

Matematický popis farmakokinetických procesů

Farmakokinetické metody se snaží matematickými vztahy vystihnout časovou závislost pobytu léčiva v organismu. Vycházejí z analýzy koncentrací léčiva a jeho metabolitů v dostupných tělních tekutinách (nejčastěji krev, moč a sliny).

Nejdůležitější jsou informace:

- o množství léčiva, které dosáhlo systémového oběhu a o rychlosti, s jakou se tak stalo (biologická dostupnost),
- o distribuci léčiva v organismu,
- o rychlosti eliminace léčiva.

Matematické vztahy se využívají k **predikci koncentrace léčiv a k individualizaci dávkování**. Koncentrační profil léčiva (závislost koncentrace léčiva na čase od podání) je v nich vystižen pomocí základních farmakokinetických parametrů. To jsou proměnné, které závisí na řadě fyziologických a patofyziologických faktorů organismu i na faktorech na straně léčiva.

Farmakokinetické parametry rozdělujeme na:

Primární

Jejich změny lze přímo vysvětlit změnami fyziologických proměnných – např. průtokem krve, vazbou na bílkoviny, glomerulární filtrací.

- Distribuční objem (V_d),
- clearance (CL).

Sekundární

Jejich velikost závisí na primárních parametrech:

- biologický poločas eliminace ($t_{1/2}$),
- plocha pod křivkou koncentrace léčiva v krvi (AUC),
- biologická dostupnost léčiva (F).

Distribuční objem

Distribuční objem je poměr mezi množstvím léčiva v těle (M) a jeho koncentrací v krvi, plazmě, či séru (c):

$$V_d = \frac{M}{c}$$

Přeuspořádáním vztahu dostaneme:

$$M = V_d \cdot c$$

Z této formy zápisu je zřejmé, že distribuční objem můžeme definovat i takto:

Distribuční objem je objem, ve kterém by se muselo léčivo přítomné v těle homogenně rozptýlit (rozpusťit), aby bylo dosaženo stejné koncentrace léčiva jako v krvi.

Distribuční objem nepředstavuje reálný objem. Ve skutečnosti se léčivo distribuuje nerovnoměrně mezi krví a tkáněmi, především v závislosti na svých fyzikálně-chemických vlastnostech a vazbě na krevní a tkáňové bílkoviny. V některých případech může V_d dosahovat velmi vysokých hodnot. Je tomu tehdy, váže-li se léčivo ve vysokém procentu ve tkáních a málo na bílkoviny v plazmě. Pak je jeho plazmatická koncentrace nízká a V_d je mnohem vyšší, nežli objem celkové tělesné vody (V_d chinakrinu je 50 000 l).

Jednotkou distribučního objemu je jednotka objemu (litr). V_d se ale často vyjadřuje a interpretuje ve vztahu k tělesné hmotnosti (litr/kg), podobně, jako například objemy tělesných tekutin (viz tabulka).

Tabulka: Objemy tělesné vody v l/kg hmotnosti v důležitých tělesných kompartmentech

Kompartment	Objem (l/kg tělesné hmotnosti)
Plazma	0,04
Krev	0,08
Extracelulární voda	0,2
Celková tělesná voda	0,6
Tuk	0,2-0,35

Porovnání distribučního objemu léčiva (v l/kg) a objemů celkové, intracelulární, extracelulární a intravaskulární tekutiny umožňuje formulovat určité závěry o velikosti distribuce:

Léčivo, jehož V_d dosahuje přibližně 0,6 l/kg, se z krve distribuuje do extracelulárního i intracelulárního prostoru (metotrexát, erytromycinová antibiotika).

Léčivo s $V_d = 0,1–0,3$ l/kg se distribuuje do extracelulárního prostoru (gentamicin, vecuronium – jako většina polárních, ve vodě rozpustných látek).

Léčivo s $V_d = 0,05$ l/kg zůstává intravaskulárně (heparin).

Naopak léčivo, jehož V_d značně přesahuje 0,6 l/kg, se distribuuje intracelulárně a navíc se váže na buněčné struktury (lipofilní léčiva).

Využití distribučního objemu ve farmakokinetických výpočtech

1. Pro výpočet **nárazové (nasycovací) dávky (D_N)**.

$$D_N = V_d \cdot c_T$$

Nasycovací dávka je potřebná pro rychlé dosažení terapeuticky účinné koncentrace v krvi (c_T).

