

PŘEHLEDY A ODBORNÁ SDĚLENÍ

ČESKÁ A SLOVENSKÁ FARMACIE
Ročník LIV – Číslo 1 – LEDEN 2005

IN SITU GELUJÍCÍ POLYMERY PRO OČNÍ KAPKY

ŠKLUBALOVÁ Z.

Katedra farmaceutické technologie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy, Hradec Králové

SOUHRN

In situ gelující polymery pro oční kapky

Jednou z možností jak optimalizovat biodostupnost léčiv po topické oční aplikaci je prodloužení doby kontaktu přípravku s oční tkání. Nejobvyklejší cestou k dosažení tohoto cíle je zvýšení viskozity přípravku přidávkem vhodné pomocné látky. Kromě hydrogelů a mukoadhezivních látek jsou k tomuto účelu v současnosti využívány také polymery, které vykazují fázovou změnu „sol-gel“. K této tzv. gelaci *in situ* dochází ve velmi krátkém čase po kontaktu s oční tkání vlivem změny teploty, pH nebo interakcí s fyziologickými ionty. Tato práce je zaměřena na přehled *in situ* gelujících polymerních látek, které jsou studovány v souvislosti s využitím v oční aplikaci.

Klíčová slova: oční kapky – gelace *in situ* – polymery – polysacharidy

Čes. slov. Farm., 2005; 54, 4–10

SUMMARY

In situ Gelling Polymers for Ophthalmic Drops

One of the possibilities of how to optimize bioavailability of drugs after topical ophthalmic administration is prolongation of the period of contact of the preparation with the eye tissue. The most usual way of achieving this goal is an increase in the viscosity of the preparation by an addition of a suitable auxiliary substance. At present besides hydrogels and mucoadhesive substances, also polymers which produce the sol-gel phase change are employed for this purpose. This so-called *in situ* gelation takes place in a very short period of time after contact with the eye tissue due to a change in temperature, pH, or interaction with physiological ions. The present paper aims to survey *in situ* gelling polymeric substances, which are examined in relation to their use in ophthalmic administration.

Key words: ophthalmic drops – gelation *in situ* – polymers – polysaccharides

Čes. slov. Farm., 2005; 54, 4–10

Má

Absorpce léčiva po topickém podání je omezena bariérovými vlastnostmi oční tkáně a rychlou eliminací přípravku z povrchu oka¹⁾. Klasické oční kapky jsou proto známy svou nízkou biodostupností léčiva²⁾. Z pohledu pacienta však představuje kapalný oční přípravek pro svou snadnou aplikovatelnost ideální lékovou formu. Zvýšení biodostupnosti léčiva lze dosáhnout použitím vhodné pomocné látky, která umožní prodloužit dobu kontaktu až na několik hodin a tím snížit frekvenci aplikací, redukovat aplikovanou dávku i vedlejší nežádoucí účinky léčiva^{3, 4)}.

Nejsnazší cestou k dosažení takového cíle je zvýšení viskozity přípravku přísadou ve vodě rozpustného polymeru⁵⁾ nebo polymeru s mukoadhezivními vlastnostmi⁶⁾. Tolerance oka vůči těmto látkám závisí na povaze polymeru a jeho koncentraci^{7, 8)}. Nejčastěji používanými

viskozifianty jsou deriváty celulosy, polyvinylalkohol a deriváty kyseliny polyakrylové (karbomery)⁹⁾.

Použití hydrogelů ve vyšších koncentracích má ale na druhé straně nevýhody, vyplývající z vyšších hodnot viskozity¹⁰⁾. Dochází ke zvýšení odporu pro pohyb víček, k slzení, je ovlivněno zrakové vnímání, vytvářejí se depozita okolo víček, krusty a film polymeru na rohovce nebo řasách. Rovněž dávkování je velmi variabilní.

Z pohledu formulace očních kapek se proto jako optimálnější řešení jeví použití polymerních látek, které vykazují reversibilní fázovou změnu „sol-gel“ a které během velmi krátké doby po aplikaci přecházejí z kapalného stavu („sol“) na vysoce viskózní gel, který vytváří na povrchu rohovky depo léčiva¹¹⁾. K této tzv. *gelaci in situ* dochází vlivem změny teploty (ethylhydroxyethylcelulosa¹²⁾, poloxamery a poloxaminy^{13, 14)} změnou

pH (celacefat¹⁵), karbomery¹⁶), chitosan¹⁷) (nebo v důsledku reakce s fyziologickými ionty (Gelrite®¹⁸), algináty^{19, 20}).

Tato práce je zaměřena na přehled *in situ* gelujících polymerů studovaných v souvislosti s možným využitím v oční aplikaci. Polymery jsou rozčleněny podle chemické struktury.

Polysacharidy

Významnou skupinou gelujících látek jsou polysacharidy, získávané obvykle z přírodních zdrojů²¹) nebo metabolismem mikroorganismů²²). Vzhledem ke své nízké toxicitě, ceně a dostupnosti jsou preferovány proti syntetickým polymerům. Modifikací struktury lze odstranit některé nevýhody, jako je nekontrolovatelné bobtnání, změny viskozity při skladování, mikrobiální kontaminace, apod.²¹).

Polysacharidy v kontaktu s vodou hydratují za vzniku slizů nebo gelů. Při nízké teplotě jsou jejich řetězce v konformaci náhodného klubka, při zvýšení teploty dochází k tvorbě dvojité šroubovice a vzniku fyzikálních vazeb mezi řetězci, které jsou pro strukturu gelu nutné¹⁴). Ze studií vztahů mezi strukturou a vlastnostmi polysacharidů v souvislosti s tvorbou gelu bylo zjištěno²³), že důležitá je především sekvence a typ vazby mezi monomerními jednotkami: vazba $\beta(1\rightarrow4)$ zapříčiňuje rigiditu struktury oproti lineární $\alpha(1\rightarrow2)$ vazbě; větvení základního řetězce ovlivňuje rozpustnost ve vodě; stupeň acetylace ovlivňuje náboj a koncentraci potřebnou ke gelaci.

