

Možnosti prevence alkoholismu, test embryotoxicity disulfiramu

Diplomová práce

Modul preventivního lékařství

Vypracovala: Dagmara Špačková (roz. Švecová)

Školitel: prof. MUDr. Richard Jelínek, DrSc.

Úvod

Alkoholismus zůstává přes různá preventivní opatření významným celospolečenským problémem, se závažnými dopady zdravotními, sociálními i ekonomickými. Tato práce v první části ukazuje zejména negativní dopady nadměrného užívání alkoholu a rizikové faktory vzniku závislosti na alkoholu. Dále popisuje tři hlavní způsoby prevence alkoholismu s důrazem na terciární prevenci, tj. používání léčiv k odstranění již vzniklé závislosti.

Druhá část práce se věnuje průkazu možné embryotoxicity disulfiramu, jednoho z léčiv užívaných v terciární prevenci alkoholismu, neboť poznatky o jeho působení na vyvíjející se plod jsou dosud jen sporé. Testování embryotoxicity bylo provedeno metodou CHEST (Chick Embryotoxicity Screening Test), která je v této části práce podrobně popsána.

Děkuji za významnou pomoc při provedení a zhodnocení výsledků metody CHEST prof. MUDr. R. Jelínkovi, DrSc., I. Jelínkové, MUDr. Š. Jelínkovi a MUDr. M. Špačkovi.

I. ČÁST: ALKOHOLISMUS A MOŽNOSTI JEHO PREVENCE

Alkohol (etylalkohol, etanol) ve formě alkoholických nápojů byl vyráběn a používán již v dobách dávných civilizací, o čemž svědčí četné archeologické nálezy. Zpočátku byl využíván jako látka zvláštního významu při náboženských obřadech, později však stále častěji jako nápoj běžného užití. Z historie naší země existují doklady o tom, že již před několika staletími přinášela obliba piva a medoviny řadu závažných problémů, které bylo nutné mocensky řešit. První protialkoholní zákon byl vyhlášen roku 1039 Břetislavem I. a zavedl přísné tresty pro opilce i krčmáře, kteří jim nalévali.

Termín *alkoholismus*, označující nadměrnou konzumaci alkoholických nápojů, byl poprvé použit roku 1849 a je připisován švédskému lékaři Magnussu Hussovi. Teprve o sto let později však začal být alkoholismus oficiálně považován za medicínský problém (WHO, 1951) /1/.

Alkoholismus je chronické, často progresivní onemocnění, které může mít fatální následky. Typické je nadměrné požívání alkoholu až ztráta kontroly nad jeho příjmem. Zneužívání alkoholu pak pokračuje i přes vznik vážných zdravotních, osobních, pracovních či finančních problémů. Mezi hlavní rizikové faktory alkoholismu patří /2/:

- *věk*: lidé, kteří začnou pít v mládí (kolem 14. roku či dříve), mají vyšší riziko, že se z nich stanou alkoholici.
- *genetické faktory*: genetické vybavení může zapříčinit nevyváženost jednotlivých neuromediátorů a tím vzrůst rizika vzniku alkoholové závislosti.
- *pohlaví*: muži mají vyšší sklon k zneužívání alkoholu než ženy.
- *rodinná anamnéza*: vyšší riziko vzniku alkoholismu mají lidé, jejichž rodič či rodiče zneužívají alkohol. To bylo prokázáno i u adoptovaných dětí, jejichž biologičtí rodiče alkohol zneužívají, avšak adoptivní rodiče nikoli.
- *emoční potíže*: těžké deprese nebo úzkost často vedou k zneužívání alkoholu. Dospělí s poruchou pozornosti a s hyperaktivitou (ADHD syndrom) se častěji stávají závislými na alkoholu.

Hlavní příznaky, které vzbuzují podezření na zneužívání alkoholu, jsou shrnuty níže /2/. Při zneužívání alkoholu nemusejí být vyjádřeny všechny charakteristiky alkoholové závislosti.

- pití o samotě či tajně
- výpadky paměti – zapomíná, o čem konverzoval, zapomíná na své povinnosti
- rituální pití před jídlem, při něm či po něm, je-li toto pití vyčítáno a zpochybňováno, tak to u dotyčného vyvolává vztek
- ztráta zájmu o dřívější koníčky a zájmové aktivity
- cítí potřebu napít se
- podrážděnost, blíží-li se chvíle, kdy obvykle pije, anebo je-li zrovna alkohol nedostupný
- schovávání alkoholu na neobvyklých místech doma, v práci či v autě
- hltavé polykání doušek, dvojitě dávky, záměrné opíjení se za účelem cítit se dobře nebo cítit se „normálně“
- problémy se zákonem, problémy v rodinných vztazích, v zaměstnání, finanční problémy
- vytvoření si tolerance na alkohol, k dosažení stejného účinku je potřeba zvyšovat množství vypitého alkoholu
- zkušenost s abstinenčními příznaky – zvracení, pocení, třes

Z psychiatrického hlediska lze poruchy vyvolané nadměrným užíváním alkoholu rozdělit na poruchy způsobené přímým účinkem alkoholu na CNS, jako jsou akutní intoxikace (prostá ebrieta – opilost), patická ebrieta, alkoholový odvykací stav, psychotické poruchy a amnestický syndrom; a na poruchy způsobené návykovým chováním, jako je škodlivé užívání a závislost na alkoholu. *Škodlivé užívání* představuje vzorec užívání, který poškozuje zdraví. Poškození může být tělesné nebo duševní (např. deprese objevující se sekundárně při těžkém pití). Nemělo by se diagnostikovat, jestliže je přítomen syndrom závislosti, psychotická porucha nebo jiné závažnější specifické poruchy. *Závislost na alkoholu*, nebo-li syndrom závislosti, je skupina fyziologických, behaviorálních a kognitivních fenoménů, v nichž užívání alkoholu má u daného jedince mnohem větší přednost než jiné jednání, kterého si kdysi cenil více. Hlavní charakteristikou je silná touha po alkoholu. Návrat k užívání alkoholu po období abstinence často vede k rychlejšímu

znovuobjevení jiných rysů syndromu, než je tomu u jedinců, u nichž se závislost nevyskytuje.

