

# **Vliv léčby DM na vývoj plodu**

**Diabetes treatment and its effect on  
development of fetus**

Diplomová práce  
Vypracovala: Vlasta Ritschelová  
Školitel: prof. MUDr. Richard Jelínek, DrSc.  
2006

## Úvod

Zavádění nových léčiv do lékařské praxe je v dnešní době jevem běžným a žádoucím. Nová léčiva nabízejí nové léčebné možnosti, nahrazují stará, méně bezpečná jak pro pacientku tak pro vyvíjející se plod, nahrazují metody nefarmakologické či je vhodně doplňují. Zavedení takového nového léčiva však předchází rozsáhlé testování léku s ohledem na možnost výskytu různých nežádoucích účinků. Ty mohou být od zcela nevýznamných až po velmi závažné. Tato práce je zaměřena především na závažný vedlejší účinek tj. účinek embryotoxický. Znamená to, že léčivo v dávkách pro matku netoxických nějakým mechanismem zasahuje do procesu vývoje plodu a ten je vlivem látky usmrcen nebo poškozen.

Tato práce se věnuje průkazu možné embryotoxicity lispro-insulinu, jednoho z používaných léčiv pro terapii diabetes mellitus I. typu, 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. E. Maňákové, MUDr. M.Špačkovi a MUDr. L. Hubičkové-Heringové.

## Literární rešerše

Těhotenství diabetických matek je ve srovnání s normální populací výrazně rizikové. Procento pacientek s diabetes mellitus 1. a 2. typu tvoří v populaci těhotných asi 1,5- 2,0 % /5/. Vrozené vady se vyskytují 2 až 3× častěji než je tomu v normální populaci a zhruba v 18 % končí těhotenství potratem /6/. Tyto vady zahrnují syndrom kaudální regrese, malformace nervové trubice a kardiovaskulární soustavy. Za rozhodující pro teratogenezi se považuje řada etiologických faktorů spojených s metabolickými odchylkami vyvolanými hyperglykemií. Avšak na vývoj zárodku má negativní vliv i vysoká hladina insulinu. Kritickou fází pro vznik malformací představuje časné období těhotenství. Z tohoto hlediska je třeba posunout prevenci vývojových vad do období ještě před graviditou.

Perinatální mortalita dětí matek s diabetem je dnes v zemích s dobře organizovanou diabetologickou péčí zcela srovnatelná s perinatální mortalitou ve zdravé populaci, avšak perinatální morbidita těchto dětí zůstává stále vyšší než u populace bez diabetu.

Pod pojem diabetes mellitus je zahrnována skupina etiologicky zcela odlišných onemocnění, pro které je typické zvýšení glykémie a porucha glukózové tolerance. Může se jednat o autoimunní onemocnění (diabetes I. typu, LADA- *latent autoimmune diabetes in adults*) s absolutním nedostatkem insulinu, o genetický defekt mající vliv na diferenciaci  $\beta$ - buněk a sekreci insulinu (MODY- *maturity onset diabetes of the young*), či v případě diabetu II. typu (NIDDM- *non-insulin dependent diabetes mellitus*) o zcela odlišný stav s hyperinsulinémií a periferní rezistencí na insulin. Gestační diabetes pak představuje heterogenní skupinu, zahrnující předchozí typy vzniklé nebo diagnostikované během těhotenství, doplněné o poruchu vzniklou v souvislosti s hormonální dysbalancí následkem těhotenství. Ve všech případech hraje nezastupitelnou úlohu v možné patogenezi i genetická predispozice, která však hraje jinou roli v případě diabetu I. typu (ovlivnění imunity) než u ostatních typů.

Mechanismus diabetické embryopatie není stále vysvětlen. Faktorů, které se mohou podílet na vzniku vrozených vývojových vad, je celá řada. Můžeme mezi ně počítat hyperglykémii, změnu lipidového spektra, pokročilé produkty glykace, poruchy metabolismu prostaglandinů, účinek na stavbu a funkci membrán, tvorbu volných kyslíkových radikálů či poškození funkce mitochondrií, vyloučit však nelze ani hypoglykémii, která je teratogenní u

zvířat, či medikaci, tedy insulin a perorální antidiabetika. U diabetických matek se také popisují známky patologických změn placenty – nezralé klky, hypertrofie kapilár a ztlustění bazální membrány trofoblastu, což rovněž negativně ovlivňuje vývoj a růst plodu. Za nejpravděpodobnější embryotoxický faktor se v současnosti všeobecně považuje *nedostatečná metabolická kontrola*, tedy hyperglykémie a její následky v organismu matky.

Incidence kongenitálních malformací u novorozenců diabetických matek je 6- 9 %, což je dvakrát až třikrát více než v běžné populaci /6/. Vyskytnout se mohou všechny kongenitální malformace stejně jako v populaci bez diabetu. Avšak Kučera /4/ při srovnání výskytu malformací u diabetiček s nediabetickou populací zjistil 6 až 200násobný výskyt 10 typů malformací, které považuje za typické pro diabetes. Jedná se o následující:

**Syndrom kaudální regrese**, absolutní riziko jinak vzácné malformace, je u diabetiček odhadováno na 1,3 na 1000 narozených, což je 211 násobně více než v nediabetické populaci. Jedná se o inkompletní vývoj sakrální oblasti s poruchou vývoje lumbálních a sakrálních obratlů. Chybí koncová část těla, což vede k oploštění gluteální oblasti. Vada, je-li většího rozsahu, zahrnuje i poruchu vývoje míchy s neurologickým poškozením různého rozsahu, sníženou pohyblivostí dolních končetin. Za nejtěžší formu syndromu kaudální regrese je možno považovat sirenomyelii (splynutí dolních končetin). Kritickým obdobím pro vznik této malformace je 3. gestační týden.