Deriváty celulosy

Rozsáhlou skupinou polysacharidů populárních při formulaci léků s prodlouženým uvolňováním jsou deriváty celulosy, které jsou získávány etherifikací volných hydroxylových skupin: methylcelulosa (MC), hydroxymethylcelulosa (HMC), hyselosa (HEC), hydroxypropylcelulosa (HPC), hypromelosa (HPMC), karmelosa (CMC)²⁴). Jsou biologicky kompatibilní a netoxické²¹), jejich dráždivost ale stoupá se stoupající koncentrací²⁵).

Termogelující soustava byla popsána pro směs ethyl(hydroxyethyl) etheru celulosy (EHEC), ionogenního tenzidu a vody^{12, 26}). EHEC patří k derivátům rozpustným lépe za chladu, po zvýšení teploty rozpustnost klesá a soustava geluje. Teplota gelace je závislá na chemické struktuře (počet hydrofilních a ethylových skupin), koncentraci a stupni polymerizace. Při převaze hydrofobních skupin dochází pro 1% vodný roztok ke gelaci při 30 °C, přidávkem tenzidu se v závislosti na jeho koncentraci (do 0,40 %) teplota fázového přechodu mírně zvyšuje (na cca 35 °C). Pravděpodobným mechanismem gelace je vznik fyzikálně zesíťovaných micelárních formací charakteru klastrů, které jsou pospojovány hydrofobními segmenty řetězce EHEC²⁷). Další zvýšení teploty vede k poklesu viskozity vlivem destrukce sítě. Malý přídatek elektrolytu (léčiva) výrazně rozšiřuje oblast termální gelace, pravděpodobně vlivem synergismu mezi elektrolytem a tenzidem. Vzniklý gel umožnil prodloužené uvolňování timololu srovnatelné

s účinkem gelanu¹²). Problémem zůstává přítomnost ionogenního tenzidu, které jsou obecně *in vivo* hůře tolerovány²⁸).

Rovněž celacefat (CAP), ester celulosy s kyselinou octovou a ftalovou, tvoří s vodou nízkoviskózní disperzi, která je schopná spontánní koagulace/gelace v slzném vaku²⁹). K fázové změně dochází v důsledku zvýšení pH ze 4,5 na 7,4 po kontaktu se slzní tekutinou. Koagulovaný systém vytváří depo léčiva a zvyšuje jeho biodostupnost oproti klasickým kapkám³⁰). Mechanismus gelace je připisován neutralizaci kyselých skupin polymerního řetězce¹⁵). Nevýhodou CAP pro použití v očních kapkách je nutnost použití vysoké koncentrace (30 %) pro dosažení dostatečného efektu a dráždivost daná nízkým pH²⁹).

Chitosan

Chitosan je derivát chitinu, přírodního polymeru tvořeného N-acetyl-glukosaminovými (NAG) a N-glukosaminovými (NG) jednotkami, které jsou náhodně nebo blokově distribuovány v řetězci polymeru³¹). Ve struktuře chitosanu převyšuje obsah NG jednotek nad NAG jednotkami³²). Chitosan je v oku dobře tolerovaný polymer³³), jehož biokompatibilita a vlastnosti závisí na stupni deacetylace a zesíťení¹⁷). Vzhledem k tomu, že je nerozpustný v neutrálním a alkalickém prostředí, vytváří pH-senzitivní *in situ* precipitáty. Při stupni deacetylace 85 % je limitní hodnota pH cca 6,2³⁴). V důsledku interakce kationaktivního chitosanu s negativními řetězci sialinu vykazuje polymer také mukoadhezivní vlastnosti a již v nízkých koncentracích (0,5 %) prodlužuje trojnásobně kontakt s rohovkou oproti klasickým kapkám¹⁷).

Roztok chitosanu neutralizovaný glycerofosfátem je fyziologicky akceptovatelný (pH 6,8–7,2), zůstává za pokojové teploty tekutý a geluje pouze vlivem změny teploty³⁵). Tento jev se přisuzuje obecné ochranné funkci vícesytných alkoholů ve vodném prostředí. Hydratované řetězce chitosanu jsou stabilnější a k oslabení interakcí mezi nimi je nutné dodat více energie, takže ke změně organizace prostorové sítě dochází teprve při vyšší teplotě. Má-li přípravek pH cca 7, nastává gelace při 37 °C³⁴). Při tvorbě gelu se uplatňují hydrofobní interakce a vodíkové můstky mezi řetězci chitosanu navzájem a elektrostatická přitažlivost mezi řetězci chitosanu a glycerofosfátem³⁴).

Ke sterilizaci přípravků s chitosanem byla jako vhodná metoda doporučeno použití γ -záření (2,5 Mrad) v nepřítomnosti kyslíku³⁶). Použití ethylenoxidu, který chemicky reaguje, ani tepelná sterilizace, která vede ke snížení rozpustnosti chitosanu, nejsou vhodné³⁷).

Výrazně zvýšit viskozitu gelu chitosanu se podařilo modifikací struktury chitosanu po zabudování thiolových skupin. Tyto tzv. thiolované chitosany velmi dobře gelují *in situ* díky vzniku inter- a intramolekulárních disulfidických můstků³⁸), vzniklý gel má vhodné viskoelastické vlastnosti³⁹) a jeví se jako slibný pro využití v tekutých a polotuhých přípravcích.

Gelanová klovatina (gelan)

Gelanová klovatina je aniontový polysacharid produkováný mikroorganizmem *Pseudomonas elodea*. V jeho struktuře se vyskytují jednotky β -1,3-D-glukózy (60 %), kyseliny β -1,4-D-glukuronové (20 %) a α -1,4-L-rhamnózy (20 %) ⁴⁰. Ve vodném prostředí mají vlákna polymeru tendenci k sobě adherovat a vytvářet objemnou prostorovou síť, v níž je zabudována voda ⁴¹. Počet takových spojení a tendence k tvorbě gelu vzrůstá v přítomnosti kationtů ⁴². Pevnost gelu se pro jednovazné kationty zvyšuje v pořadí $\text{Na}^+ < \text{K}^+ < \text{Cs}^+ < \text{H}^+$, pro dvojevazné v pořadí $\text{Mg}^{2+}, \text{Ca}^{2+}, \text{Sr}^{2+}, \text{Ba}^{2+} < \text{Zn}^{2+} < \text{Cu}^{2+} < \text{Pb}^{2+}$ ⁴³. Interakce s dvojevaznými ionty je málo specifická, čímž se gelan liší od jiných polysacharidů obsahujících uronové jednotky (pektin, alginát).