Alkohol působí na receptory v centrální nervové soustavě. Dochází k útlumu dopaminergní, serotonergní a taurinergní aktivity, k potlačení inhibičního účinku kyseliny gamaaminomáselné (GABA) /3/. Zároveň dochází k zvýšení aktivity glutamátu, kalciových kanálů, zvýšení počtu NMDA-receptorů, hyperstimulaci cholinergního, noradrenergního a opioidového systému.

Z klinického hlediska se působení alkoholu na CNS projevuje sedativním účinkem. U některých lidí se zpočátku projeví stimulační účinky, ale při dalším pití převládá tlumící efekt. Útlumem kontrolních mozkových center dochází k uvolnění a redukci zábran. Zpočátku dojde k narušení pozornosti, emocí a úsudku. Alkohol ve vyšším množství narušuje artikulaci a svalovou koordinaci a navozuje spánek. V nadměrném množství je alkohol životu nebezpečný, neboť může způsobit útlum základních životních center v CNS s následnou kvantitativní poruchou vědomí.

Excesivní nadužívání alkoholu se projeví alkoholickou hepatitidou, pro niž je typické nechutenství, nevolnost, zvracení, bolest břicha, horečka a ikterus. Dlouhodobé pití potom vede k přechodu hepatitidy v cirhózu. Pro poškození gastrointestinálního traktu svědčí gastritida, porucha vstřebávání vitamínů skupiny B (převážně kyseliny listové a thiaminu) a pankreatitida. Mezi projevy postižení kardiovaskulárního systému patří hypertenze či kardiomyopatie, které mohou vést k srdečnímu selhání. Dále alkohol brání uvolňování glukózy z jater a následná hypoglykémie ohrožuje zvláště diabetiky na terapii inzulínem. Narušení sexuálních funkcí se manifestuje dysfunkční erekcí u mužů a menstruačními poruchami u žen. Chronický alkoholový abúzus bývá spojen s častějším vznikem rakoviny jícnu, hrtanu, jater a tlustého střeva. Mezi další komplikace spojené s alkoholismem či nadměrným pitím patří domácí zneužívání/týrání, snížený výkon v práci nebo ve škole, vyšší výskyt dopravních nehod se smrtelnými následky, vyšší výskyt sebevražd i vražd atd.

Zvláštní kapitolu tvoří embryotoxické účinky alkoholu /4, 5/. V roce 1973 byl

definován *fetální alkoholový syndrom* (FAS) způsobený chronickým abúzem alkoholu těhotnými ženami. Jeho incidence je 1–2 případy na 1000 novorozenců a zahrnuje charakteristický vzorec defektů, mezi které patří intrauterinní růstová retardace, psychomotorická dysfunkce, kraniofaciální malformace (mikrocefalie, hypoplazie maxilly, epikantus apod.), vrozené srdeční vady atd. FAS je považován za vůbec nejčastější příčinu mentální retardace. Vady s ním spojené nejsou zcela specifické a mnohdy nebývají vyjádřeny ve své úplnosti, takže diagnóza je často stanovena jen na základě informace o alkoholismu matky. I mírnější pití může způsobit poruchy chování a učení, někdy označované termínem „porucha nervového vývoje spojená s alkoholem“, ARND (Alcohol-related neurodevelopmental disorder), která se vyskytuje asi třikrát častěji než FAS.

Screening a diagnóza

Pro lékaře je často obtížné rozhodnout, koho začít vyšetřovat kvůli problému s alkoholem a jak vůbec rozpoznat příznaky alkoholismu. Některé symptomy jako ztráta paměti či pády mohou být spíše důsledky stárnutí než alkoholového abúzu. Pro alkoholiky je typické popírání problému s alkoholem, takže často si chodí stěžovat k lékaři jen na trávicí problémy, bolest, slabost apod., ale nikdy se nepřiznají k alkoholismu. Lékař, který má podezření, že jeho pacient má problém s alkoholem, by se ho měl cíleně vyptat na návyky v konzumování alkoholu, a pokud se mu potvrdí jeho podezření, měl by provést krátký screeningový test složený ze standardizovaných otázek /2/. Pro alkoholismus svědčí i některé laboratorní nálezy, jako např. makrocytární anémie. Alkoholické poškození jater se zase projeví vzestupem GMT i hodnot aminotransferáz s typickým poměrem AST:ALT > 1.

Možnosti prevence alkoholismu

Primární prevence

Jejím cílem je předcházet problémům s alkoholem u těch, kteří jej ještě nezačali zneužívat. Radíme sem různá preventivní opatření, jako je například

snížení dostupnosti alkoholu dospívajícím – zákon povolující nalévat alkohol jen osobám starším 18 let; předávání relevantních informací, aby se mladiství dozvěděli o alkoholu a problémech s jeho nadměrným užíváním spojených. Velmi diskutované je v dnešní době též omezení reklam ve sdělovacích prostředcích. Státní protialkoholová politika u nás bohužel selhává, narozdíl od politiky zaměřené na ilegální návykové látky. Průměrná spotřeba alkoholu na jednoho obyvatele v České Republice stále stoupá.