**Defekty uzavírání neurální trubice** (anencephalie, holoprosencephalie, meningomyelocele). Neurální trubice se normálně uzavírá do 28. dne. Riziko této malformace odhaduje Kučera /4/ 4,6 na 1000 narozených. Kritickým obdobím pro vznik těchto defektů je 4. týden po koncepci.

**Situs inversus**, pro tuto malformaci je kritickým obdobím 3. týden.

**Poruchy vývoje močového systému**: např. hydronefrosa, ureter duplex. Pro tuto vadu je kritickým obdobím 5. týden po koncepci.

**Srdeční vady**: s diabetem jsou spojeny malformace srdce vzniklé v časném embryonálním vývoji, kompletní porucha vývoje komorového septa a kardiomyopatie. Nápadné ztlustění svaloviny interventrikulárního septa popsala studie Jaeggiho a spolupracovníků /8/ během 2. a 3. trimestru i u dobře kontrolovaného a nekomplikovaného diabetu, stupeň hypertrofie byl většinou mírný bez vlivu na diastolické i systolické funkce srdce. Toto ztlustění však může být následkem diabetické fetopatie.

Experimentální práce studující příčiny vedoucí ke vzniku těchto malformací vycházely z premisy, že vyvolávajícím faktorem je:

➤ **vysoká hladina glukosy**

Malformace skeletu mohou být vyvolány zvýšenou koncentrací glukózy v séru, neboť změna hladiny glukózy (o 50 % nižší nebo o 100 % vyšší) vede k inhibici syntézy m-RNA osových proteinů pro chondroitinsulfát v chondrocytech a změnám v glykosylaci kolagenu. Přítomnost cukerných zbytků na molekulách kolagenu inhibuje tvorbu příčných můstků a následně tvorbu fibril /6/. Kolagen s poškozenými příčnými vazbami je tak více náchylný k degradaci.

➤ **oxidativní stres**

Dalším z faktorů je oxidativní stres, vedoucí ke zvýšené peroxidaci lipidů a zvýšené glykaci proteinů. Kromě možné indukce malformací je považován i za příčinu spontánních potratů a to buď samostatně nebo v kombinaci deplece inositolu. Oxidativní stres dále způsobuje pokles hladiny prostaglandinů, což má negativní vliv na funkci membrán, a tím i na vývoj embrya, a redukuje obsah antioxidantů (vitaminy C a E) v embryonálních tkáních /6/.

➤ **insulin**

Samotný insulin má za fyziologických podmínek stimulační účinky na růst a vývoj, a to přes receptor IGF. Avšak ve vysokých koncentracích má inhibiční účinek. Insulínem experimentálně vyvolané malformace u kuřecích zárodků jsou morfogeneticky totožné se syndromem kaudální regrese /10/. Insulín sám sice neprochází přes placentární bariéru, ale vázaný na protilátky byl prokázán v pupečnickové krvi /9/. Hyperinsulinémie samotná již v prediabetickém stadiu je považována za silně rizikovou pro vznik defektů neurální trubice /6/.

Diabetes mellitus je v těhotenství považován za významný rizikový faktor. Ovlivňuje negativně vývoj zárodku od samého počátku těhotenství až k porodu a jeho vliv na dítě přetrvává i postnatálně. Prevence během těhotenství, které je ve vyspělých zemích věnována značná pozornost, umožňuje snížit mortalitu na hodnoty srovnatelné s nediabetickou populací. Diabetes mellitus má výrazný embryotoxický potenciál se všemi klasickými projevy od zániku plodu přes strukturální a funkční vady až k odchylkám růstu, které se projevují ještě dlouho po porodu. Sledování těhotenství v druhém a třetím trimestru a zvýšená prenatalní a

diabetologická péče vedoucí k lepší prognóze těhotenství již nemá vliv na vznik vývojových vad, které jsou vázány na časnou graviditu, tedy na období ještě před první návštěvou těhotné u gynekologa. Proto je velmi zásadním doporučením plánování gravidity a intenzivní prekoncepční péče, která by měla zahrnovat snahu o co nejlepší metabolickou kompenzaci diabetu tak, aby koncepce byla doporučena v době, kdy má pacientka normální hodnoty glykovaného hemoglobinu. Normální hodnoty glykovaného hemoglobinu (HbA<sub>1c</sub> do 6,4 %) tři měsíce před koncepcí jsou považovány za optimální, nikoli však obligatorní /5/. Glykovaný hemoglobin více jak 10 % v 1. trimestru vysoce koreluje s rizikem fetálních malformací /4/. Ideální hladina krevní glukózy na lačno by měla být nižší než 5,5 mmol/l, postprandiální méně jak 7 mmol/l /4/. Největší význam má normální hladina glykovaného hemoglobinu v době koncepce. V rámci kontroly správné metabolické kompenzace diabetu jsou pacientky vybaveny glukometry a provádějí kontroly glykemií formou selfmonitoringu. Je několik schémat pro kontroly glykemií. Doporučuje se buď denní měření 3 – 4 hodnot nalačno a po jídlech nebo měření tzv. velkého glykemického profilu 1 × týdně, při němž pacientka měří glykemie nalačno, před hlavními jídly, hodinu po hlavním jídle a dále ve večerních a nočních hodinách. Vedle velkého profilu je měřen ještě 1-2 × v týdnu malý glykemický profil se dvěma až třemi hodnotami glykemie denně.