2. Pro **odhad množství léčiva v těle** (při předávkování, v soudním lékařství).

$$\text{Množství léčiva} = V_d \cdot c$$

Koncentrace v krvi se zjistí analýzou a na základě uvedeného vztahu se přibližně odhadne dávka léčiva (jakékoli látky).

3. Pro posouzení vlivu **hemodialýzy a hemoperfúze** na farmakokinetiku léčiva. Léčiva s velkým distribučním objemem nelze z organismu těmito technikami efektivně odstranit.

Clearance

Clearance je poměr rychlosti eliminace léčiva a jeho koncentrace v krvi (obecně i v jiné biologické tekutině, např. v plazmě nebo séru).

$$CL = \frac{\text{rychlost eliminace}}{c}$$

Rychlost eliminace je množství léčiva eliminované za jednotku času (jednotka je mol/s, mg/h). Jednotkou clearance je objem/čas (l/h, ml/s, ml/min). Někdy se uvádí ve vztahu k tělesné hmotnosti či povrchu těla (l/h.kg⁻¹, l/h.m⁻²).

Celková clearance odráží celkovou rychlost eliminace léčiva z krve (plazmy) a má aditivní charakter, tj. zahrnuje eliminaci všemi orgány (střevo, játra, ledviny, plíce ...). Kvantitativně nejdůležitější jsou obvykle **clearance renální a jaterní**.

$$CL = CL_R + (CL_J + \text{další})$$

Někdy se používá pojem nerenální clearance (výraz v závorce), což je rozdíl mezi celkovou a renální clearance.

Renální clearance

Renální clearance (CL_R) je množství léčiva vyloučeného za jednotku času ledvinami, vztažené na koncentraci látky v krvi (c). Množství vyloučené za jednotku času se rovná součinu objemu moči vyloučené za jednotku času (objemová rychlost toku moče) a koncentrace léčiva v moči (c_U).

$$CL_R = \frac{\dot{V} c_U}{c} = \frac{(\frac{V}{T}) c_U}{c} = \frac{A_U}{AUC}$$

kde \dot{V} je objemová rychlost toku moče (ml/s), c_U je koncentrace léčiva (obecně jakékoli látky) v moči, c je koncentrace v krvi. Renální clearance léčiva se získá stejným postupem jako clearance kreatininu. Během intervalu sběru T je nasbírána moč o objemu V . Ve jmenovateli se použije průměrná koncentraci léčiva v krvi v rámci intervalu sběru moče. Jestliže se sbírá moč dostatečně dlouho (od podání léčiva až po vymizení léčiva z krve), použije se vztah s A_U (celkové množství léčiva vyloučeného do moče) a AUC (plocha pod křivkou koncentrací léčiva v krvi vs. čas). Přeuspořádáním vztahu dostaneme:

$$CL_R c = \dot{V} c_U$$

Renální clearance můžeme tedy chápat i jako objem krve (plazmy), který se v ledvinách úplně očistí od léčiva za jednotku času.

Podobně celková clearance je objem krve (plazmy), který se úplně očistí od léčiva (objem, ze kterého je úplně odstraněno léčivo) za jednotku času.

Renální exkrece zahrnuje procesy Glomerulární filtrace (GF), aktivní tubulární sekrece a aktivní i pasivní tubulární reabsorpce. GF a sekrece renální clearance zvyšují, zatímco reabsorpce renální clearance snižuje.

Fyziologické rozmezí pro rychlost glomerulární filtrace je 80–120 ml/min. GF se v praxi měří pomocí clearance endogenní látky – kreatininu (Cl_{KR}). Kreatinin se neváže na bílkoviny plazmy, volně se filtruje do primární moči a v tubulech se neabsorbuje ani nesekreduje (k aktivní sekreci dochází pouze při patologicky zvýšené kreatininémii). Při normální funkci ledvin je koncentrace kreatininu v krvi během dne poměrně konstantní. To zjednodušuje výpočet:

$$GF \approx Cl_{KR} = (c_U \cdot V) / (c \cdot T)$$

kde V je objem moči, T je časový interval sběru moči, c_U a c jsou koncentrace kreatininu v moči a plazmě.

Velikost renální clearance umožňuje určité úvahy o mechanismu vylučování léčiv. Např. renální clearance ampicilinu (283 ml/min) vysoko převyšuje velikost glomerulární filtrace, můžeme proto uvažovat o významném příspěvku tubulární sekrece k eliminaci léčiva ledvinami.

