypeptidázou (za vzniku ochratoxinu α a fenylalaninu), třetí díl byl zálohován pro případnou kontrolu. Dobře uzavřené a popsané špičky byly uloženy v chladničce do doby vlastní analýzy. (Při tomto způsobu uložení a uzavření jsou stabilní cca 1 rok.) Pro stanovení OTA na HPLC byla použita mobilní fáze: metanol:acetonitril:0,05 mol.l⁻¹ octan sodný:kyselina octová. Rychlost průtoku mobilní fáze 1,5 ml.min⁻¹. Parametry fluorescenčního detektoru: vlnová délka – excitace 340 nm, emise 465 nm. Při těchto podmínkách byl eluční čas OTA více než 7 min. Současně se vzorky byly vždy analyzovány standardy OTA 0,4 μ g.l⁻¹, 4 μ g.l⁻¹ metanolu, slepý vzorek a dle možnosti i vzorky sér uměle spikované OTA. Pro zjištění koncentrace OTA (μ g.l⁻¹) byla použita metoda vnějšího standardu, kdy se reálná koncentrace OTA ve vzorku vypočte ze součinu koncentrace standardu a poměru ploch vzorku/standardu. Jedná se o metodu srovnatelnou s metodami používanými celosvětově, s detekčním limitem (což představuje současně i mez stanovitelnosti) 0,1 μ g OTA.l⁻¹ séra. U 12 náhodně vybraných nemocných (8 mužů a 4 ženy) byla stanovena hladina OTA v moči.

Výsledky byly zpracovány párovým T-testem.

Výsledky

Výsledky průměrných koncentrací kreatininu v séru a OTA v jednotlivých souborech jsou zachyceny v tabulce 4.

Průměrná hodnota OTA v séru zdravých osob byla 0,252 μ g/l při normální hodnotě kreatininémie (< 110 μ mol/l). Ve skupině nemocných s přechodnou renální insuficiencí (S2) byla průměrná hodnota OTA v séru dokonce nižší (0,240 μ g/l) než ve skupině zdravých osob (S1), přitom došlo k růstu kreatininémie na průměrnou hodnotu 193 μ mol/l. Změna hodnoty OTA při porovnání těchto dvou skupin (S1:S2) je statisticky nevýznamná.

Ve skupině nemocných se stabilizovanou chronickou renální insuficiencí ještě nevyžadujících dialyzační léčbu (S3) byla průměrná hodnota OTA

v séru 0,407 μ g/l, při hodnotě kreatininémie 275 μ mol/l. Změna hladiny OTA v séru je při porovnání této skupiny s předcházejícími skupinami (S1:S3, S2:S3) statisticky významná ($p = 0,001$).

Tabulka 4

Průměrné hodnoty OTA a kreatininémie v datových souborech

Soubor	n	Ø Kr	Ø OTA
S1	1750	<110	0,252
S2	25	193	0,240
S3	103	275	0,407

(S1 – normální populace, S2 – nemocní s přechodnou renální insuficiencí, S3 – nemocní se stabilizovanou chronickou renální insuficiencí, Ø Kr – průměrná hodnota kreatininu v séru (μ mol/l), Ø OTA – průměrná hodnota OTA (μ g/l), n – počet členů souboru)

Diskuse

Globalizací potravinového řetězce a otevřením se české ekonomiky světu dochází i u nás k objevení se onemocnění v minulosti prakticky neznámých. V potravinách zpracovávaných a skladovaných v podmínkách vhodných pro růst a rozmnožování plísní (subtropické a tropické oblasti) a následně distribuovaných k nám se ve zvýšené míře objevují buď samotné tyto mikroorganismy, nebo jejich toxiny. Jedním z nich je i OTA, s velkým počtem nežádoucích účinků na organismus (tab. 3). Některé práce potvrzují, že se OTA chová jako kumulativní jed s rychlou absorpcí a pomalým vylučováním (11, 12), jehož poločas je u člověka asi 35 dní (23). Hlavními místy jeho zachytu jsou játra, ledviny, varlata a střeva (rychlá kinetika), rezervu tvoří tuková tkáň a svaly (11, 23). V krvi je velmi silně vázán na albumin a na makromolekulu o relativní molekulární hmotnosti asi 20 000 (23).