Kontraindikací gravidity jsou špatná metabolická kontrola diabetu s vysokými hladinami glykovaného hemoglobinu a diabetická nefropatie. Absolutní kontraindikací je postižení velkých cév (koronárních arterií a cév zejména na DK).

Součástí prekoncepční péče by mělo být také vyšetření genetické. Při neplánované graviditě se genetické vyšetření doporučuje co nejdříve po zjištění positivity těhotenského testu.

Ženy s diabetes mellitus mají taktéž vyšší riziko těhotenských komplikací, jako jsou pre-eklampsie, proteinurie a polyhydramnion.

V rámci terapie jsou pacientky s diabetes mellitus I. typu léčeny humánními insuliny intenzifikovanými režimy s nejméně 3-4denními dávkami insulínu nebo insulínovými pumpami. Otázkou je používání insulínových analog, které zatím v našem evropském regionu není jednoznačně doporučeno /5/. Pokud se prokáže bezpečnost insulínových analog pro plod, bude možné jejich používání v těhotenství doporučit.

Insulin je tradičně volba číslo 1 při léčbě diabetes mellitus I. typu v těhotenství. Je to nesyntetický preparát na hyperglykémii, kterou nemůžeme kontrolovat jen dietou. Insulin je

hormon s klíčovou rolí v metabolismu sacharidů, tuků i proteinů. Je to polypeptidový hormon získávaný z vepřových nebo hovězích slinivek zbavený proinsulinu i nepatrných příměsí pankreatických bílkovin. Vysoce čištěné insuliny se nazývají „monokomponentní“ a jsou obvykle označovány zkratkou MC. Směsné insuliny jsou připravovány z insulinů extrahovaných z obou uvedených zvířecích druhů. „Lidský“ monokomponentní insulin (humánní insulin) se vyrábí semisynteticky z vepřového insulinu (záměnou alaninu za threonin v  $\beta$ -řetězci) nebo biotechnologicky pomocí přenosu rekombinantní DNA do buňky *Escherichia coli* nebo *Saccharomyces cerevisiae*.

Insulin je rozkládán v gastrointestinálním ústrojí, a proto se musí aplikovat parenterálně: aplikace do podkoží je nejvhodnější a nejčastěji používaná. Místo aplikace ovlivňuje rychlost vstřebávání insulinu a tím i rychlost nástupu jeho účinku: nejrychleji se vstřebává po aplikaci do podkoží na břichu, pomaleji na paži, na hýždích a nejpomaleji z podkoží na stehnech (rychleji po cvičení). Způsob aplikace insulinu určuje zvolená léčebná taktika podle typu onemocnění, klinického stavu a osobnosti nemocného. Je třeba zvolit takový způsob podávání insulinu, aby se dosáhlo co nejlepší kompenzace diabetu co nejnižší dávkou insulinu při co nejmenším narušení běžného životního režimu diabetika. Nezbytným požadavkem je dodržování vhodné diabetické diety i pravidelné fyzické aktivity.

Přípravky insulinu jsou charakterizovány jednak účinností na snižování glykémie (tj. počet mezinárodních jednotek), jednak začátkem a dobou působení (tj. nástup a konec účinku, přičemž maximální účinek je asi v polovině doby působení). U nás dostupné insuliny obsahují nejčastěji 40 jednotek (IU) v 1ml, začínají se používat insuliny, které obsahují 100 jednotek (IU) v 1 ml.

Podle doby působení se insuliny rozdělují do 3 skupin:

- 1) krátkodobě působící insulin, tzv. rozpustný insulin, s rychlým nástupem účinku za 15-30 minut, vrcholem účinku za 2-4 hodiny a jeho trváním 6-7 hodin.
- 2) Intermediární, středně dlouhodobě působící insuliny, s nástupem účinku za 1-3 hodiny a jeho trváním 7-24 hodin.
- 3) Dlouhodobě působící insuliny, s pozdějším nástupem účinku za 3-4 hodiny a jeho trváním po dobu 24 hodin i déle.

K dispozici je množství přípravků, jejichž složení nebo případné kombinace poskytují řadu možností modifikace léčebných režimů.