Léčivo, které je z velké části vylučováno nemetabolizované do moči a má vysokou hodnotou renální clearance ($\geq 0,1$ l/min), se kumuluje v organismu nemocných se sníženou funkcí ledvin. Rychlost dávkování musí být snížena (dávkovací interval prodloužen event. i snížena jednotlivá dávka). Existuje více způsobů (tabulky, nomogramy, počítačové programy), jak upravovat dávkování těchto léčiv na základě vyšetření GFR.

Jaterní clearance

Jaterní clearance (CL_J) je množství léčiva extrahovaného z krve játry za jednotku času vztahovaná na koncentraci látky v portální krvi:

$$CL_J = Q \frac{c_{in} - c_{out}}{c_{in}}$$

kde Q je objemová rychlost průtoku krve játry (1,5 l/min, 90 l/h), c_{in} je koncentrace léčiva v krvi na vstupu do orgánu (ve v. portae) a c_{out} je koncentrace v krvi z orgánu vytékající (ve v. hepatica).

Zlomek označujeme jako **extrakční poměr (E)**. U látek s vysokou jaterní extrakcí se c_{out} blíží nule a E se blíží 1. U látek s velmi nízkou extrakcí se c_{out} blíží c_{in} a E je velmi nízký (blíží se nule). Velikost clearance léčiva při průchodu orgánem záleží na jeho vlastnostech a na funkčním stavu eliminujícího orgánu. Některá léčiva jsou extrahována játry velmi efektivně již při prvním průchodu. Po perorálním podání se do systémového oběhu dostane jen malá část dávky (< 40 %, ale u mnoha léčiv i méně než 10 %). Hovoříme o významném efektu prvního průchodu játry („first-pass effect“). Eliminace těchto léčiv ze systémového krevního oběhu je limitována rychlostí s jakou je léčivo do orgánu přiváděno (průtokem krve játry). Dávkování musí být při zhoršené funkci jater sníženo, protože biologická dostupnost po perorálním podání stoupá, což se projeví vyššími omezujícími průtok krve orgánem (např. selhávání srdce), včetně vlivu současně podaných léčiv, mohou mít dramatický vliv na jaterní (i renální) clearance, a to dokonce větší než onemocnění eliminujícího orgánu. Průtok krve je ovlivněn také věkem (u starých lidí je nižší).

Pro dávkování léčiv má zásadní význam vztah mezi velikostí clearance a koncentrací léčiva v krvi (tedy nepřímo i dávkou).

Pro většinu léčiv je clearance v rozsahu koncentrací (dávky) používaných v klinické praxi konstantní. Eliminace nepodléhá saturaci a rychlost eliminace je přímo úměrná koncentraci přes faktor úměrnosti, kterým je clearance:

$$\text{rychlost eliminace} = Cl \cdot c$$

Jedná se o **eliminaci prvního řádu**. Čím vyšší je plazmatická koncentrace, tím větší množství léčiva je eliminováno za jednotku času. V grafickém vyjádření plazmatická koncentrace klesá exponenciálně s časem od podání. Farmakokinetika léčiva je označována za **lineární**.

Jestliže některá z eliminačních cest má omezenou kapacitu a podléhá saturaci, clearance se mění v závislosti na koncentraci léčiva (s rostoucí koncentrací klesá).

$$Cl = \frac{\text{rychlost eliminace}}{c} = \frac{V_{MAX}}{K_M + c}$$

Závislost mezi rychlostí eliminace a koncentrací léčiva je analogií enzymové kinetiky (rovnice Michaelise-Mentenové). Rychlost eliminace se s rostoucí koncentrací zvyšuje stále pomaleji. Po dosažení určité koncentrace se rychlost eliminace již dále nezvyšuje (je dosaženo V_{MAX}). Od této koncentrace probíhá eliminace stále stejnou

rychlostí bez závislosti na hodnotě koncentrace. V grafickém vyjádření plazmatická koncentrace klesá lineárně s časem od podání. Jedná se o **eliminaci nultého řádu**. Je typická pro etanol, fenytoina pro teofylin a acylpyrin po vysokých dávkách.