Částečně deacetylovaná forma gelanu, komerčně dostupná jako Gelrite[®], vytváří reversibilně již v koncentracích nižších než 1% ¹⁸ gel, jehož vlastnosti jsou závislé na koncentraci polymeru, teplotě, přítomnosti vody a kationtů ⁴⁴⁻⁴⁶. Nejdůležitějším kationtem ovlivňujícím tvorbu gelu *in vivo* je Na^+ ⁴⁷. Bylo zjištěno, že k neutralizaci náboje gelanového řetězce je potřebná jen určitá optimální koncentrace iontu, při jejímž překročení se pevnost gelu snižuje ⁴⁸. Tato koncentrace závisí na typu iontu, pro vícevazné je nižší než pro jednovazné ⁴⁹. Pro gelaci 0,5–1% roztoků gelanu je za fyziologických podmínek obsah sodných iontů v slzní tekutině dostatečný ^{18, 47}. Strukturu a vlastnosti gelu ovlivňuje i přítomnost sacharidů, které mohou podporovat uspořádání mřížky vazeb ve šroubovici ⁵⁰.

Po aplikaci na rohovku zvyšuje gelanový gel biodostupnost léčiv přibližně dvojnásobně oproti vodným roztokům (pilokarpin, timolol) ^{51, 52}, nebo suspenzi (ester methylprednisolonu) ⁵³. Protože pro zvýšení transportu léčiva rohovkou je rozhodující prodloužení doby kontaktu bezprostředně po aplikaci ⁵⁴, je zvýšení biodostupnosti podmíněno dostatečnou rychlostí gelace ⁵⁵. V ní hraje významnou roli osmotický gradient mezi roztokem a slzní tekutinou, který závisí na použité koncentraci gelanu a ostatních látek (izotonizační a pufrovací přísady, protimikrobní látky) ⁵⁶. Reologické vlastnosti vzniklých gelů podmiňují dobu setrvání přípravku v oku (až 20 hod.) ⁵⁵ a frekvenci dávkování ⁵².

Ke sterilizaci gelanových gelů byla jako vhodná metoda navržena horkovzdušná sterilizace ⁵⁵, neboť po sterilizaci v autoklávu dochází k poklesu viskozity výsledného přípravku.

V roce 1992 byl gelan akceptován FDA ^{42, 57}, neboť toxikologické studie prokázaly jeho relativní neškodnost ^{51, 58}. Některé novější studie však upozorňují na možnost vzniku neprůsvitných gelů a ovlivnění zrakového vnímání ⁵³ nebo vznik povlaků na rohovce po dlouhodobé aplikaci ⁵⁹.

Obdobně jako u chitosanu ³⁸ byl zesíťtím gelanu s L-cysteinem připraven polymer, který je díky vzniku inter- a intra-molekulárních disulfidických vazeb schopen ve vodném prostředí při pH 7 a v přítomnosti fyziologických iontů intenzivně gelace *in situ* ⁶⁰.

Algináty

Kyselina alginová je přírodní hydrofilní polysacharid

získávaný z mořských řas. Jeho chemická struktura je tvořena blokovým kopolymerem dvou monomerních jednotek: β (1→4)-D-manuronové kyseliny (M) a α (1→4) L-guluronové kyseliny (G), které jsou seřazeny jako homopolymerní bloky (M-M nebo G-G) společně se střídajícími se sekvencemi M-G ¹⁹.

Kyselina alginová tvoří s alkaloidy soli s prodlouženou terapeutickou aktivitou ⁶¹, což je využito i u očního inzertu Ocusertu ⁶².

V přítomnosti jednovazných kationtů kyselina snadno a rychle vytváří čirý, viskózní roztok, který v přítomnosti vícevazných kationtů (kromě hořčnatých) přechází na trojrozměrnou síť ionotropní hydrogelové matrice ²⁰. V ní je kapilárními silami vázána voda, která může z matrice migrovat, což má velký význam při formulaci lékových forem. Příčinou gelace nebo zesíťtění je interakce příslušného iontu s kyselinou guluronovou ²¹. Interakci s ionty ovlivňuje stupeň acetylace. Zatímco nízkoacetylované algináty vykazují silnou selektivní vazbu s Ca^{2+} a Sr^{2+} , acetylované mají vazebnost a selektivitu nízkou ²³. Výborné mechanické a reologické vlastnosti má především gel alginátu vápenatého, který vzniká i z roztoků o velmi nízké koncentraci (0,5 %) ⁶³.

Mechanická odolnost a porosita alginátového gelu je závislá na poměru G:M, typu iontového síťovadla, koncentraci a počáteční viskozitě roztoku ¹⁹. Algináty s nízkým obsahem guluronové kyseliny (<40 %) gelují v umělé slzní tekutině v relativně vysokých koncentracích a pomalu (déle než 10 min), což je pro použití v očních kapkách nevhodné. Naproti tomu algináty s vysokým obsahem guluronové kyseliny (65 %) tvoří v přítomnosti fyziologického množství iontů vápníku gel s vhodnými reologickými vlastnostmi.

Kromě vápenatých iontů hraje při zesíťtění v slzní tekutině roli také interakce s proteiny, především lysinem ⁶⁴. Vzniklý polyelektrolytový gel vykazuje strukturální stabilitu za fyziologických podmínek ⁶⁵, prodlužuje kontakt s rohovkou, a tím i biodostupnost léčiv (pilokarpinu ¹⁹, karteololu ⁶⁶).

Léčiva se z matrice alginátového gelu uvolňují v závislosti na pH ¹⁹. Průběh uvolňování léčiva je řízen osmotickým tlakem doprovázejícím bobtnání struktury alginátového gelu ²⁰ nebo difúzí a rozpouštěním matrice ²¹. Zabudováním hydrogelu nezávislého na pH (např. celulosový derivát) do alginátové matrice může být dosaženo uvolňování zásaditých léčiv nezávisle na pH ⁶⁷.

Jako slibný se jeví také komplex alginátu s chitosanem, který vytvoří při změně pH z kyselého na neutrální zbobtnalou gelovou matici s pomalejší erozí a uvolňováním léčiva ⁶⁸.

Alginátový gel je v oku dobře tolerován. Žádné abnormality nebo poškození rohovky, spojivky či duhovky nebyly pozorovány po aplikaci 2% roztoku pilokarpinu do oka králíka dvakrát denně po dobu 7 dní ¹⁹ ani po 28 denní aplikaci 1% karteololu ⁶⁶.