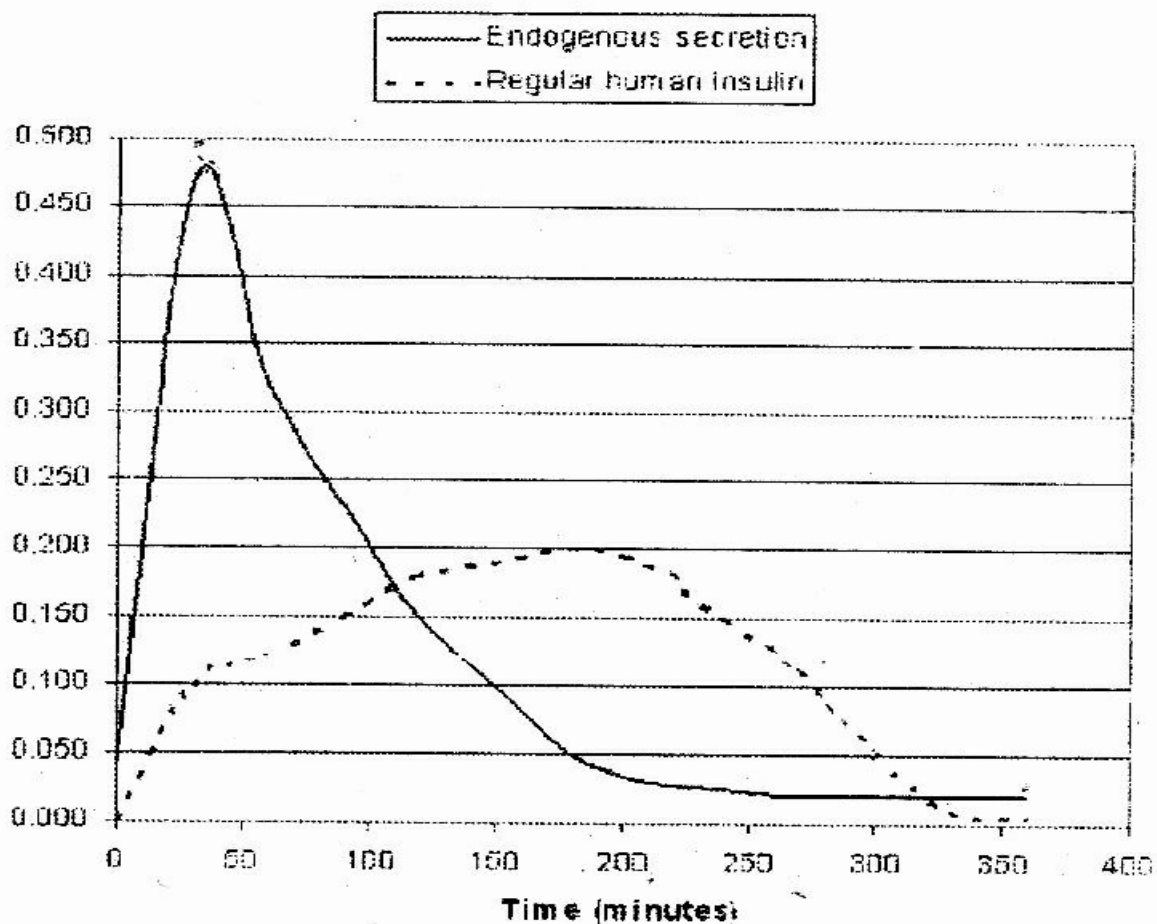
Insulin neprochází placentou, jestliže ano, tak pouze jako komplex insulin-protilátka (jedině má-li matka protilátky proti insulinu). Insulin může způsobit fetální makrosomii, která je rizikovým faktorem fetálního úmrtí, pravděpodobně kvůli zvýšené spotřebě kyslíku /7/.

Fetální makrosomie se vyskytla u žen s vysokou hladinou insulínu v pupečnickové krvi a amniotické tekutině /7/. Vysoké hladiny fetálního insulínu jsou následkem mateřské hyperglykémie spíše než důsledkem terapie insulínem, protože glukóza prochází placentou a způsobuje fetální hyperinsulinémii. Cílem léčby insulínem je substituce endogenní sekrece. Endogenní sekrece je komplexní proces, který závisí na jídle, fyzické aktivitě a aktivitě jiných hormonů. Nejlepší substituční metodou je použití insulinové pumpy.

Insulinová analoga- abychom dosáhli hodnot normální glykémie, subkutánní aplikace exogenního insulínu by měla mít podobnou farmakokinetiku jako insulín secernovaný z pankreatu zdravých lidí. To znamená, rychlý nárůst insulinové koncentrace, krátká doba trvání insulinového peaku a rychlý pokles insulinémie po aplikaci krátkodobě působících insulínů a navíc insulinémie bez peaku u dlouhodobě působících insulínů. To jsou vlastnosti, které by měl insulín mít, aby se co nejvíce podobal insulínu secernovanému z pankreatu u zdravých lidí. Purifikovaný prasečí insulín a lidské insulíny nemají tyto vlastnosti, proto je snaha remodelovat insulinovou molekulu. Změnou primární sekvence aminokyselin se změní terciární struktura a zároveň se změní doba vazby na insulinový receptor /7/.

*Lispro-insulín* je připraven metodami genové technologie, které umožňují cílené pozměnění sekvence aminokyselin na určité pozici v molekule humánního insulínu, a tak ovlivnit uvolňování látky z místa injekce. Lispro-insulín má změnu sekvence 28. a 29. molekuly. Jedná se o výměnu prolin-lysin za lysin-prolin. Tímto se insulín stává více podobný IGF-1 a jeho afinita k tvorbě dimérů a hexamérů se snižuje/7/. Farmakokinetika lispro-insulínu je více podobná insulinové odpovědi zdravého člověka. Vzestup insulinové koncentrace je rychlejší než u normálního insulínu. Zároveň peaky koncentrace insulínu jsou vyšší. Lispro-insulín dokáže lépe zvládnout postprandiální hyperglykémii než normální insulín bez rizika hypoglykémie /7/. To vede k lepší kontrole glykémie. Lispro-insulín se ze subkutánního depa uvolňuje rychleji, než je tomu po subkutánní injekci roztoku přirozeného humánního insulínu: maximální koncentrace v plazmě je dosaženo zhruba za 40 minut a koncentrace je cca trojnásobná oproti situaci po podání normálního insulínu v téže dávce; účinek trvá zhruba 3 hodiny /13/. Oproti molekule normálního insulínu změna sekvence aminokyselin snižuje schopnost molekul agregovat a vytvořit hexamery. Zatímco hexamery se musí nejdříve rozpadnout na dimery a potom na monomery, je lispro-insulín ve tkáni k dispozici přímo ve formě monomeru a může rychle oddifundovat.