Sekundární prevence

Jejím cílem je poskytnout efektivní pomoc těm, kdo již začali alkohol zneužívat. Patří sem indikovaná prevence, nebo-li časná intervence. Je určena hlavně dětem a dospívajícím, kteří sice alkohol užívají, nelze však u nich ještě diagnostikovat škodlivé užívání nebo závislost na alkoholu. Mezi formy časné intervence patří opakovaná doporučení přestat pít alkohol, posilování motivace, svépomocné příručky, spolupráce s rodinou, sebemonitorování, linky důvěry, centra krizové intervence, zvládání cravingu (bažení), dlouhodobé sledování a následné kontroly /6/.

Terciární prevence

Tato forma prevence se překrývá s léčbou závislosti na alkoholu. Většina alkoholiků podstupuje léčbu velmi neochotně, neboť popírají, že mají nějaký problém. K léčbě je přimějí až zdravotní, sociální či právní problémy. Léčba je velmi individuální. Široká škála možností terapie alkoholismu, od vyhodnocení stavu závislosti, krátké intervence, přes ambulantní poradenství až po hospitalizaci, umožňuje pomoci alkoholikům zbavit se jejich závislosti.

Prvním krokem v léčbě je určit, zda je pacient na alkoholu skutečně závislý. V případě škodlivého užívání, kdy pacient ještě neztratil kontrolu nad příjmem alkoholu a je ještě schopen přerušit nebo snížit pití alkoholu, může být vysoce efektivní aplikace strategie označované jako krátká intervence. Jejím smyslem je upozornit pacienta na zdravotní rizika škodlivého užívání. Krátká intervence (5 – 30minut) byla vypracována zejména pro praktické lékaře a další pracovníky primární lékařské péče. Cílem této intervence je, aby pacient

škodlivé pití omezil, popřípadě se pokusil abstinovat alespoň do dosažení stabilizace zdravotního stavu. Pokud však pacient již neovládá spotřebu alkoholu, což je typické pro syndrom závislosti, pak je nutné zahájit úplnou abstinenci jako nezbytnou součást další léčby, neboť pouhé redukování pití nestačí a není efektivní. Časnou intervencí v případě závislosti na alkoholu, kterou provádí většinou již specialista, je hlavně psychologická intervence s cílem motivovat pacienta k brzkému zahájení odvykací léčby.

Odvykací léčba se skládá z několika kroků. Měla by být zahájena detoxifikačním programem, jenž obvykle trvá první čtyři až sedm dní. Léčba spočívá v korekci poruch elektrolytové rovnováhy, dostatečné hydrataci a farmakoterapii, při které se provádí substituční léčba na principu zkřížené tolerance užívaných farmak s alkoholem. Nejčastěji se používají benzodiazepiny (chlordiazepoxid, oxazepam, lorazepam). Při hrozícím deliriu tremens je možno s výhodou použít neuroleptikum tiaprid. Pokud je delirium komplikováno křečemi, doporučuje se podávat $MgSO_4$, případně karbamazepin. Vzhledem k výrazné vitaminové depleci je též vhodné podávání multivitaminových preparátů, zejména pak thiaminu a kyseliny listové.

Po detoxifikaci následuje farmakoterapie zaměřená na senzitivizaci a terapii tzv. cravingu (bažení, touze po alkoholu). United State Food and Drug Administration doporučuje v dnešní době tři schválená léčiva – disulfiram, naltrexon a akamprosát [7, 8].

Senzitivizace je empiricky podložená farmakoterapie, spočívající v podávání preparátů zvyšujících vnímavost organismu vůči účinkům alkoholu. Disulfiram (Antabus) a jeho metabolické deriváty dithiokarbamáty jsou díky své afinitě k sulfohydrylovým skupinám a schopnosti slučovat se s kovy vysoce reaktivní chemické látky. Disulfiram je účinný inhibitor mnoha enzymů jako jsou např.: aldehyd dehydrogenáza, cytochrom P450, glutathion S-transferáza, 5-lipoxygenáza, dopamin-beta-hydroxyláza, RNA-dependentní DNA polymeráza, 1,4,5-trifosfát 5-fosfatáza a kaspázy. Disulfiram je používán k léčbě alkoholové závislosti již přes 40 let. Hlavním mechanismem účinku je jeho schopnost

inhibovat jaterní aldehyd dehydrogenázu. Pokud je podáván samotný, je relativně netoxickou substancí, ale jakmile dojde ke kombinaci s alkoholem, dochází k nepříjemné reakci, na níž je založeno jeho terapeutické využití. Tato reakce zvaná DER (disulfiram-ethanol-reaction), kdy dojde k zablokování odbourávání acetaldehydu vznikajícího oxidací ethanolu, má za následek hromadění acetaldehydu. To vede k rozvoji nepříjemných subjektivních a objektivních příznaků – zrudnutí kůže, nauzea, zvracení, rozmazané vidění, zmatenost, bolest na hrudi, závratě či mdloby, nadměrné pocení, pulsující bolest hlavy, tachykardie, slabost, které brání požívání alkoholu během odvykací léčby disulfiramem /9/. Příslušné příznaky se rozvíjejí během 15 minut po požití alkoholu a mohou přetrvávat až několik hodin /10/.