Využití clearance ve farmakokinetických výpočtech

1. Celková clearance rozhoduje o koncentraci léčiva v krvi v ustáleném stavu při opakovaném perorálním podání nebo kontinuální infúzi léčiva:

$$c_{ss}^{av} = \frac{FD}{\tau Cl} = \frac{1,44 t_{1/2} FD}{v_D \tau}$$

c_{ss}^{av} je průměrná koncentrace léčiva v intervalu mezi dávkami (τ) v ustáleném stavu při opakovaném podávání dávky D . F je biologická dostupnost léčiva a $t_{1/2}$ je biologický poločas eliminace. Podíl $\frac{FD}{\tau}$ rychlost přísunu léčiva do organismu.

$$c_{ss} = \frac{R}{Cl}$$

kde c_{ss} je ustálená koncentrace v průběhu i.v. infúze, R je rychlost infúze.

2. Celková clearance může být naopak použita pro výpočet udržovací dávky nebo rychlosti infúze, které jsou potřebné pro udržování cílové koncentrace léčiva v krvi v ustáleném stavu:

$$R = c_{ss} Cl$$

pro kontinuální i.v. infúzi (R je rychlost infúze např. v mg/h).

$$UD = c_{ss}^{av} Cl$$

pro opakované perorální podání (UD je dávka/dávkovací interval např. v mg/h).

3. Číselná hodnota clearance a velikost jejích dvou nejdůležitějších částí (jaterní a renální) vypovídají o intenzitě eliminačních dějů v nejdůležitějších orgánech a o možném vlivu onemocnění těchto orgánů na farmakokinetiku léčiva a tím i na dávkování.

Biologický poločas eliminace

Biologický poločas eliminace je čas potřebný k tomu, aby se koncentrace léčiva v plazmě snížila na polovinu počáteční hodnoty.

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} = \frac{0,693}{k} = \frac{0,693 \cdot v_D}{Cl}$$

kde k je rychlostní konstanta eliminace. Je to sekundární farmakokinetický parametr. Jeho hodnota je určena poměrem dvou primárních parametrů (V_d a Cl). Jednotkou je jednotka času (hodina).

Využití biologického poločasu eliminace ve farmakokinetických výpočtech

1. Podle $t_{1/2}$ a dávkovacího intervalu τ můžeme předpovědět stupeň kumulace léčiva v krvi při opakovaném podávání.

$\tau \simeq t_{1/2}$ kumulace mírná (poměr mezi koncentrací po první dávce a v ustáleném stavu je asi 1:2).

$\tau < t_{1/2}$ významná kumulace (koncentrace v ustáleném stavu je více než dvakrát vyšší než po první dávce).

$\tau > t_{1/2}$ kumulace nízká.

2. $t_{1/2}$ umožňuje odhadnout velikost změn (kolísání) koncentrace léčiva během jednoho dávkovacího intervalu (τ). Pro poměr maximální a minimální koncentrace v ustáleném stavu platí vztah:

$$\frac{c_{max}^{ss}}{c_{min}^{ss}} = e^{k\tau} = e^{\frac{0,693\tau}{t_{1/2}}}$$

Pro $\tau < t_{1/2}$ platí $c_{min}^{ss} > 50 \% c_{max}^{ss}$ tj. malé kolísání v rámci dávkovacího intervalu.

Pro $\tau \simeq t_{1/2}$ platí $c_{min}^{ss} = 50 \% c_{max}^{ss}$ tj. mírné (střední) kolísání v rámci dávkovacího intervalu.

Pro $\tau > t_{1/2}$ platí $c_{min}^{ss} < 50 \% c_{max}^{ss}$ tj. velké kolísání v rámci dávkovacího intervalu.

3. pomocí $t_{1/2}$ odhadujeme čas potřebný k dosažení ustáleného stavu koncentrací léčiva při jeho kontinuálním nezměněném podávání.

Počet $t_{1/2}$ od zahájení podávání léčiva	Koncentrace (v % koncentrace v ustáleném stavu)
1	50 %
2	75 %
3	87,5 %
4	94 %
5	97 %

Plocha pod křivkou (Area Under the Curve - AUC)

je plocha vymezená křivkou koncentrace vs. čas, a to:

1. v časovém intervalu od podání léčiva (čas 0 h) extrapolovaná do nekonečna (pro jednorázové podání léčiva),
2. v časovém intervalu mezi dvěma dávkami (při opakovaném podávání léčiva).

Plocha pod křivkou koncentrací léčiva (AUC) je základní veličinou při stanovení biologické dostupnosti (AUC po jednorázovém podání, AUC po opakovaném podání).