**Graf 1: Farmakokinetika sekrece endogenního insulinu a exogenního humánního insulinu.** Převzato z /7/.

Jedna z prvních studií je z roku 1999/7/, kdy 42 těhotných žen náhodně dostalo buď lispro-insulin nebo normální insulin. U lispro-insulinu byl snížený výskyt hypoglykémie a insulin a C-peptid byly nižší. HbA<sub>1C</sub>, glykemie nalačno a po jídle byly podobné v obou skupinách. Ani lispro-insulin, ani normální insulin se neobjevil v pupečnickové krvi a množství insulinových protilátek bylo stejné v obou skupinách. V žádné skupině nebyly pozorovány malformace plodu.

Ani další retrospektivní studie (138 těhotných léčených normálním insulinem a 75 těhotných léčených lispro-insulinem) nepoukázaly na fetální abnormality. HbA<sub>1C</sub> u lispro-insulinu byla signifikantně nižší a pacienti byli více spokojeni s terapií/7/.

## Test embryotoxicity lispro- insulinu

Na základě současných znalostí o farmakokinetice a vzhledem k nedostatku informací o vlivu lispro-insulinu na intrauterinní vývoj člověka jsme se rozhodli provést jeho screeningový test. Volba na lispro-insulin padla díky spolupráci s Teratologickou informační službou, v jejímž rámci je lispro- insulin často dotazovaným léčivem.

Průkaz teratogenních účinků chemických látek u člověka je velmi obtížný, neboť výsledný efekt je závislý na 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 jedné sloučeniny, zpravidla jde o spolupůsobení více látek najednou. Navíc z pochopitelných důvodů je testování léčiv na těhotných ženách zcela nepřijatelné. Proto byla v teratologii vyvinuta celá řada metod, umožňující alternativní testování. My jsme na Oddělení histologie a embryologie 3.LF UK zvolili metodu CHEST (Chick Embryotoxicity Screening Test), neboť jde o metodu zde velmi dobře zavedenou. Rozpracoval ji prof. Jelínek se svými spolupracovníky. 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.

Naší pracovní *hypotézou* bylo, že vliv lispro- insulinu na vývoj plodu se neliší od běžně užívaných humánních insulinů.

## Metoda

Pro testování jsme zvolili geometricky se snižující koncentraci lispro-insulinu ve vodném roztoku: pro skupinu časných vývojových stádií – 0,01 µg, 1 ng, 0,1 ng, 0,01 ng a 0,001 ng/1 ml roztoku. Pro skupinu starších vývojových stádií – 1ng, 0,1 ng, 0,01 ng a 0,001 ng/1 ml roztoku. Všechny vzorky byly připraveny a zpracovány ve stejné laboratoři.

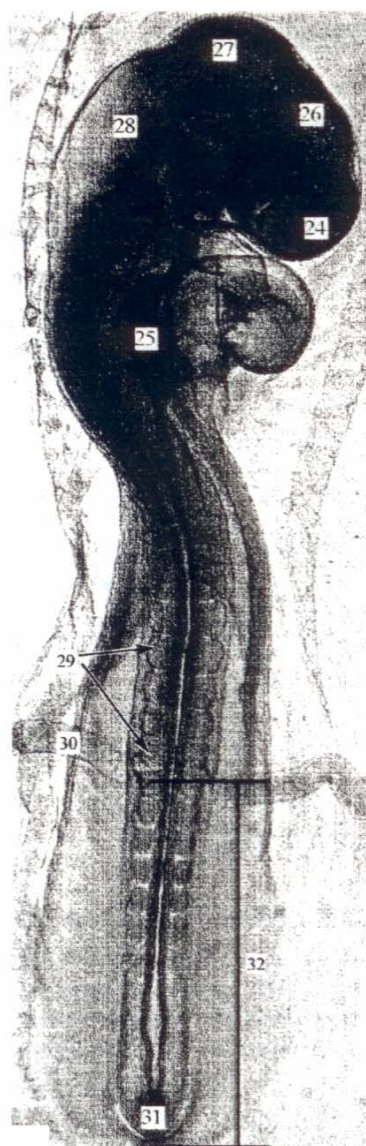
V první fázi metody – CHEST I – jsme hledali pásmo embryotoxicity, tedy takovou dávku, která ohrožuje plod úmrtím nebo malformací. Oplodněná slepičí vejce (White Leghorn) byla inkubována v horizontální poloze při teplotě 37 °C a relativní vlhkosti 40- 60 % po dobu dvou dní. Těsně před aplikací testované látky byla vejce otevřena standardní okénkovou metodou, umožňující u embryí zkontrolovat vývojové stádium a normalitu vývoje. Vyřadili jsme mrtvé plody a vejce neoplozená. Použity byly pouze zárodky morfologicky normální a ve vývojových stádiích HH 10- 11 (vývojová stádia dle Hamburgera a Hamiltona /2/, viz tab.1) zbylá embrya byla z testu vyřazena.

**Tabulka 1: Stádia vývoje kuřecího embrya dle Hamburgera a Hamiltona**

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 neuomer 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.

### Obrázek 1 : Kuřecí embryo staré 48 hodin

převzato z /2/ a modifikováno.

