



**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**3. LÉKAŘSKÁ FAKULTA**



Ústav histologie a embryologie 3. LF UK

**Jana Košťálová**

**Vliv nových psychofarmak na vyvíjející  
se zárodek**

*New psychotropic drugs and their effect on  
developing embryo*

*Diplomová práce*

Praha, červen 2010

Autor práce: Jana Košťálová

Studijní program: Všeobecné lékařství

Studijní obor: Všeobecné lékařství

Vedoucí práce:

**MUDr. Maňáková Eva, Ph.D.**

Pracoviště vedoucího práce:

**Ústav histologie a embryologie 3. LF UK**

Datum a rok obhajoby: 2010

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem předkládanou práci zpracovala samostatně a použila jen uvedené prameny a literaturu. Současně dávám svolení k tomu, aby tato diplomová práce byla používána ke studijním účelům.

V Praze dne 30. března 2010

Jana Košťálová

## **Poděkování**

Děkuji za odborné vedení, poskytnutí důležitých informací a materiálů, odpovědný přístup a významnou pomoc při provedení a zhodnocení výsledků metody CHEST MUDr. E. Maňákové PhD., MUDr. L. Hubičkové-Heringové PhD. a MUDr. Z. Zemanové Csc.

Ráda bych také poděkovala své rodině a blízkým za trpělivost a podporu při práci.

# OBSAH

## ÚVOD

<b>1. TERATOLOGIE A ZÁKLADNÍ POJMY</b> .....	<b>7</b>
1.1. PŘÍČINY VROZENÝCH VAD .....	7
1.2. VYMEZENÍ POJMŮ – EMBRYOTOXICITA, TERATOGEN, PÁSMO BEZPEČNOSTI .....	9
1.3. VÝZKUM TERATOGENITY.....	9
<b>2. TESTOVÁNÍ VLIVU MIRTAZAPINU</b> .....	<b>11</b>
2.1. MIRTAZAPIN .....	11
2.2. DOSTUPNÁ DATA O UŽITÍ MIRTAZAPINU V TĚHOTENSTVÍ.....	12
2.3. POPIS METODY TESTOVÁNÍ .....	14
<b>3. VÝSLEDKY TESTOVÁNÍ</b> .....	<b>18</b>
3.1 DISKUSE .....	19
<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>23</b>
<b>SOUHRN</b> .....	<b>24</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>25</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>26</b>
<b>PŘÍLOHY</b> .....	<b>28</b>

## Úvod

Deprese je běžné onemocnění žen fertilního věku. Celoživotní prevalence je 10-25 procent s maximem mezi 25. - 44. rokem.

9 procent žen má v těhotenství depresivní symptomy, mezi které patří únava, změny spánku, chuti k jídlu, někdy těžko odlišitelné od běžných projevů v těhotenství. Mezi rizikové faktory vzniku deprese patří: předchozí depresivní porucha, mladší věk, omezená sociální podpora, život o samotě, větší počet dětí, manželský konflikt, ambivalentní vztah ke graviditě.

Farmakoterapie deprese v těhotenství je velkým problémem pro gynekologii a porodnictví. Terapie vychází z posouzení rizika a užítku pro matku a dítě. Neléčená deprese v těhotenství může vést k fetoplacentární dysfunkci, předčasnému porodu, abortům, růstové retardaci a nečekaným perinatálním komplikacím. Na druhé straně terapie může vyvolat vznik malformací, symptomů z odnětí a zhoršený neuropsychologický vývoj. (13) Existuje mnoho studií, které dokumentují bezpečnost tricyklických antidepressiv a SSRI, ale účinek nových psychofarmak je zatím málo zdokumentovaný.

Ve své diplomové práci se věnuji testování mirtazapinu na vyvíjející se zárodek. K testování jsme použili metodu CHEST II – chick embryotoxicity screening test.