Ačkoliv se potvrdilo, že disulfiram snižuje četnost dnů, kdy se pacient nepije, bylo současně prokázáno, že výskyt relapsů je srovnatelný s použitím placeba. Kontraindikován je u pacientů, kteří nepřestali pít alkohol, u pacientů užívajících metronidazol, u pacientů s psychózou, s kardiovaskulárním onemocněním. Není doporučován při těžkém plicním onemocnění, chronického renálního selhání, u diabetiků, u pacientů nad 60 let, u pacientů s periferní neuropatií, s jaterní cirhózou a portální hypertenzí. Hepatotoxičita je vzácná, ale potenciálně může být fatální. Proto někteří odborníci doporučují pravidelně provádět jaterní testy. Pro tato četná omezení není disulfiram doporučován obzvláště v primární péči /11/.

Dalším způsobem odvykání je, kromě výše popsané senzitivace, léčba cravingu. Prokazatelný efekt při snaze farmakologicky potlačit craving byl dosažen dvěma různými typy látek – naltrexonem a akamprosatem.

Naltrexon působí jako antagonist opioidních receptorů. Snižuje tak účinky alkoholu a zároveň snižuje craving. Redukuje krátkodobé relapsy v kombinaci se současnou psychosociální terapií. Kontraindikován je u pacientů dlouhodobě léčených opioidy pro chronickou bolest či závislých na heroinu, protože může přivodit těžký abstinenci syndrom. Ve vysokých dávkách, které však nejsou užívány při léčbě alkoholové závislosti, je naltrexon hepatotoxický.

Je tedy kontraindikován u pacientů s hepatitidou či s jiným postižením jater. U ostatních pacientů by při jeho užívání měly být pravidelně kontrolovány jaterní enzymy. Všeobecně je naltrexon dobře tolerován. Občas se vyskytují nežádoucí účinky, jako jsou nevolnost, bolesti hlavy, úzkost a sedace.

U akamprosatu se předpokládá, že blokuje glutaminergní N-methyl-D-aspartátové receptory a aktivuje GABA receptory. Bylo prokázáno, že snižuje krátkodobé i dlouhodobé relapsy, je-li kombinován s psychosociální terapií. Je dobře tolerován díky nízkému výskytu nežádoucích účinků, z nichž nejčastější bývá přechodný průjem. Nevyvolává žádné interakce při současném pití alkoholu či užívání léků jako jsou diazepam nebo imipramin, takže pacient může pokračovat v terapii akamprosatem i v průběhu relapsu. Kontraindikován je při renální insuficienci a pokročilé jaterní cirhóze. Opatrně však může být užíván pacienty s lehčí jaterní dysfunkcí.

Další léky, které jsou zatím ve stádiu testování, jsou například SSRI (Serotonin Selective Reuptake Inhibitor – např. fluoxetin) anebo antikonvulziva (topiramát, ondansetron).

Alternativní formy léčby, např. v zahraničí někdy aplikovaná akupunktura a fyzikální léčba, jsou u nás využívány minimálně.

Mezi nové postupy v léčbě patří např. svépomocné skupiny, psychosociální terapie, motivaci posilující terapie, kognitivně behaviorální terapie a další. Svépomocné skupiny jsou současně nejvíce vyhledávané zdroje pomoci při problémech s alkoholem. Anonymní alkoholici, jedna z nejnámějších svépomocných skupin, navrhla dvanáctibodový program, který by alkoholici měli splnit během odvykacího procesu. Pacienti mohou vyhledat pomoc u Anonymních alkoholiků ještě předtím, než vyhledají odbornou lékařskou pomoc, anebo se zapojí mezi Anonymní alkoholiky po odvykací léčbě. Členové Anonymních alkoholiků si navzájem pomáhají udržet motivaci a podporují se v rozhodnutí abstinovat. Ačkoliv se zdá, že Anonymní alkoholici přinášejí pozitivní výsledky, je jim jen vzácně věnována pozornost v randomizovaných klinických studiích /11,12/.

II. ČÁST: TEST EMBRYOTOXICITY DISULFIRAMU

Embryotoxické účinky alkoholu byly již dobře prokázány (viz výše), avšak o vlivu disulfiram na intrauterinní vývoj člověka dosud není dostatek informací. V literatuře se objevilo několik kazuistik a prací poukazujících na možný teratogenní účinek disulfiram /13-15/. Jiné studie se naopak přiklonily k názoru, že disulfiram je teratogenní pouze pokud těhotné ženy současně užívaly alkohol a že sám o sobě není lidským teratogenem /16/. K této diskusi jsme se rozhodli přispět a otestovali jsme proto embryotoxicitu disulfiram na kuřecích zárodcích metodou CHEST (Chick Embryotoxicity Screening Test). *Naší pracovní hypotézou bylo, že disulfiram sám o sobě nemá teratogenní účinek.*

Průkaz teratogenních účinků chemických látek u člověka je velmi obtížný, neboť výsledný efekt je závislý na celé řadě faktorů, jako je chemická struktura sloučeniny, délka jejího působení, způsob podání, distribuce k cílovým tkáním, metabolická transformace i rychlost exkrece. Kromě toho jen výjimečně je vyvíjející se organismus vystaven vysokým dávkám jediné sloučeniny, obvykle se jedná o spolupůsobení více látek. Navíc z pochopitelných důvodů je testování léčiv na těhotných ženách zcela nepřipustné. Proto byla v teratologii vyvinuta celá řada metod, umožňujících alternativní testování. My jsme na Oddělení histologie a embryologie 3. LF zvolili metodu CHEST, neboť se jedná o metodu zde dobře zavedenou. Rozpracoval ji prof. Jelínek se svými spolupracovníky /17, 18, 19/. Je to metoda jednoduchá, rychlá a nenáročná na laboratorní vybavení. Hlavní výhodou je, že celý vývoj kuřecího embrya probíhá *in ovo*, a proto s metabolismem testované látky nijak neinterferuje mateřský organismus, jak je tomu u častěji používaných laboratorních savců. Navíc je možný přísný výběr experimentálního materiálu, přesná aplikace testované látky a k hodnocení výsledků se užívá kvantitativního parametru.