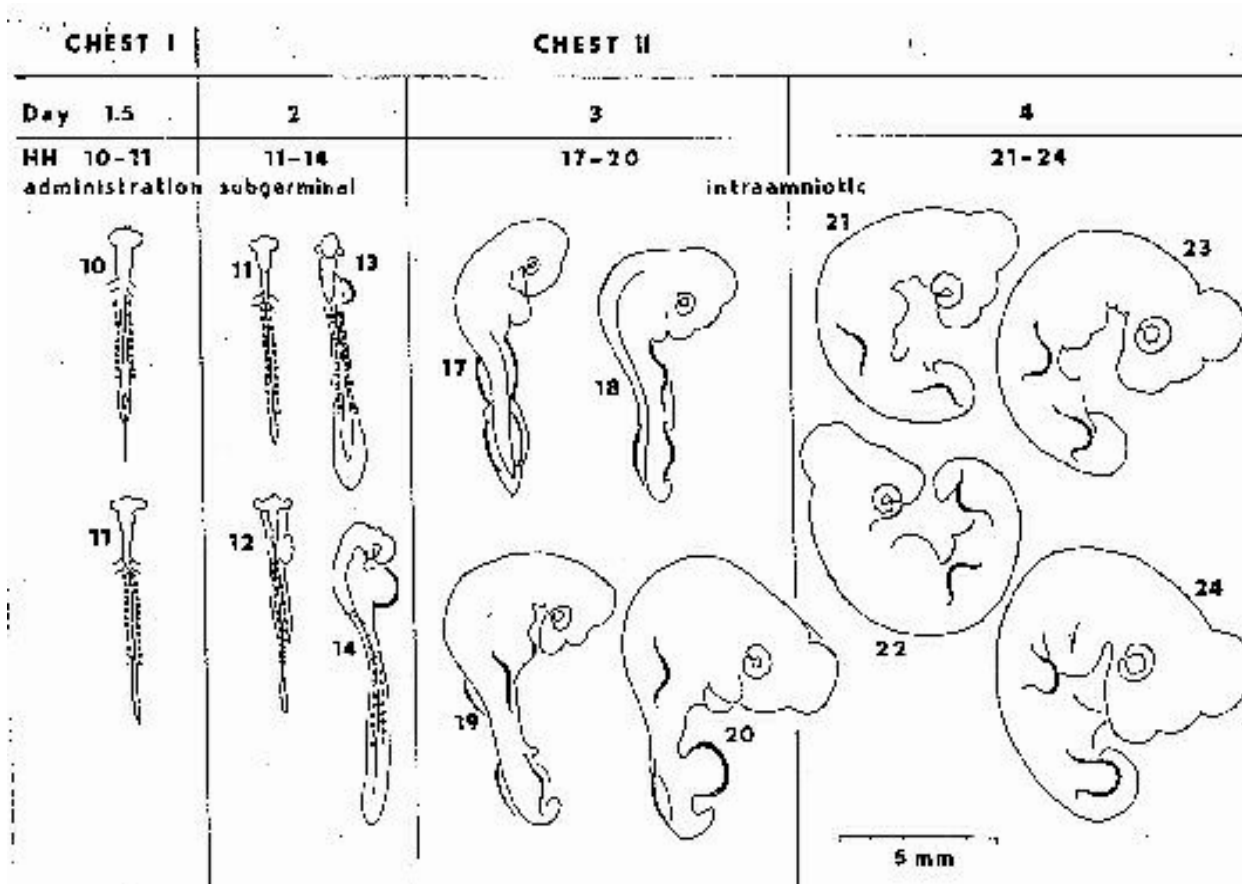


24- telencephalon, 25- přední střevo, 26- diencephalon, 27- mesencephalon, 28- myelencephalon, 29- somity, 30- arteria vitellina, 31- ocasní konec, 32- měřená vzdálenost

Plodům ve stádiích dle HH 10-12 jsme skleněnou mikropipetou pod mikroskopickou kontrolou aplikovali subgerminálně, do blízkosti kaudálního morfogenetického centra, 3  $\mu$ l roztoku lispro-insulinu v takové koncentraci, aby vždy 6 plodů bylo injikováno stejnou koncentrací. Poté jsme vejce uzavřeli krycím sklíčkem připevněným k vejci parafinem a nechali dále inkubovat.

Po 24 hodinové inkubaci jsme vejce znovu otevřeli a okulárním mikrometrem měřili vzdálenost mezi *arteria vitellina* a *koncem ocasu*, která odpovídá nově vytvořené části trupu, jako funkci kaudálního morfogenetického centra. Nevyvinutí *arteria vitellina* jsme hodnotili nulou. Pro každou koncentraci jsme získali šest hodnot, z nichž jsme stanovili medián.

Mediány jsme zanesli do grafu, ve kterém je na abscise označená koncentrace a na ordinátě délka trupu (graf 2). Začátek pásma embryotoxicity se odhadne jako interval mezi poslední neefektivní dávkou a první účinnou dávkou, která je následována dalším trvalým sestupem v grafu.