Ostatní

Kromě již uvedených látek byla termoreverzibilní gelace popsána také pro polysacharidy xyloglukan ⁶⁹,

xanthan a galaktomanan⁷⁰). Omezením pro použití jako *in situ* gelujících polymerů v očních kapkách je nevhodná teplota fázové změny. Popsány byly i některé další látky, jako např. poly-D-glukuronová kyselina, schopná termoreverzibilní tvorby gelu a interakce s jedno- a více-vaznými ionty^{71, 72}).

Syntetické polymery

Polyakrylamidy

Bobtnání zesítěných N,N'-substituovaných akrylamidů ve vodě a uvolňování léčiv ze vzniklých gelů bylo studováno v závislosti na vnější teplotě a složení polymeru⁷³). Ze studovaných látek vykázal vhodné vlastnosti a ostrou teplotu fázového přechodu pouze poly(N-isopropylakrylamid) (PNIPAAm)⁷⁴). Vodný roztok PNIPAAm je při teplotě místnosti čirý, po kontaktu s oční tkání dojde vlivem zvýšení teploty k dehydrataci amidové skupiny, změně konformace řetězců a vzniku gelu, který vytvoří na povrchu rohovky tenký film⁷⁵). Strukturu a vlastnosti gelu ovlivňuje přítomnost iontů (např. solí léčiva) a tenzidů^{76, 77}), teplotu fázového přechodu pak přítomnost hydrofilních nebo lipofilních látek^{78, 79}). Uvolňování léčiva z gelu závisí na charakteru vazeb mezi řetězci polymeru a léčivem (vodíkové můstky, hydrofobní vazby, apod.)⁸⁰).

Oční systém s obsahem lineárního nebo směsi lineárního a zesítěného PNIPAAm prodloužil efekt epinefrinu na 6–8násobek⁸¹). Nevýhodou je, že film polymeru může zapříčinit ucpání slzných kanálků⁸²).

Pro zlepšení mechanických vlastností gelu PNIPAAm byla testována kombinace s hydrofilním polymerem (poly(2-hydroxyethyl methakrylát), PHEMA)⁸³). Bylo dosaženo poklesu nitroočního tlaku po aplikaci epinefrinu na 26 hodin (klasické kapky 8 hodin). Kinetika uvolňování závisí na stupni zesítění a bobtnání matrice polymeru, ovlivněném obsahem hydrofilního PHEMA. V závěru autoři poukazují na neškodnost polymeru, kterou sledovali na kultuře buněk králičího oka. Polymery ovšem nejsou fyziologicky odbouratelné.

Karbomery

Zesítěná kyselina polyakrylová (PAA) (karbomer, Carbopol) tvoří ve vodě málo viskózní koloidní roztok s kyselým pH, který po neutralizaci vytváří gel¹⁶). Karbomery mají pro oční aplikaci řadu výhod^{84, 85}): široké rozpětí viskozity s přímou závislostí na koncentraci, kompatibilita s řadou léčiv a významná mukoadhezivita, a jsou proto v současné době v očních přípravcích široce používány⁸⁶). Mechanismus interakce s mucinem je nespécifický^{87, 88}) a pro jeho zachování je nutná přítomnost dostatečného množství ionizovatelných karboxylových skupin⁸⁹).

Gel karbomeru prodlužuje dobu kontaktu s oční tkání, a tím biodostupnost pilokarpinu^{84, 90}), timololu⁸⁵) nebo tropikamidu⁹¹). Vzhledem k nízké pufrovací kapacitě oka je obvyklá koncentrace PAA cca 0,2%⁹²). Protože chlorid sodný významně snižuje viskozitu gelu, je pro izotonizaci kapek vhodnější mannitol, který viskozitu, tokové vlastnosti ani pH gelu neovlivňuje⁹²).

Studium chování 0,25% hydrogelu Carbopolu 934 ve směsi s neionogenními (Polysorbát 80, Pluronic F-127)⁹³) nebo ionogenními tenzidy (benzalkonium chlorid, dodecylsulfát sodný)⁹⁴) ukázalo, že vznikající vazby mezi karboxyly PAA a řetězci neionogenního tenzidu nebo iontové a elektrostatické vazby s ionogenními tenzidy ovlivňují reologické chování gelu a jeho hydrataci. Tyto jevy mohou mít význam při kombinaci s pomocnými látkami nebo léčivy.

Výhodné vlastnosti mají také směsi PAA s jinými polymery. Přídavkem HPMC se podařilo vylepšit reologické vlastnosti vznikajícího gelu a prodloužit účinek timololu⁹⁵) nebo ofloxacinu⁹⁶). Stejná směs umožnila uvolňování ciprofloxacinu kinetikou nultého řádu po dobu 24 hod.⁹⁷). Také kombinace s methylcelulosou je výhodná, neboť směs geluje nejen v závislosti na pH, ale i teplotě (mezi 25–37 °C), pravděpodobně díky poklesu hydratace MC a změně konformace polymerního řetězce¹⁶).

Přestože jsou karbomery v oku dobře tolerovány i při dlouhodobé aplikaci⁹⁸), u citlivějších pacientů byla pozorována tvorba neprůhledných povlaků na rohovce⁹⁹). Některým pacientům může působit obtíže také samotná aplikace viskózních gelů¹⁰⁰). Protože jsou karbomery používány často v přípravcích pro terapii syndromu suchých očí, byla navržena kombinace PAA s povidonem¹⁰¹).

Karbomer jako polyelektrolyt je intenzivně studován také jako elektro-senzitivní polymer, např. v kombinaci s alginátem sodným¹⁰²) nebo polyvinylalkoholem¹⁰³). Tyto polymery nabízejí možnost uvolňování léčiv (např. inzulinu) v odpověď na chemické reakce probíhající v lidském těle¹⁰⁴).

Rovněž polykarbofil, zesítěný derivát kyseliny polyakrylové, vykazuje mukoadhezivní vlastnosti a gelaci *in situ* vlivem změny pH²⁹). Aplikace kapek s obsahem polykarbofilu umožnila snížit dávkování fluorometholonu na polovinu při zachování terapeutické hladiny v humorální tekutině¹⁰⁵).