V naší práci jsme prokázali, že reprezentativní vzorek naší populace (1750 osob) má určitou hladinu OTA v séru, tj. že konzumuje potraviny kontaminované tímto toxinem. Přitom šlo o osoby, u kterých nebylo prokázáno žádné onemocnění. Výsledky vyšetření naší skupiny významně nevybočují z vyšetření populace v jiných státech (3, 4, 9, 28). To by mohlo být důkazem zařazení České republiky do globálního potravinového řetězce. Přípustná koncentrace OTA v séru není definitivně stanovena, je však zřejmé, že čím je nižší, tím jsou menší zdravotní rizika způsobená ochratoxikózou. Vzhledem k metabolismu OTA je však jasné, že jeho velká část je vázána v tzv. periferním kompartmentu (orgá-

ny), a sérová hladina je jen částečným ukazatelem celkového množství tohoto toxinu.

Druhá sledovaná skupina nemocných ($n = 25$) s přechodnou renální insuficiencí na podkladě jiného onemocnění než primární nefropatie byla charakterizována těžkým klinickým stavem s výraznou polymorbiditou a prerenálním typem renální insuficience s mírným až středně závažným stupněm poklesu funkce ledvin. Průměrné hodnoty kreatininu činily $193 \mu\text{mol/l}$ a po stabilizaci základního onemocnění byla rychlá tendence k jeho poklesu. Šlo tedy o přechodné, reverzibilní selhání ledvin. Průměrná koncentrace OTA dosáhla hodnoty $0,24 \mu\text{g/l}$ a nedosáhla ani hodnoty OTA u zdravé populace. Vzhledem k metabolismu OTA a jeho kumulativní hladině je tato hodnota tedy vlastně průměrnou hodnotou zdravé populace. Zároveň tento údaj prokazuje, že krátkodobé selhání ledvin nemá vliv na retenci OTA v séru. Z hlediska klinické interpretace lze předpokládat, že OTA za daných okolností není nutno považovat za faktor, který by přechodnou renální insuficienci akceleroval a který by nutil zvažovat jiné terapeutické či dietní postupy.

Třetí skupina nemocných ($n = 103$) se stabilizovanou chronickou renální insuficiencí trvající nejméně 3 roky neměla závažnější metabolické komplikace a vlastní nefropatie vedla k různému stupni poškození ledvin. Průměrná koncentrace kreatininu u této skupiny byla $275 \mu\text{mol/l}$ a průměrná koncentrace OTA dosáhla hodnoty $0,407 \mu\text{g/l}$. Je to vysoce signifikantní rozdíl oproti oběma předcházejícím skupinám. Průkaz, že u stabilizované CHRl může dojít ke kumulaci OTA, lze považovat za významný, i když v současné etapě znalostí nelze z něho vyvodit jednoznačné, klinicky aplikovatelné závěry. Z obecně teoretických poznatků o nefrotoxicitě OTA lze připustit, že u nemocných, kteří kumulují OTA, může jít o jeden z akcelerojících faktorů progresu základní nefropatie, a tedy i progresu chronické renální insuficience (7, 16, 26).

Závěry

Výsledky práce nás opravňují k těmto závěrům:

1. bylo prokázáno promoření naší populace ochratoxinem A,
2. srovnáním koncentrací OTA v naší populaci s populací jiných států je zřejmé, že globalizace zasáhla i potravinový trh (jíme přibližně stejné kontaminované potraviny),
3. u přechodné renální insuficience bez preexistující nefropatie nebyla zjištěna abnormální kumulace OTA v séru,
4. u stabilizované chronické renální insuficience na podkladě chronického poškození ledvin jsme

zjistili signifikantně významnou retenci OTA v séru.