Metoda

V první fázi metody (CHEST I), sloužící k určení pásma embryotoxicity, byla oplodněná slepičí vejce (White Leghorn) inkubována v horizontální poloze při 37,5°C a relativní vlhkosti 40-60% po 40 hodin (36-42). Těsně před aplikací disulfiramu byly skořápky otevřeny standardní okénkovou metodou, umožňující u embryí zkontrolovat vývojové stadium a normalitu vývoje. Použity byly pouze zárodky morfologicky normální a ve vývojových stádiích HH 10 – 11 (vývojová stádia dle Hamburgera a Hamiltona, viz tab. 1), zbylá embrya byla z testu vyřazena.

Stadium	Stáří plodu [hod]	Počet somitů	Popis
9	29 – 33	7	Přítomny primární optické váčky. Párové základy srdce začínají splývat
10	33 – 38	10	První somit mizí (a nepočítá se do počtu somitů v následujících stádiích). První náznak hlavového ohnutí. Jsou jasně viditelné tři mozkové váčky. Optické váčky nejsou při bázi zaškrčené. Srdce je lehce nakloněno doprava.
11	40 – 45	13	Lehká kraniální flexura. Je zřetelných pět neuromer na zadním mozku. Přední neuroporus se uzavírá. Optické váčky se při bázi zaškrcejí. Srdce se sklání vpravo.
12	45 – 49	16	Hlava se stáčí vlevo. Přední neuroporus uzavřen. Naznačen telencephalon. Jsou dobře vyvinuté primární optické váčky a oční stopka. Sluchová jamka je hluboká a široce otevřená. Srdce má lehce esovitý tvar. Hlavový záhyb amnia překrývá celou oblast předního mozku.

Tabulka 1: Stádia vývoje kuřecího embrya dle Hamburgera a Hamiltona /20/

Geometricky se snižující dávky disulfiramu v ředění od 1:10² do 1:10⁶ v 0,5% roztoku CMC (tj. 10 μ g/10 μ l, 3 μ g/3 μ l, 0,3 μ g/3 μ l, 0,03 μ g/3 μ l, 0,003 μ g/3 μ l) jsme skleněnou mikropipetou pod mikroskopickou kontrolou aplikovali subgerminálně do blízkosti kaudálního morfogenetického centra. Pracující za

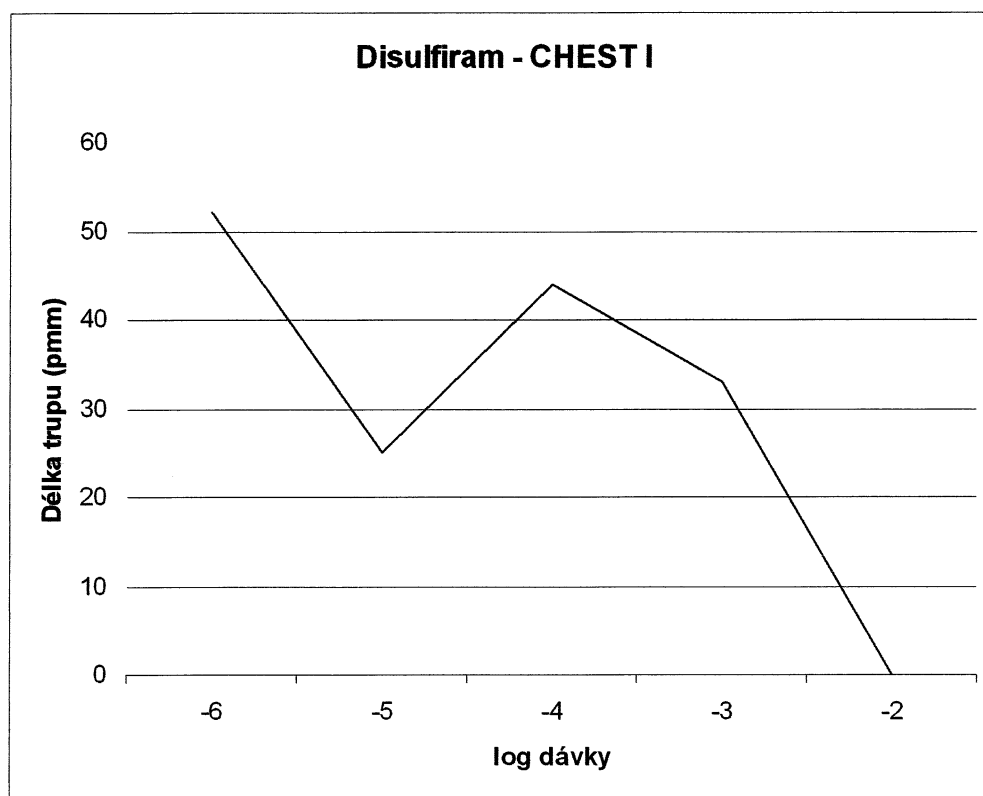
semisterilních podmínek jsme danou koncentrací injikovali vždy šest vajíček, která jsme poté uzavřeli sklíčky, utěsnili parafínovým rámečkem a vrátili zpět do inkubátoru. Po dalších 24 hodinách byla vejce znovu otevřena a okulárním mikrometrem změřena vzdálenost mezi *aa. vitallinae* a koncem ocasu, která odpovídá nově vytvořené části trupu jako funkci kaudálního morfogenetického centra. Nevyvinutí *a. vitellina* jsme hodnotili nulou. Pro každou koncentraci jsme získali šest hodnot a z nich vypočítané mediány jsme zanesli do grafu, ve kterém je na abscise označená koncentrace a na ordinátě délka trupu (graf 1). Začátek pásma embryotoxicity se odhadne jako interval mezi poslední neefektivní dávkou a první účinnou dávkou, která je následována dalším trvalým sestupem v grafu.