Poloxamery

Endotermní fázové změně „sol-gel“ podléhají také kopolymery ethylenoxidu a propylenoxidu (PEO-PPO-PEO, Pluronic®, poloxamery) s různou molekulární hmotností a poměrem složek^{106, 107}). Hlavní roli v procesu gelace hraje molární podíl PPO jednotek¹⁰⁸). Mechanismus gelace je popisován jako uspořádání původních sférických micel do micelární mřížky^{14, 109}). Polymer existuje jako gel jen mezi dvěma kritickými fázovými teplotami, které se mění se složením a koncentrací^{13, 110}). Vhodnou teplotu fázového přechodu je možné dosáhnout i kombinací různých analogů poloxameru¹¹¹).

V *in vivo* experimentu bylo zjištěno, že doba prodlouženého kontaktu s oční tkání je závislá na koncentraci polymeru (obvykle nad 20 %) a dosahuje maxima cca 1 hodiny¹¹²).

Proces gelace ovlivňuje přítomnost řady látek, především solí^{113, 114}). Tento jev je vysvětlován tak, že v přítomnosti solí se zvyšuje ionizace a polarita segmentů

polymeru, mění se kritická micelární koncentrace a teplota fázové změny. Míra ovlivnění závisí na koncentraci iontu a na charakteru kationtu a aniontu ^{114, 115}). V důsledku toho může docházet ke změnám reologického chování vznikajícího gelu po přidání izotonizační ¹¹⁶) nebo pufovací přísady ¹¹⁴), případně gel vůbec nevznikne ¹¹⁴).

Při studiu vlivu dalších pomocných látek na formulaci poloxamerového očního přípravku bylo zjištěno, že přísada polyethylenglykolu nebo povidonu urychluje uvolňování léčiva (pilokarpin) ¹¹⁷), zatímco přídavek methylcelulosy nebo HPMC umožnil jeho prodloužené uvolňování ¹¹⁸). Podobný vliv viskozifiantů byl zjištěn i pro timolol a nejpomalejší uvolňování léčiva bylo zaznamenáno při kombinaci Pluronicu F-127 (15 %) s methylcelulosou (3 %) ¹¹⁶).

Tvorbu gelu s různými vlastnostmi v závislosti na stupni ionizace umožnila směs poloxameru a karbomeru, která je citlivá nejen ke změnám teploty, ale i pH ¹¹⁹). Směs geluje v širokém rozmezí pH a umožnila za fyziologických podmínek zvýšit biodostupnost pilokarpinu.

Přestože jsou poloxamery intenzivně studovány jako biodegradabilní polymery v aplikaci léčiv ^{120, 121}), ukázalo se, že k oční aplikaci nejsou příliš vhodné vzhledem ke krátkodobému efektu ¹¹²) a nutnosti použití vysoké koncentrace ^{110, 113}). Díky tomu mohou vyvolávat změny na sítnici ¹²²). Nevýhodou je také to, že přípravek je nutno uchovávat za snížené teploty, jinak má gelovitou konzistenci, je obtížně aplikovatelný a může při aplikaci dráždit ¹³).

Podobně jako poloxamery také poloxaminy (Tetronics®), deriváty alken diaminů a poloxamerů, v koncentraci 20–25 % vykazují teplotně závislou gelaci doprovázenou dramatickým vzestupem viskozity ¹³). Gely jsou díky své čirosti vhodné pro oční použití, jejich širšímu uplatnění však podobně jako u poloxamerů brání dráždivost ¹²³).

Nové polymery

Odstranění problémů s dráždivostí slibují nové generace polymerů připravené z již známých a používaných polymerů formou polymerní sítě („interpenetrating polymer networks“, (IPNs)) ^{124, 125}), v nichž se jeden polymer prolíná s druhým, nebo spojením chemickou vazbou jako tzv. „graft polymers“ ^{126, 127}).

Příkladem může být Smart Hydrogel™ se stejným podílem Pluronicu F-127 a karbomeru, který kombinuje účinek termo-senzitivního a pH-senzitivního polymeru ¹²⁸). V koncentraci 1–5 % polymer geluje při teplotě 37 °C a toxikologická studie na zvířatech prokázala jeho neškodnost ¹²⁹).

Slibné výsledky nabízí i kombinace PNIPAAm s chitosanem pro uvolňování pilokarpinu ¹²⁵) či Pluronicu s chitosanem nebo s kyselinou hyaluronovou pro uvolňování ciprofloxacinu ¹³⁰).

V této oblasti probíhá v současnosti velmi intenzivní výzkum, který se odráží i v počtu prací publikovaných v odborných farmaceutických časopisech.

ZÁVĚR

Snaha zajistit zvýšení účinku léčiva po topické oční aplikaci, snížit frekvenci jeho dávkování, a tím i pokles vedlejších nežádoucích účinků není ve vývoji očních přípravků ničím novým. Úspěch lze přitom velmi často zajistit pozornou formulací lékové formy a volbou vhodné pomocné látky.

V souvislosti s celkovým nárůstem výzkumu polymerů v medicíně a aplikaci léčiv ^{131, 132}) stoupá i počet látek, které jsou pro svůj potenciální přínos testovány v oční aplikaci.

Významnou skupinou pomocných látek již dlouho osvědčeně používaných v očních přípravcích jsou hydrogely ^{5, 10}). Díky problémům doprovázejícím aplikaci přípravků s vyšší viskozitou však většina pacientů, i přes nevýhodu časté aplikace, stále preferuje klasické vodné kapky.

Z tohoto pohledu jsou oční kapky obsahující *in situ* gelující polymerní látky velmi atraktivní, neboť umožňují snadno a s dostatečnou přesností aplikovat tekutý přípravek a přitom přinášet výhody prodlouženého kontaktu s oční tkání a zvýšené biodostupnosti léčiva ^{11, 16, 57}).

Přestože některé *in situ* gelující polymery vykazují nízkou toxicitu či dráždivost pro oční tkáň a jsou již komerčně používány, syntéza nových polymerů s vyšší biokompatibilitou a možností biodegradace je nutností pro úspěšné využití v očních přípravcích, neboť oko je velmi citlivý a nenahraditelný orgán.

Tato práce je součástí řešení výzkumného projektu podporovaného grantem MŠM 111600001.