Literatura

1. BAHNEMANN, E. – KERLING, HP. – ENSMINGER, S., et al. Renal transepithelial secretion of ochratoxin A in the non-filtering toad kidney. *Toxicology*, 1997, vol. 120, no. 1, p. 11–17.
2. BAUDRIMONT, I. Variation de la nephrotoxicité de l'ochratoxine A sous l'effet de facteurs métaboliques et non métaboliques. (These pour le Doctorat, No. 2). Bordeaux: Université II. 25. 10. 1995, p. 3–205.
3. BREITHOLTZ, A. – OLSEN, M. – DAHLBÄCK, A., HULT, K. Plasma ochratoxin A levels in three Swedish populations surveyed using an ion-pair HPLC technique. *Food Addit. Contam.*, 1991, vol. 8, p. 183–192.
4. BREITHOLTZ-EMANUELSSON, A., et al. Ochratoxin A in human serum samples collected in southern Italy from healthy individuals and individuals suffering from different kidney disorder. *Nat. Toxins*, 1994, vol. 2, no. 6, p. 366–370.
5. BROWN, MH. – SZCZECK, GM. – PURMALIS, BP. Teratogenic and toxic effects of ochratoxin A in rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1976, vol. 37, p. 31–38.
6. CASTEGNARO, M., et al. High performance liquid chromatographic determination of ochratoxin A and its 4R-4-hydroxy metabolite in human urine. *Analyst*, 1990, vol. 115, p. 129–131.
7. GEKLE, M. – SILBERNAGL, P. Mechanism of ochratoxin A-induced reduction of glomerular filtration rate in rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1993, vol. 267, no. 1, p. 316–321.
8. GEKLE, M. – SILBERNAGL, P. Renal toxicodynamics of ochratoxin A: a pathophysiological approach. *Kidney Blood Press. Res.*, 1996, vol. 19, no. 5, p. 225–235.
9. GOLINSKI, P. – GRABATKIEWICZ-SZCZENASNA, J. – CHELKOWSKI, J., et al. Possible sources of ochratoxin A in human blood. In CASTEGNARO, M., et al. (Eds.) *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumour*. Lyon, IARC Scientific Publications, 1991, vol. 115, p. 153–157.
10. GROVES, CE., – MORALES, M. – WRIGHT, PH. Peritubular transport of ochratoxin A in rabbit renal proximal tubule. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1988, vol. 284, no. 3, p. 943–948.
11. HOOD, RD. – NAUGHTON, MJ. – HAYES, AW. Teratogenic effects of ochratoxin A in hamster. *Teratology*, 1975, vol. 11, p. 23A (Abstract).
12. HOOD, RD. – NAUGHTON, MJ. – HAYES, AW. Prenatal effects of ochratoxin A in hamster. *Teratology*, 1976, vol. 13, p. 11–14.
13. IARC MONOGRAPHS on the Evaluation of Carcinogenic Risks of Chemical to Humans: Some naturally occurring substances: some food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Lyon, IARC Scientific Publications, 1993, vol. 56, p. 489–521.
14. KITCHEN, DN. – CARLTON, WW. – HINSMAN, EJ. Ochratoxin A and citrinin induced nephrosis in beagle dog. III. Terminal renal ultrastructural alteration. *Vet. Pathol.*, 1977, vol. 14, p. 392.
15. KROGH, P. Mycotoxic porcine nephropathy: a possible model for Balkan endemic nephropathy. In PULCHEV, A. et al. (Eds.) *Endemic nephropathy*. Sofia, Bulgarian Academy of Science, 1972, p. 266–270.
16. KUIPER-GOODMAN, T. – SCOTT, PM. Risk assessment