Druhá fáze CHEST II slouží k verifikaci předchozího odhadu na pokročilejších stádiích vývoje a k určení období nejcitlivějšího na danou látku ve vztahu ke koncentraci dané látky. Stejně tak je možné v této fázi hodnotit četnost jednotlivých typů malformací. Použili jsme pouze příslušná ředění od odhadnutého začátku rozsahu embryotoxicity, která jsme aplikovali v inkubačním dni 2, 3 a 4 (každou koncentraci v každém dni u deseti vajcí) a hodnotili typ a závažnost embryotoxicity. U dvoudenních zárodků jsme disulfiram injikovali opět subgerminálně, u vyšších stádií potom intraamniálně. Všechna vejce jsme nechali od aplikace dále inkubovat až do devátého dne. Během této doby jsme prováděli každodenní kontroly, při kterých jsme vyřazovali mrtvé plody a příčinu jejich úmrtí jsme zaznamenávali. Po devíti dnech inkubace jsme každý plod zvážili a standardním způsobem prohlédli. Po prohlédnutí zevní morfologie jsme provedli pod kontrolou preparačního mikroskopu pitvu srdce, při níž se ozřejmila i případná malá komunikace mezi pravou a levou síní. Všechny objevené vady a úmrtí plodu jsme zaznamenali.

Výsledky

Podle výše uvedeného hodnocení jsme v první části experimentu CHEST I odhadli, že pásmo embryotoxicity disulfiramu začíná v intervalu koncentrace

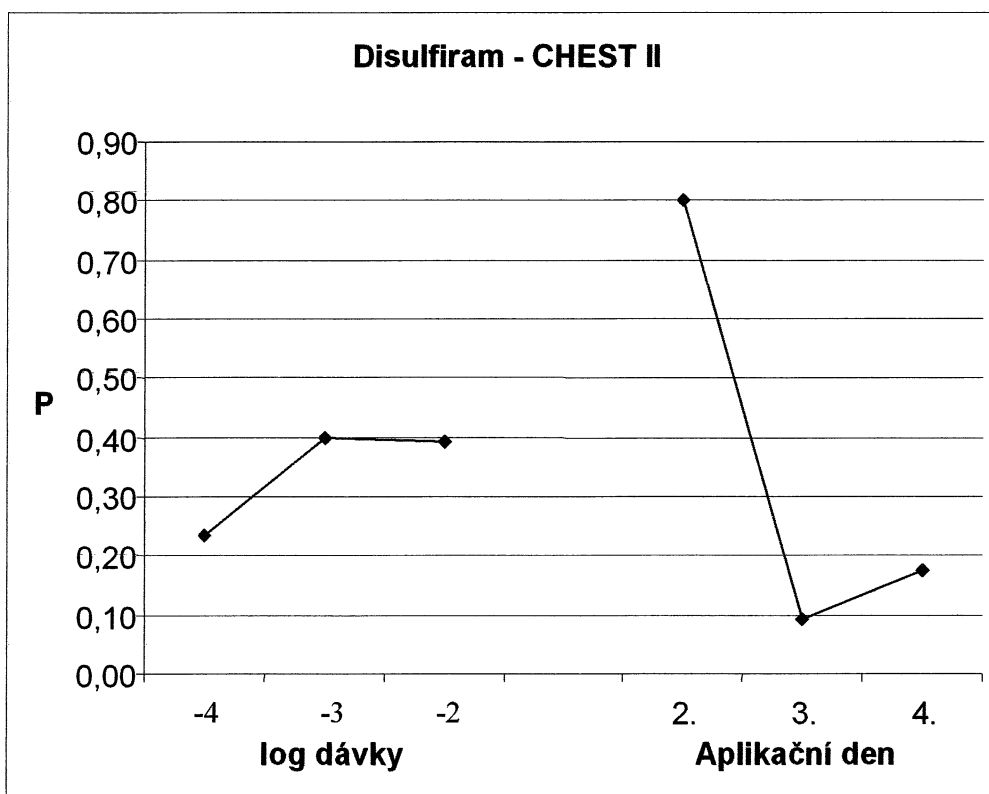
10^{-4} a 10^{-3} , tj. při ředění 1:10 000 a 1:1000 (viz graf 1).



Graf 1: CHEST I – odhad pásma embryotoxicity.

Zaneseny jsou mediány spočítané z jednotlivých naměřených délek nově tvořených částí trupu (pmm) v závislosti na aplikované dávce disulfiramu. Odhadnuté pásmo embryotoxicity disulfiramu začíná v intervalu koncentrace 10^{-4} a 10^{-3} , tedy mezi poslední neefektivní dávkou a první účinnou dávkou, která je následována dalším trvalým sestupem v grafu.