LITERATURA

1. Lee, V. H. L., Robinson, J. R.: J. Pharm. Sci., 1979; 68, 673 až 684.
2. Järvinen, K., Järvinen, T., Urtti, A.: Adv. Drug Del. Rev., 1995; 16, 3-19.
3. Chrai, S. S., Robinson, J. R.: J. Pharm. Sci., 1974; 63, 1218 až 1223.
4. Sasaki, H. et al.: Prog. Retinal Eye Res., 1996; 15, 583-620.
5. Guo, J. H. et al.: PSTT, 1998; 1, 254-261.
6. Saettone, M. F. et al.: J. Ocular Pharm., 1994; 10, 83-92.
7. Ludwig, A., Van Ooteghem, M.: Int.J.Pharm., 1989; 54, 95 až 102.
8. Greaves, J. L., Olejnik, O., Wilson, C. G.: S.T.P. Pharm. Sci., 1992; 63, 13-33.
9. Sintzel, M. B. et al.: Eur. J. Pharm. Biopharm., 1996; 42, 358 až 374.
10. Zignani, M., Tabatabay, C., Gurny, R.: Adv. Drug Del. Rev., 1995; 16, 51-60.
11. Robinson, J. R., Mlynek, G. M.: Adv. Drug Del. Rev., 1995; 16, 45-50.
12. Lindell, K., Engström, S.: Int. J. Pharm., 1993; 95, 219-228.
13. Saettone, M. et al.: Int. J. Pharm., 1984; 22, 207-218.
14. Jeong, B., Kim, S. W., Bae, Y. H.: Adv. Drug Del. Rev., 2002; 54, 37-51.
15. Gurny, R. et al.: J. Control. Rel., 1987; 6, 367-373.