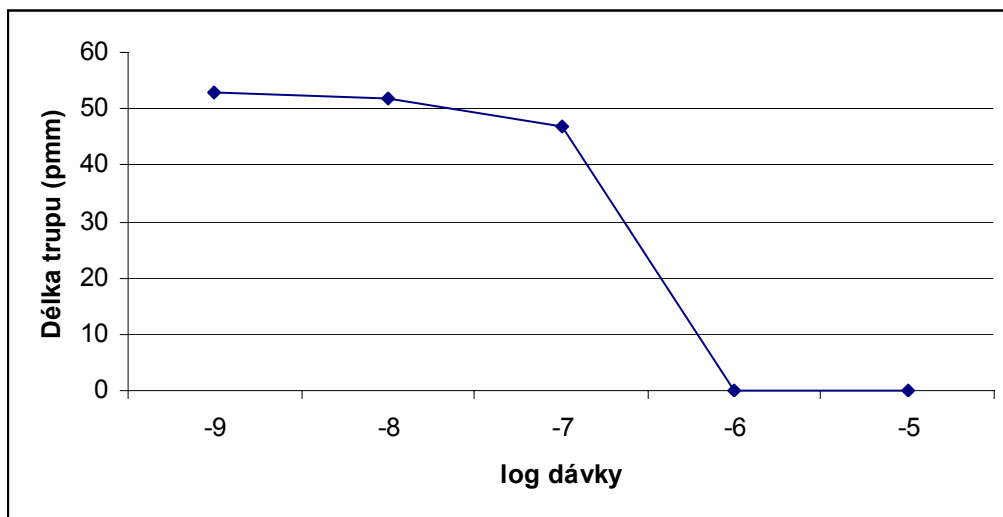


**Obrázek 2: Vývojová stádia kuřecích zárodků dle Hamburgera a Hamiltona**  
převzato z [2] a modifikováno

Druhá fáze metody- 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 v této fázi možné hodnotit četnost jednotlivých typů malformací. Jednotlivé dávky lispro-insulinu jsme aplikovali ve druhém inkubačním dni (každou koncentraci u deseti vajec) a hodnotili typ a závažnost embryotoxicity. 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 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 komorou. Všechny objevené vady a úmrtí plodu jsme zaznamenali. Ze získaných výsledků v druhé fázi jsme vypočítali pravděpodobnost pro úmrtí nebo malformaci plodu vzhledem ke koncentraci lispro-insulinu.

## Výsledky

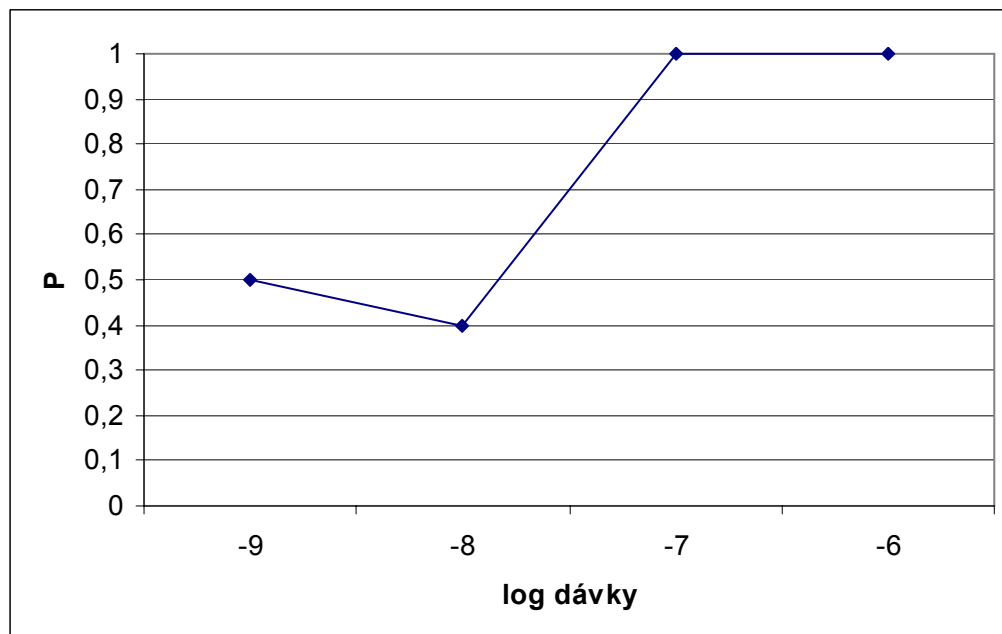
Podle výše uvedeného hodnocení jsme v první části experimentu CHEST I odhadli, že pásmo embryotoxicity lispro-insulinu začíná v intervalu koncentrace  $10^{-7}$  a  $10^{-6}$ .



**Graf 2: CHEST I – odhad pásma embryotoxicity.**

Zaneseny jsou mediány spočítané z jednotlivých naměřených délek nově tvořených částí trupu (pmm) v závislosti na aplikované dávce lispro-insulinu. Odhadnuté pásmo embryotoxicity lispro-insulinu začíná v intervalu koncentrace  $10^{-7}$  a  $10^{-6}$ , tedy mezi poslední neefektivní dávkou a první účinnou dávkou, která je následována dalším trvalým sestupem v grafu.

Výsledky CHEST II (graf 3) jsou získané aplikací dávek lispro-insulinu v odhadnutém pásmu embryotoxicity ve druhém dni. Embryotoxický efekt lispro-insulinu u 2 denních zárodků je v rozmezí  $10^{-8}$  až  $10^{-7}$ . Dávka  $10^{-7}$  byla pro kuřecí zárodky dávkou letální.



**Graf 3: CHEST II – embryotoxický efekt lispro-insulinu**

Zobrazeno je poměrné zastoupení mrtvých a malformovaných plodů v závislosti na dávce. **P**-proporce poškození.

dávka(log)	N	D	M	P	srdce	trup	oko	mozek
-6	10	4	6	1	2	6	2	0
-7	10	2	8	1	2	7	3	1
-8	10	1	3	0,4	0	3	1	0
-9	10	1	4	0,5	2	1	1	2
				<b>Psyst</b>	0,2	0,58	0,24	0,1

**Tabulka 2: CHEST II- embryotoxický efekt lispro-insulinu, spektrum malformací**

Zaznamenány jsou jednotlivé druhy vad.