- of the mycotoxin ochratoxin A. *Biochem. Environ. Sci.*, 1989, no. 2, p. 179–248.
17. LEA, T. – STEIEN, K. – STORMER, C. Mechanisms of ochratoxin A induced immunosuppression. *Mycopathologia*, 1989, vol. 107, p. 153–159.
 18. LUSTER, MI. – GERMOLEC, DR. – BURLESON, G., et al. Selective immunosuppressions in mice of natural killer cell activity by ochratoxin A. *Cancer Res.*, 1987, vol. 47, p. 2259–2263.
 19. MAYURA, K., et al. Embryocidal, fetotoxic and teratogenic effects of ochratoxin A in ratp. *Toxicology*, 1982, vol. 25, p. 175–185.
 20. MERVE, KJ. van der – STEYN, PS. – FOURIE, L. Mycotoxinp. Part II. The constitution of ochratoxins A, B and C metabolites of *Aspergillus ochraceus*. *Wilh. J. Chem. Soc.*, 1965a, p. 7083–7088.
 21. PETKOVA-BOCHAROVA, T. – CASTEGNARO, M. Ochratoxin A contamination of cereals in an area of high incidence of Balkan endemic nephropathy in Bulgaria. *Food Addit. Contam.*, 1985, vol. 2, no. 4, p. 267–270.
 22. PETKOVA-BOCHAROVA, T. – CHERNOZEMSKY, IN. – CASTEGNARO, M. Ochratoxin A in human blood in relation to Balkan endemic nephropathy and urinary system in Bulgaria. *Food Addit. Contam.*, 1988, vol. 5, p. 299–301.
 23. PFOHL-LESKOWICZ, A., et al. Les mycotoxines dans l'alimentation: évaluation et gestion du risque. Londres, New York, Lavoisier, Tec-Doc, 1999, p. 1–478.
 24. PFOHL-LESKOWICZ, A. – GROSSE, Y. – CASTEGNARO, M., et al. Ochratoxin A related DNA ductus in urinary tract tumours of Bulgarian subjectp. In *Postlabelling methods for detection of DNA adductp*. Lyon, IARC Scientific Publications, 1993, no. 124, p. 141–148.
 25. PRYMULA, R., aj. Biologický a chemický terorismus. Praha, Grada Publishing, 2001. 152 s.
 26. RIBELIN, W. E., FUKUSHIMA, K., STILL, P. The toxicity of ochratoxin A to ruminantp. *Can. J. Comp. Med.*, 1978, vol. 42, p. 172–176.
 27. SHANK, R. C. Mycotoxins and N-nitroso compounds: environmental riskp. Volume I. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1981. 285 p.
 28. SCHEUER, R., LEISTNER, L. Occurrence of ochratoxin A in pork productp. *Proc. Eur. Meet. Meat Rep. Work*, 1986, vol. 32, p. 191–195.
 29. SCHWERDT, G., GEKLE, M., FREUDINGER, R., MILDENBERGER, S., SILBERNAGL, P. Apical-to-basolateral transepithelial transport of ochratoxin A by two subtypes of Madin-Darby canine kidney cellp. *Biochim. Biophys. Acta*, 1997, vol. 1324, no. 2, p. 191–199.
 30. SZCZECHE, G. M., CARLTON, W. W., TUIITE, J. Ochratoxicosis in beagle dogp. II. Pathology. *Vet. Pathol.*, 1973, vol. 10, p. 219.
 31. WAFI, E. J., YAHYA, R., SOBHI, M. A., ERAKY, I., ELBAZ, M., EL-GAYAR, H. A. M., BETBEDER, A. M., CREPPY, E. E. Human ochratoxicosis and nephropathy in Egypt: a preliminary study. *Hum. Exp. Toxicol.*, 1998, vol. 17, no. 2, p. 124–129.
- Korespondence: Plk. MUDr. Miroslav Brndiar
Katedra válečného vnitřního lékařství
Vojenská lékařská akademie J. E. Purkyně
Třebešská 1475
500 01 Hradec Králové
- Do redakce došlo 30. 4. 2003