Biologická dostupnost (F)

je množství léčiva z dávky obsažené v podaném léčivém přípravku, které se dostává ve farmakologicky aktivní (ve většině případů metabolicky nezměněné) formě do systémového krevního oběhu. Vyjadřuje se relativně, tj. jako část z dávky a může tedy nabývat hodnot od 0 do 1 (nebo od 0 do 100 je-li vyjádřena v procentech). Při hodnocení biologické dostupnosti má význam i rychlost s jakou se aktivní forma léčiva dostane do systémového oběhu. Biologická dostupnost v sobě tedy zahrnuje aspekt kvantitativní (míru biologické dostupnosti) a rychlostní (rychlost biologické dostupnosti).

Rozlišujeme absolutní a relativní biologickou dostupnost.

Absolutní biologická dostupnost

Absolutní biologická dostupnost je absolutní část z podané dávky, která se z lékové formy (po jiném než intravenózním podání) dostává do systémového krevního oběhu. Zjišťuje se porovnáním AUC při podání léčiva jednak v testované lékové formě a jednak intravenózně. Absolutní biologická dostupnost po intravenózním podání se pokládá za rovnu 1 (100 %), protože se léčivo aplikuje přímo do systémového oběhu a jeho biologická dostupnost je úplná. Úbytek aktivní formy léčiva před dosažením systémového oběhu je cenná informace i z ekonomického hlediska (nízká absolutní biologická dostupnost zvyšuje náklady léčby).

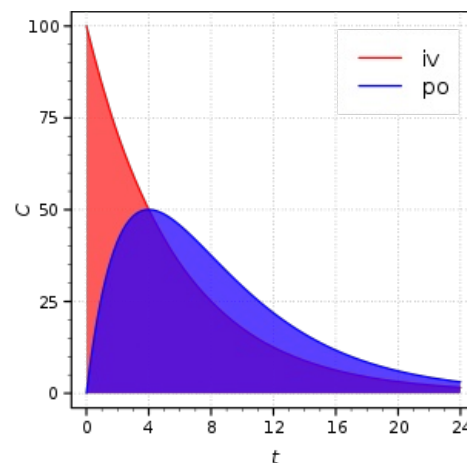
Např. nisoldipin (kalciový antagonist) je kompletně absorbován, podléhá však metabolismu ve střevě a v játrech. Jaterní first-pass effect je mohutný. Neúčinné metabolity jsou vylučovány ledvinami. Důsledkem je, že je-li podán v tabletách, jeho absolutní biologická dostupnost představuje pouze 5,5 %. U nemocných s jaterní cirhózou je v porovnání s osobami se zdravými játry po podání stejné dávky AUC v průměru 3- až 5-krát vyšší. Proto je těmto nemocným nutné podávat úměrně nižší dávky.

Biologická dostupnost (F) v absolutní podobě se stanovuje porovnáním AUC po i.v. podání (kdy se do systémového řečiště dostává celá podaná dávka – absorpce je 100 %) a AUC po extravaskulárním podání, nejčastěji perorálním, kdy absorpce může být ovlivněna řadou dějů (presystémovou eliminací, distribucí aj.).

Relativní biologická dostupnost

Relativní biologická dostupnost je relativní část dávky léčiva, která se dostává do systémového krevního oběhu, při srovnání testované lékové formy s jinou lékovou formou (obě jsou jiné než pro intravenózní podání). Míra i rychlost biologické dostupnosti léčiva z testované lékové formy se tedy srovnává s jeho dostupností z jiné (referenční) lékové formy. Relativní biologická dostupnost se hodnotí v randomizované, zkřížené studii. Stejně skupině zdravých dobrovolníků se podá léčivo dvakrát, a to jednou v testované a jednou v referenční lékové formě. Mezi oběma podáními je vymývací perioda (wash-out). Vyhodnocením změřených koncentrací v krvi (plazmě, séru), nebo množství léčiva vyloučeného do moči jsou získány farmakokinetické parametry léčiva:

- plocha pod křivkou plazmatických koncentrací léčiva (AUC), která vyjadřuje míru biologické dostupnosti
- maximální koncentrace léčiva v krvi (C_{max}) a čas potřebný k jejímu dosažení (t_{max}), které vyjadřují rychlost biologické dostupnosti
- v moči je hodnoceno celkové množství léčiva vyloučeného močí (míra biologické dostupnosti), maximální rychlost močové exkrece a čas dosažení maximální rychlosti močové exkrece (rychlost biologické dostupnosti)



AUC - plazmatická koncentrace léčiva v závislosti na čase po i.v. a p.o. podání

Biologická dostupnost léčiva je ovlivněna dvěma základními fázemi: farmaceutickou a farmakokinetickou.