**N**- celkový počet aplikovaných plodů, **D**- počet mrtvých plodů, **M**- počet malformovaných plodů, **P**- proporce malformovaných nebo mrtvých plodů, **P syst**- proporce postižení jednotlivých orgánových systémů u živých plodů v rámci jedné koncentrace, **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 mezi koncentrací  $10^{-7}$  až  $10^{-6}$ . 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  $10^{-2}$  /11/. To by v našem případě znamenalo dávku vyšší než 10 ng/kg mateřské váhy. Běžně užívaná celková denní dávka je 30 IU (mezinárodních jednotek). Což je dle propočtu 300  $\mu\text{g}$ , za předpokladu že 1  $\mu\text{g}$  je 0,1 IU. Celková denní dávka je o jeden řád nižší než je horní mez pásma embryotoxicity. A proto je možné předpokládat, že podávání lispro-insulinu v časných fázích těhotenství nebude mít embryotoxický účinek. Tomuto výrazně přispívá fakt, že insulin sám o sobě neprochází placentou.

Při hodnocení CHEST II jsme zjistili, že vyšší stadia jsou citlivější. Lispro-insulin způsoboval nejčastěji rumpless syndrom, který se vyskytoval u 45 % živých plodů (přehled všech vad udává 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 komor přítomný u 13 % všech živých plodů. Z ostatních vad byla častěji zastoupena mikroftalmie 23 %. Celkem 39 % živých plodů bylo postiženo víc než jednou vrozenou vadou.

V porovnání s dříve testovanými insuliny (insulin ARMOUR USA, insulin VUFB Czechoslovakia) prof. Jelínkem a spolupracovníky /14/ je studované pásmo embryotoxicity u CHEST I v rozmezí 0,03-3  $\mu\text{g}$  /14/, což je o řád posunuto k vyšším dávkám oproti našemu zjištěnému začátku pásma embryotoxicity, které je v rozmezí 0,1-1  $\mu\text{g}$ . V případě CHEST II se výsledky řádově shodují: 0,003-0,03  $\mu\text{g}$  /14/, náš výsledek: 0,001-0,01  $\mu\text{g}$ . Z toho vyplývá, že používání lispro-insulinu může být doporučeno.



## Souhrn

Procento pacientek s diabetes mellitus I. a II. typu tvoří v populaci těhotných 1,5-2 %. Dobrá metabolická regulace hladiny krevní glukosy je preventivním faktorem spontánních abortů, malformací a makrosomie plodu. Cílem léčby diabetu v těhotenství je normoglykémie. Základem terapie je léčba humánním insulinem. Insulinová analoga nejsou zatím v našem evropském regionu jednoznačně doporučena. Avšak se zdá, že v rámci kontroly hladiny krevní glukosy, je výhodnější používání insulinových analog. Lispro-insulin lépe reguluje postprandiální hyperglykémii než humánní insulin, a zároveň bez rizika hypoglykémie. Další výhodou je snížení výskytu nočních hypoglykemií, které jsou u pacientek s diabetes mellitus I. typu při léčbě humánním insulinem častější.

Výsledky testu metodou CHEST ukázaly, že používaná denní dávka insulinu je o 1 řád nižší než je horní mez pásma embryotoxicity. Vzhledem k obecně nejisté exploraci dat získaných na jiných živočišných druzích na člověka, je pochopitelně nutné tento výsledek interpretovat opatrně.

## Summary

Percentage of pregnant female patients with diabetes mellitus I type and II type is between 1,5-2 %. Sufficient metabolic regulation of blood glucose level is a prevention for miscarriage, malformations and macrosomy of the fetus. The aim of diabetes treatment during pregnancy is normoglycemia. Its main tool is human insulin treatment. Insulin analogs are not yet recommended in Europe. However it seems that their use is more efficient for control of glycemia. Lispro-insulin mainly regulates postprandial hyperglycemia and does it better than human insulin and without risk of hypoglycemia. Another benefit is lowered risk of hypoglycemia during night, which bothers most patients with diabetes I. type, treatment with human insulin.

Result of CHEST test proved that use of daily dose of insulin is lower by one order of magnitude than is limit of embryotoxicity range. Due to species extrapolation of data obtained from other animal species to men it is understandable to interpret the results with caution.

## Literatura

1. Kalter H, Of Diabetic Mothers and Their Babies, Harwood academic publisher 2000.
2. 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.
3. Best practise and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology, Harcourt publishers 2001: 877-880
4. Kučera J, Rate and type of congenital anomalies among offsprings of diabetic women. *J Repro Med* 1971; 7: 61-70
5. Standardy péče o diabetes mellitus v těhotenství, *DMEV* 2004; 1: 43-45
6. Maňáková E, Diabetes mellitus a vývoj plodu, *DMEV* 2002; 3: 148-151
7. Novak B, Pavlic-Renar I, Metelko Ž, Treatment of diabetes during pregnancy, *Diabetologia Croatica* 2004; 1: 33-43
8. Jaeggi ET, Fouron JC, Proulx F. Fetal cardiac performance in uncomplicated and well-controlled maternal type I diabetes. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2001;17(4): 311-315
9. Bauman WA, Yalow RS. Transplacental passage of insulin complexed to antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78(7): 4588-4590
10. Julian D, Abbott UK. An avian model comparative studies of insulin teratogenicity. *Anat Histol Embryol* 1998; 27(5): 313-321
11. 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
12. Suchopár J (ed), *Remedis Compendium*, Panax 1996, 273
13. Lullmann H, Mohr K, Wehling M, *Farmakologie a toxikologie*, Grada Publishing 2004, 469-470
14. Jelinek R, Peterka M, Rychter Z, Chick embryotoxicity screening test- 130 Substances Tested, *Indian Journal of Experimental Biology* 1985; 23(10), 588-595