16. Kumar, S., Haglund, B. O., Himmelstein, K. J.: *J. Ocular Pharmacol.*, 1994; 10, 47-56.
17. Felt, O. et al.: *Int. J. Pharm.*, 1999; 180, 185-193.
18. Rozier, A. et al.: *Int. J. Pharm.*, 1989; 57, 163-168.
19. Cohen, S. et al.: *J. Control. Rel.*, 1997; 44, 201-208.
20. Tønnesen, H. H., Karlsen, J.: *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 2002; 28, 621-630.
21. Bhardway, T. R. et al.: *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 2000; 26, 1025 až 1038.
22. Sutherland, I.W.: *Trends in Biotechnol.*, 1998; 16, 41-46.
23. Sutherland, I. W.: *Int. Dairy J.*, 2001; 11, 663-674.
24. Karatas, A., Baykara, T.: *Il Farmaco*, 2001; 56, 197-202.
25. Ludwig, A. et al.: *Int. Ophthalmol.*, 1992; 16, 23-26.
26. Kamenka, N. et al.: *J. Phys. Chem.*, 1994; 98, 6785-6789.
27. Carlsson, A., Karlström, G., Lindman, B.: *Colloids. Surf.*, 1990; 47, 147-165.
28. Grant, R. L. et al.: *Toxicology*, 1992; 76, 153-176.
29. Gurny, R., Boye, T., Ibrahim, H.: *J. Control. Rel.*, 1985; 2, 353-361.
30. Ibrahim, H. et al.: *Int. J. Pharm.*, 1991; 77, 211-219.
31. Khor, E.: *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.*, 2002; 6, 313-317.
32. Khor, E., Lim, L. Y.: *Biomaterials*, 2003; 24, 2339-2349.
33. Alonso, M. J., Sánchez, A.: *J. Pharm. Pharmacol.*, 2003; 55, 1451-1463.
34. Ruel-Gariépy, E. et al.: *Int. J. Pharm.*, 2000; 203, 89-98.
35. Chenite, A. et al.: *Biomaterials*, 2000; 21, 2155-2161.
36. Lim, L. Y., Khor, E., Koo, O.: *J. Biomed. Mater. Res.*, 1998; 43, 282-290.
37. Lim, L. Y., Khor, E., Ling, C. E.: *J. Biomed. Mater. Res.*, 1999; 48, 111-116.
38. Bernkop-Schnürch, A., Hornof, M., Guggi, D.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2004; 57, 9-17.
39. Hornof, M. D., Kast, C. E., Bernkop-Schnürch, A.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2003; 55, 185-190.
40. Jansson, P. E., Lindberg, B., Stanford, P. A.: *Carbohydr. Res.*, 1983; 124, 135-139.
41. Stokke, B. T., Elgsaeter, A., Kitamura, S.: *Int. J. Biol. Macromol.*, 1993; 15, 63-68.
42. Giavasis, I., Harvey, L. M., McNeil, B.: *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2000; 20, 177-211.
43. Grasdalen, H., Smidsrød, O.: *Carbohydr. Polym.*, 1987; 7, 371-393.
44. Yuguchi, Y. et al.: *Food Hydrocoll.*, 1993; 7, 373-385.
45. Bhardwaj, T. R. et al.: *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 2000; 26, 1025 až 1038.
46. Rinaudo, M.: *Food Hydrocoll.*, 2001; 15, 433-440.
47. Paulsson, M., Hägerström, H., Edsman, K.: *Eur. J. Pharm. Sci.*, 1999; 9, 99-105.
48. Tang, J., Tung, M.A., Zeng, Y.: *Carbohydr. Polym.*, 1996; 29, 11-16.
49. Mazen, F., Milas, M., Rinaudo, M.: *Int. J. Biol. Macromol.*, 1999; 26, 109-118.
50. Tang, J. et al.: *Carbohydr. Polym.*, 2001; 44, 197-209.
51. Maurice, D. M., Srinivas, S. P.: *J. Pharm. Sci.*, 1992; 81, 615 až 619.
52. Shedden, A., Laurence, J., Tipping, R.: *Clinical Therapeutics*, 2001; 23, 440-450.
53. Sanzgeri, Y. D. et al.: *J. Control Rel.*, 1993; 26, 195-201.
54. Meseguer, G. et al.: *Int. J. Pharm.*, 1993; 95, 229-234.
55. Rozier, A. et al.: *Int. J. Pharm.*, 1997; 153, 191-198.
56. Carlfors, J. et al.: *Eur. J. Pharm. Sci.*, 1998; 6, 113-119.
57. Ding, S.: *PSTT*, 1998; 1, 328-335.
58. Sanderson, G. R., Clark, R. C.: *Food Technol.*, 1983; 37, 63 až 70.
59. Gunning, F. P. et al.: *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 1993; 231, 384-388.
60. Krauland, A. H., Leitner, V. M., Bernkop-Schnürch, A.: *J. Pharm. Sci.*, 2003; 92, 1234-1241.
61. Bechtold, A. W., Rizzo, V. J.: 1969; U.S. Patent 3, 450, 814.
62. Loucas, S. P., Hadda, H. M.: *J. Pharm. Sci.*, 1972; 61, 985-986.
63. Liu, X. et al.: *Polymer*, 2003; 44, 407-412.
64. King, A. J. et al.: *Biotech. Prog.*, 1987; 3, 231-240.
65. Cohen, S. et al.: *Biochim. Biophys. Acta.*, 1991; 1063, 95-102.
66. Séchoy, O. et al.: *Int. J. Pharm.*, 2000; 207, 109-116.
67. Chan, L. W., Heng, P. W. S.: *J. Microencaps.*, 1998; 15, 409 až 420.
68. Fernández-Hervás, M. J. et al.: *Int. J. Pharm.*, 1998; 163, 23 až 34.
69. Miyazaki, S. et al.: *J. Control. Rel.*, 1998; 56, 75-83.
70. Rinaudo, M.: *Food Hydrocoll.*, 2001; 15, 433-440.
71. Courtois, J. et al.: *J. Carbohydr. Chem.*, 1993; 12, 441-448.
72. Heyraud, A. et al.: *Carbohydr. Res.*, 1993; 240, 71-78.
73. Bromberg, L. et al.: *J. Chem. Phys.*, 1997; 106, 2906-2911.
74. Okano, T. et al.: *J. Control. Rel.*, 1990; 11, 255-265.
75. Hirokawa, Y. et al.: *Macromolecules*, 1999; 32, 7093-7099.
76. Gutowska, A. et al.: *J. Control. Rel.*, 1992; 22, 95-104.
77. Serres, A., Baudyš, M., Kim, S. W.: *Pharm. Res.*, 1996; 13, 196 až 201.
78. Chung, J. E. et al.: *J. Control. Rel.*, 1999; 62, 115-127.
79. Aoyagi, T. et al.: *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 2000; 11, 101 až 110.
80. Palasis, M., Gehrke, S. H.: *J. Control. Rel.*, 1992; 18, 1-11.
81. Hsiue, G. H. et al.: *Biomaterials*, 2002; 23, 457-462.
82. Kaufman, P. L. et al.: *Ophthalmology*, 1994; 101, 1672 až 1679.
83. Hsiue, G. H. et al.: *Biomaterials*, 2003; 24, 2423-2430.
84. Davies, N. M. et al.: *Pharm. Res.*, 1991; 8, 1039-1043.
85. Thermes, F. et al.: *Int. J. Pharm.*, 1992; 81, 59-65.
86. Jani, R. et al.: *J. Ocul. Pharmacol.*, 1994; 10, 57-67.
87. Leung, S. H. S., Robinson, J. R.: *J. Control. Rel.*, 1988; 5, 223 až 231.
88. Thermes, F. et al.: *Pharm. Res.*, 1992; 9, 1563-1567.
89. Park, H., Robinson, J. R.: *Pharm. Res.*, 1987; 4, 457-464.
90. Edsman, K., Carlfors, J., Harju, K.: *Int. J. Pharm.*, 1996; 137, 233-241.
91. Davies, N. M. et al.: *Pharm. Res.*, 1992; 9, 1137-1144.
92. Ünlü, N. et al.: *Pharm. Acta Helv.*, 1992; 6, 5-10.
93. Barreiro-Iglesias, R., Alvarez-Lorenzo, C., Concheiro, A.: *Int. J. Pharm.*, 2003; 258, 165-177.
94. Barreiro-Iglesias, R., Alvarez-Lorenzo, C., Concheiro, A.: *Int. J. Pharm.*, 2003; 258, 179-191.
95. Kumar, S., Himmelstein, K. J.: *J. Pharm. Sci.*, 1995; 84, 344 až 348.
96. Srividya, B., Cardoza, R. M., Amin, P. D.: *J. Control. Rel.*, 2001; 73, 205-211.
97. Charoo, N. A., Kohli, K., Ali, A.: *J. Pharm. Sci.*, 2003; 92, 407 až 413.
98. Maas, S. et al.: *Int. Ophthalmol.*, 1991; 15, 281-284.
99. Allen, R. C. et al.: *Am. J. Ophthalmol.*, 1984; 97, 723-729.
100. Winfield, A. J. et al.: *Br. J. Ophthalmol.*, 1990; 74, 477-480.
101. Oechsner, M., Keipert, S.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 1999; 47, 113-118.
102. Yuk, S. H., Cho, S. H., Lee, H. B.: *Pharm. Res.*, 1992; 9, 955 až 957.
103. Kim, S. Y., Lee, Y. M.: *J. Appl. Polym. Sci.*, 1999; 74, 1752 až 1761.
104. Murdan, S.: *J. Control. Rel.*, 2003; 92, 1-17.
105. Middleton, D. L., Robinson, J. R.: *S.T.P. Pharma Sci.*, 1991; 1, 200-206.
106. Hoffman, A. S., Afrassiabi, A., Dong, L. C.: *J. Control. Rel.*, 1986; 4, 213-222.
107. Alexandridis, P., Hatton, T. A.: *Colloid Surfaces A*, 1995; 96, 1-46.
108. Wang, P., Johnston, T. P.: *J. Appl. Polym. Sci.*, 1991; 43, 283 až 292.
109. Alexandridis, P., Holzwarth, J. F., Hatton, T. A.: *Macromolecules*, 1994; 27, 2414-2425.
110. Mortensen, K., Pedersen, S.: *Macromolecules*, 1993; 26, 805 až 812.
111. Wei, G. et al.: *J. Control. Rel.*, 2002; 83, 65-74.
112. Edsman, K., Carlfors, J., Petersson, R.: *Eur. J. Pharm. Sci.*, 1998; 6, 105-112.
113. Juhasz, J. et al.: *J. Colloid. Interface Sci.*, 1990; 136, 168-174.
114. Pandit, N., Kisaka, J.: *Int. J. Pharm.*, 1996; 145, 129-136.
115. Malmsten, M., Lindman, B.: *Macromolecules*, 1992; 25, 5440-5445.
116. El-Kamel, A. H.: *Int. J. Pharm.*, 2002; 241, 47-55.
117. Desai, S. D., Blanchard, J.: *J. Pharm. Sci.*, 1998; 87, 226-230.
118. Desai, S. D., Blanchard, J.: *J. Pharm. Sci.*, 1998; 87, 1190 až 1195.
119. Lin, H. R., Sung, K. C.: *J. Control. Rel.*, 2000; 69, 379-388.
120. Matschke, C. et al.: *J. Control. Rel.*, 2002; 85, 1-15.
121. Hatefi, A., Amsden, B.: *J. Control. Rel.*, 2002; 80, 9-28.
122. Davidorf, F. H. et al.: *Retina*, 1998; 10, 297-300.
123. Moghimi, S. M., Hunter, A. C.: *Trends in Biotechnol.*, 2000; 18, 412-420.