Výsledky CHEST II (graf 2) získané aplikací dávek disulfiramu v odhadnutém pásmu embryotoxicity ve dnech 2, 3 a 4 ukazují, že pravděpodobnost poškození nevzrůstá statisticky významně s rostoucí dávkou disulfiramu. Naopak lze pozorovat významnou závislost na dni aplikace disulfiramu, s 80% pravděpodobností poškození při aplikaci ve druhém dni inkubace. V pozdějších stádiích se již nezávisle na podané dávce tato pravděpodobnost dostala pod 30% hranici, což se považuje za výsledek, který není dán vlivem testované látky.



Graf 2: CHEST II – embryotoxický efekt disulfiramu

Zobrazeno je poměrné zastoupení mrtvých a malformovaných plodů v závislosti na dávce (vlevo modře) a v závislosti na termínu aplikace disulfiramu (vpravo červeně), **P** – pravděpodobnost poškození

Disulfiram způsoboval nejčastěji rumpless syndrom, který se vyskytoval u 18% živých plodů (přehled všech vad podává tab. 2). Jedná se o sakrální agenezi plodu, v podstatě jde o frustní formu syndromu kaudální regrese. Z malformací srdce se nejčastěji vyskytoval defekt septa síní přítomný u 12% všech živých plodů. Z ostatních vad byla častěji zastoupena mikrooftalmie 7% a myeloschíza 6%. Celkem 14% živých plodů bylo postiženo víc než jednou vrozenou vadou.

dávka (log)	N	D	M	P	srdce	trup	oko	mozek
a. Aplikace provedena 2. den								
-2	10	3	6	0,90	2	6	3	1
-3	10	1	8	0,90	4	4	2	3
-4	10	2	4	0,60	2	2	1	1
				P_{sys}	0,33	0,50	0,25	0,21
b. Aplikace provedena 3. den								
-2	10	0	0	0,00	0	0	0	0
-3	10	0	1	0,10	0	1	0	0
-4	10	1	0	0,10	0	0	0	0
				P_{sys}		0,03		
c. Aplikace provedena 4. den								
-2	10	0	2	0,20				
-3	10	0	2	0,20	1	1	0	0
-4	10	0	1	0,10	1	0	0	0
				P_{sys}	0,08	0,07		
				P_{celk}	0,12	0,18	0,07	0,06

Tabulka 2: CHEST II – embryotoxický efekt disulfiramu, spektrum malformací
Zaznamenány jsou druhy vad rozdělené podle dne aplikace disulfiramu.

N – celkový počet aplikovaných plodů, **D** – počet mrtvých plodů, **M** – počet malformovaných plodů, **P** – pravděpodobnost malformovaných nebo mrtvých plodů, **P_{sys}** – pravděpodobnost postižení jednotlivých orgánových systémů u živých plodů v rámci jedné koncentrace, **P_{celk}** – pravděpodobnost postižení jednotlivých orgánových systémů u všech živých plodů, **srdce** – postižení kardiovaskulárního systému, **trup** – postižení trupu, **oko** – postižení oka, **mozek** – postižení centrálního nervového systému.

Diskuse

Výsledek CHEST I ukázal, že pásmo embryotoxicity u kuřecích zárodků začíná při koncentraci 10^{-4} až 10^{-3} . Z dat popisujících distribuci látek v mateřském a fetálním kompartmentu u savců lze odhadnout, že savčí embryo bude postiženo při dávce získané z CHEST I násobené 10^{-2} /19/. To by v našem případě znamenalo dávku od 1 do 10 mg/kg mateřské váhy. Běžné dávkování disulfiramu je 400 mg/den, tj. přibližně 5,7 mg/kg. Z toho vyplývá, že používaná terapeutická dávka disulfiramu je v pásmu embryotoxicity zjištěném

metodou CHEST I, a proto je možné předpokládat, že podávání disulfiramu ženám v časných fázích těhotenství bude mít teratogenní účinek na vyvíjející se zárodek. CHEST II v této studii prokázal hluboký teratogenní efekt disulfiramu na 2 denní kuřecí embrya, navíc pravděpodobnost poškození v tomto stádiu stoupala s aplikovanou dávkou. Teratogenní efekt disulfiramu na kuřecí zárodky staré 3 a 4 dny nebyl prokázán, a to nezávisle na podané dávce. Z toho lze usuzovat, že ani kuřecí metabolity disulfiramu nemají embryotoxický vliv, neboť jejich vznik by se zřetelně projevil na vzestupu množství postižených plodů aplikovaných od dne 3. Podle výsledků testu CHEST jsme částečně zamítli naši pracovní hypotézu, tedy že disulfiram sám o sobě nemá teratogenní účinek, neboť se ukázalo, že významný teratogenní efekt disulfiramu je možné předpokládat v časných stádiích organogeneze. Na druhou stranu lze soudit, že disulfiram podávaný v terapeutických dávkách v pozdějších stádiích prenatalního vývoje nemá negativní vliv na vyvíjející se plod. Vzhledem k obecně nejisté exploraci dat získaných na jiných živočišných druzích na člověka je pochopitelně je nutné tento výsledek interpretovat opatrně. Nicméně lze na základě provedeného screeningového embryotoxického testu doporučit velmi důkladné zvážení před podáním disulfiramu u žen ve fertilním období, a pokusit se primárně o jiné možnosti terciární prevence alkoholismu. Vzhledem k relativně častému relapsu alkoholismu při léčbě disulfiramem by bylo vhodné rozšířit testování také o současnou aplikaci alkoholu a porovnat teratogenní efekt samotného disulfiramu, alkoholu a kombinace alkoholu s disulfiramem.