Farmaceutická fáze

Fáze farmaceutická rozhoduje o farmaceutické dostupnosti, tj. o množství léčiva uvolněného z podaného léčivého přípravku, které se dostává do kontaktu s biologickými membránami, a rychlost, kterou se tento děj uskutečňuje. Rozhoduje o množství léčiva, které je dostupné pro průnik biomembránou. Absorpci uvolněného aktivního léčiva předchází farmaceutické děje desintegrace, desagregace a disoluce, které mohou biologickou dostupnost léčiva významně ovlivnit.

Farmakokinetická fáze

Fáze farmakokinetická zahrnuje základní farmakokinetické děje: absorpci (pouze u extravaskulárních lékových forem), distribuci a eliminaci (biotransformaci a exkreci).

Klinický význam biologické dostupnosti

Klinický význam biologické dostupnosti léčiva spočívá v tom, že umožní posoudit vztah mezi množstvím léčiva, které se nemocnému podává s množstvím, které se skutečně může uplatnit ve farmakoterapeutickém účinku. Informuje i o rychlosti, se kterou se léčivo dostává do krevního oběhu. Protože koncentrace léčiva v krvi bývá v dynamické rovnováze s jeho efektivní koncentrací v místě účinku, pak údaje o biologické dostupnosti léčiva v dané lékové formě umožňují odvodit nástup, intenzitu a dobu působení léčiva. Vysoká presystémová eliminace (nízká absolutní biologická dostupnost) vyžaduje velký rozdíl v definovaném obsahu léčiva v lékové formě. Platí to zejména pro perorální lékové formy např. u betablokátorů, nitrátů, salicylátů, analgetik narkotického typu. Kvantitativní hledisko biologické dostupnosti musí být konstantní, aby lékař při neobvyklých nebo neočekávaných reakcích nemocného na léčivý přípravek mohl vyloučit nedostatečnou míru biologické dostupnosti jako zdroj komplikací. Tento požadavek platí i pro rychlostní hledisko. Je-li relativní biologická dostupnost léčiva rovna 1 (100 %), jsou testovaná a referenční léková forma bioekvivalentní.

Pojmem **biologická ekvivalence** (bioekvivalence), označujeme skutečnost, že po podání stejných dávek léčiva ve dvou lékových formách není v míře i rychlosti biologické dostupnosti aktivní formy léčiva větší rozdíl než (nejčastěji tolerovaných) ± 20 %. Analytická část bioekvivalenční studie (stanovení farmak v biologických tekutinách) se řídí pravidly Správné laboratorní praxe (GLP). Průkaz bioekvivalence je důležitý u generik.

Generika jsou lékové formy obsahující známé léčivo, jehož originální verze a lékové formy již nejsou chráněny příslušným patentem. Po vypršení patentové ochrany se mohou výroby ujmout i jiní výrobci. Aby však jejich produkt (kopie původního léčivého přípravku, generikum) mohl být registrován, musí být prokázáno, že je bioekvivalentní s originálním přípravkem výrobce, který jej obvykle jako první uvedl na farmaceutický trh. Název „generikum“ reflektuje, že tento léčivý přípravek spojuje s původním produktem generický název účinné látky. Význam výroby generik spočívá v tom, že jejich cena je podstatně nižší nežli cena originálního výrobku, protože i výroba generika je levnější. Nezahrnuje vysoké náklady spojené s vývojem každé nové entity a s jejím uvedením na farmaceutický trh.

Průkaz bioekvivalence nezaručuje terapeutickou bioekvivalenci. Tu je nutno prokazovat randomizovanými kontrolovanými klinickými studiemi s nemocnými, zaměřenými na farmakodynamické ukazatele.

Odkazy

Související články

- Základní farmakokinetické parametry ovlivňující hladinu léčiva v ustáleném stavu
- Fyzikálně-chemické základy farmakokinetiky

Zdroj

- Ústav farmakologie LF HK UK. . *Obecná farmakologie jako základ studia farmakologie experimentální a klinické* [online] . 1. vydání. Hradec Králové. 2001. 97 s. Dostupné také z <<https://www.lfhk.cuni.cz/farmakol/predn/cz/ob/31-60.pdf>>. ISBN 80-902883-4-0.

Reference