124. **Aoki, T. et al.:** *Macromolecules*, 1994; 27, 947-952.
 125. **Verestiuc, L. et al.:** *Int. J. Pharm.*, 2004; 269, 185-194.
 126. **Chen, G., Hoffman, A. S.:** *Nature*, 1995; 373, 49-52.
 127. **Jeong, B., Gutowska, A.:** *Trends in Biotechnol.*, 2002; 20, 305 až 311.
 128. **Orkisz, M. J. et al.:** *Proc. Polym. Mater. Sci. Eng.*, 1997; 76, 276 až 277.
 129. **Bromberg, L. E., Ron, E. S.:** *Adv. Drug Del. Rev.*, 1998; 31, 197-221.
 130. **Cho, K. Y. et al.:** *Int. J. Pharm.*, 2003; 260, 83-91.
131. **Qiu, Y., Park, K.:** *Adv. Drug Del. Rev.*, 2001; 53, 321-339.
 132. **Malmsten, M.:** *Surfactants and polymers in drug delivery*. New York, Marcel Dekker, 2002, s. 348.

Došlo 14. 1. 2004.

Přijato ke zveřejnění 25. 2. 2004.

*PharmDr.Zdeňka Šklubalová, PhD.
 Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové
 e-mail: sklubalo@faf.cuni.cz*

Z ČINNOSTI FARMACEUTICKÝCH SPOLEČNOSTÍ

● Zasedání Rady a Světový kongres FIP 2004

Ve dnech 3.–9. září 2004 pořádala v New Orleansu, USA Mezinárodní farmaceutická federace (FIP) Světový kongres farmacie a farmaceutických věd. Při této příležitosti zasedal i nejvyšší orgán této federace, Rada FIP, složená ze zástupců jednotlivých členských farmaceutických společností.

Na programu byly zprávy z předchozího kongresu v Sydney (2003) a materiály na jeho základě vzniklé, dále požadavky národních společností na přijetí, eventuálně ukončení členství ve FIP, volby víceprezidentů a předsedajících, finanční zpráva, plán rozpočtu na rok 2005, informace o udělených počtech a zprávy jednotlivých sekcí FIP za rok 2003. V sobotu 4. září se projednávala následující prohlášení: o profesních standardech a etice farmaceutů, o politice a zacházení s informacemi při výuce farmaceutické praxe, o testech prováděných v lékárnách, o léčích ovlivňujících řízení motorových vozidel a ovládání dalších strojů. Další den, 5. září byl kongres zahájen a probíhalo sympozium nemocničního lékárenství. V dalších dnech probíhala paralelně sympozia jednotlivých sekcí: farmaceutického vzdělávání, farmaceutického průmyslu, lékárenství, vojenské farmacie, farmakoinformatiky, klinické biochemie, historie farmacie a Mezinárodní studentské farmaceutické federace. Ve středu 8. září se konala konference zástupců jednotlivých zemí věnovaná bezpečnosti pacientů. Odezněly zde přednášky ze Švédska, Dánska a USA následované diskuzními příspěvky. FIP vydala k této problematice své stanovisko. Bližší informace jsou na www.fip.org

M. Rabišková

● První kroky v EU

Česká farmaceutická společnost se stala spolupořadatelem trilaterálního symposia „Joint Meeting 2004“ konaného 6.–9. října v prostorách Univerzity v Regensburgu. Spolu s Německou farmaceutickou společností a Rakouskou farmaceutickou společností vytvořila podmínky pro setkání téměř 650 farmaceutů ze všech tří zemí a dále Polska a Maďarska. Naše společnost byla zastoupena 57 účastníky, a to především z královéhradecké a brněnské farmaceutické fakulty. Vysoká aktivní účast byla z řad doktorandů obou fakult. Jednací řečí byla angličtina a němčina. V jednání členů EU byla respektována převaha angličtiny; 90 % přednášek a posterů bylo v tomto jazyce. Vědecký program zahrnoval 5 plenárních přednášek (New targets in the treatment of cardiovascular diseases: from mice to men; Macromolecular anticancer therapeutics; Exploring the chemical diversity of European plants – A promising strategy for the discovery of bioactive molecules; Lead discovery out of the computer scope and limitations; Drug discovery in the post-genome era: recent examples in oncology and diabetes) a 4 hlavní přednášky (Positron emission tomography in drug research and development; Noninvasive peptide and protein delivery systems; The impact of dispensing to pharmacotherapy in the Czech Republic; The opium poppy *Papaver somniferum* as a target for genetic engineering), 60 přednášek a 320 plakátových sdělení, z nichž jedna třetina byla představena autorem v 5minutovém vystoupení. Konferenci předcházela letní škola „Medicinal chemistry“, jejíž vynikající kvalitu potvrdili naši doktorandi, kteří se jí účastnili.

Témata vědeckého programu pokryla celé spektrum zájmu farmacie. Společenský program s večeří na dunajském parníku a recepcí v historickém Reichssaalu byly příležitostí pro diskuzi o nové spolupráci v nových podmínkách EU. Představitelé všech tří odborných společností se shodují na užitečnosti tohoto setkání a dobrých perspektivách případné tradice. Prezidenty konference byly prof. dr. A. Buschauer a prof. dr. S. Elz z Farmaceutické fakulty Univerzity v Regensburgu, kteří spolu s rektorem univerzity zajistili organizační bezchybnost celé akce. Z konference existuje Sborník abstraktů pod číslem ISBN 3-00-014723-3.

L. Jahodář, P. Solich