Souhrn

Tato práce se věnuje problematice alkoholismu. V první části jsou shrnuty rizikové faktory vzniku alkoholismu, hlavní symptomy zneužívání alkoholu a základní psychiatrické jednotky s užíváním alkoholu spojené. Dále se popisuje účinek alkoholu na molekulární úrovni i jeho negativní vliv na jednotlivé orgánové systémy, včetně jeho embryotoxických účinků. Po možnostech diagnostiky problémů s alkoholem spojených je uveden přehled možností v prevenci alkoholismu, s důrazem na terciární prevenci, která zahrnuje i podávání disulfiramu. Vlastní přínos práce spočívá ve druhé části, která popisuje otestování embryotoxicity disulfiramu metodou CHEST (chick embryotoxicity screening test). Výsledky testu ukázaly, že disulfiram má významný teratogenní účinek na kuřecí embrya při jeho aplikaci ve druhém inkubačním dni. Naopak teratogenní efekt disulfiramu na kuřecí zárodky staré 3 a 4 dny nebyl prokázán, a to nezávisle na podané dávce. Opatrná interpretace získaných dat je třeba při jejich aplikaci na člověka, nicméně je možné předpokládat teratogenní efekt disulfiramu v časných stádiích organogeneze, a proto lze u žen ve fertilním věku doporučit upřednostňování jiných metod preventivního působení.

Summary

The present thesis deal with problems related to alcohol. Risk factors, main symptoms of alcohol abuse, and respective psychiatric disorders are reviewed. Furthermore, the impacts of alcohol on the molecular level and on the organ systems as well as its embryotoxicity are described. Methods for screening, diagnosis, and prevention strategies are provided, including disulfiram administration. Using the CHEST method (Chick Embryotoxicity Screening Test) disulfiram embryotoxicity was studied. Results showed profound teratogenic effect of disulfiram on chick embryos incubated for 2 days. On the opposite, disulfiram manifested no apparent teratogenic potential when administered on 3 and 4 day old chick embryos. Results should be interpreted with caution when adapted to human, nevertheless teratogenic effect produced by administration of disulfiram in early organogenesis could be predicted. Therefore alternative preventive methods should be preferred in fertile women.

Literatura

1. Raboch J, Zvolský P et al. Psychiatrie, Galén 2001.
2. Mayo Foundation for Medical Education and Research, Alcoholism, 2004; dostupné na <<http://www.mayoclinic.com/health/alcoholism/DS00340>>
3. Marlene OB, Marinkovic K, Alcoholism and the Brain: An Overview. Alcohol Research and Health, 2003; 27(2):125-133.
4. Novotná B, Mošnová V, Vybrané kapitoly z teratologie, 3.LF UK, Praha 1994.
5. National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA), No.50, December 2000; dostupné na <<http://www.niaaa.nih.gov>>
6. Provazník K et al. Manuál prevence v lékařské praxi VI. díl, SZÚ Praha 1998; 120-127.
7. Steven HW, Medications for Treating Alcohol Dependence. American Family Physician, 2005; 72(9), dostupné na <<http://www.aafp.org>>
8. Pharmacotherapy for Alcohol Dependence. Summary, Evidence Report/Technology Assessment: Number 3, January 1999. Agency for Health Care Policy and Research, Rockville, MD, dostupné na <<http://www.ahrq.gov/clinic/epcsums/alcosumm.htm>>
9. MedlinePlus Drug Information Disulfiram, dostupné na <<http://www.medlineplus.gov>>
10. Suchopár J (ed.), Remedia Compendium, Panax 1997, 211-212.
11. National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA), New Advances in Alcoholism Treatment, Alcohol Alert, NIH Pub No.49, October 2000.
12. National Association of State Alcohol and Drug Abuse Directors, Current Alcohol Research in the Use of Medications as an Adjunct to Alcohol Treatment and Implications for State Alcohol Treatment Systems. Dec, 2001, dostupné na <<http://www.nasadad.org>>
13. Gardner RJ, Clarkson JE. A malformed child whose previously alcoholic mother had taken disulfiram. N Z Med J. 1981 Mar 25;93(680):184-6.
14. Helmbrecht GD, Hoskins IA. First trimester disulfiram exposure: report of two cases. Am J Perinatol. 1993 Jan;10(1):5-7.
15. Reitnauer PJ, Callanan NP, Farber RA, Aylsworth AS. Prenatal exposure to disulfiram implicated in the cause of malformations in discordant monozygotic twins. Teratology. 1997;56:358-362.
16. Jones KL, Chambers CC, Johnson KA, The effect of disulfiram on the unborn baby. Teratology 1991 May;43(5):438.
17. Jelínek R, Rychter Z and Peterka M, Embryotoxicity assay on morphogenetic systems. In *Evaluation of Embryotoxicity, Mutagenicity and Carcinogenicity Risks in New Drugs* (ed. Benešová O, Rychter Z and Jelínek R), Prague: Univerzita Karlova, 1979;195-225.
18. Jelínek R and Peterka M, Morphogenetic systems and *in vitro* techniques in teratology. In *Culture Techniques: Applicability for Studies on Prenatal Differentiation and Toxicity* (ed. Neubert D and Merker HJ), Berlin, Walter de Gruyter, 1981;553-557.
19. Jelínek R., The chick embryotoxicity screening test (CHEST). In *Methods in Prenatal Toxicology* (ed. Neubert D, Merker HJ and Kwasigroch TE), Stuttgart: G. Thieme, 1977;381-386.
20. Hamburger V and Hamilton HL, A Series of Normal Stages in the Development of the Chick Embryo. Journal of Morphology, 1951; 88(1):49-92.