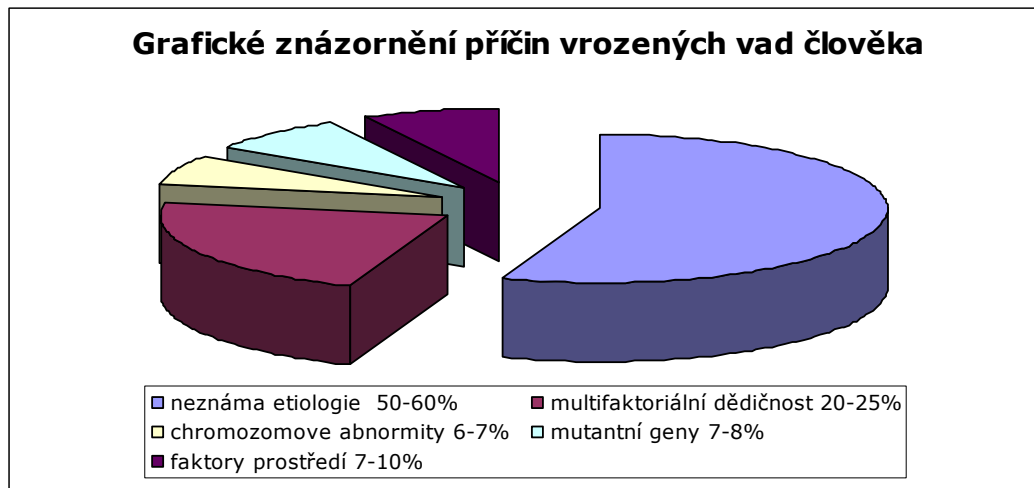
Cílem práce je prokázat bezpečnost užití mirtazapinu v těhotenství, případně odhalit jeho teratogenní působení na vyvíjející se zárodek.

# 1. Teratologie a základní pojmy

Teratologie je nauka o vrozených vadách, tj. o defektech organismu, jež vznikají v důsledku negativního působení zevních faktorů na individuální vývoj. Vrozená vada znamená trvalou odchylku struktury, funkce či biochemizmu, přesahující meze normální variability druhu, jež vznikla prenatálně narušením vývojového procesu a svého nositele znevýhodňuje vzhledem k ostatním jedincům. Podle toho dělíme vrozené vady na strukturální, funkční a biochemické. (1) V současnosti je teratologie rychle se vyvíjející obor. Důležitosti nabyl v 60. letech po thalidomidové aféře, počet prací zkoumajících efekt jednotlivých farmak prudce stoupá. V současné době se teratologie diferencovala do tří vzájemně nezastupitelných směrů. **Epidemiologického** – sledujícího a analyzujícího výskyt vývojových vad v prostoru a čase, **klinického** – klinický teratolog je členem týmu prenatálních poraden, kde se účastní pátrání po škodlivých vlivech vyvolávajících vývojové vady a plánování dalšího těhotenství, a konečně **experimentálního**. (1)

## 1.1. Příčiny vrozených vad

Příčiny vrozených vad je možno rozdělit na **genetické faktory** (chromozomální aberace) a **faktory prostředí** (léčiva, viry a fyzikální faktory). Mnoho vad ale vzniká společným působením genetických a zevních faktorů na podkladě multifaktoriální dědičnosti. Z grafu č. 1 vyplývá, že většina, tedy 50-60% vývojových vad, je neznámé etiologie, u 20-25% je etiologie multifaktoriální, z 6-7% jsou příčinou chromozomální abnormity, v 7-8% mutantní geny a v 7-10% faktory prostředí. (2)



**Graf č. 1: Grafické znázornění příčin vrozených vad člověk**  
(Převzato z 2)

Citlivost k teratogenním agens se mění v závislosti na vývojovém stádiu v době expozice. V časných fázích embryogeneze - tj. před implantací - působení škodlivých faktorů nevede k lokalizovaným defektům. Následkem je buď smrt zárodka, nebo jeho přežití bez následků kromě lehkého zpoždění vývojového schématu - odpověď vše, nebo nic. Nejcitlivějším obdobím pro indukci strukturálních defektů a orgánových soustav je období organogeneze, které je charakterizováno segregací buněčných populací do primordií tvořících budoucí orgány. (3)

Následující tabulka č. 1 ukazuje možné poškození plodu teratogenem během jednotlivých period prenatalního vývoje. Tučným písmem je naznačená vysoce senzitivní perioda - citlivá perioda, během které dochází ke vzniku těžkých vrozených vad. Kurzívou je naznačená méně senzitivní perioda, kdy se mohou vyvinout jenom drobné defekty. (TA - truncus arteriosus, ASD - atriální septální defekt, VSD - ventrikulární septální defekt.) (2)



**Tabulka č. 1: Možné poškození plodu během intrauterinního období**  
(Převzato z 2)

perioda dělení zygoty a implantace		hlavní embryonální období (týdny)						fetální perioda (týdny)				
1	2	3	4	5	6	7	8	9	16	32	38	
nevnímavé k teratogenezi - smrt zárodku a spontánní abort	defekty neurální trubice						mentální retardace				CNS	
	TA, ASD, VSD						srdce					
	amelie/meromelie			amelie/meromelie			horní končetiny					
	amelie/meromelie			amelie/meromelie			dolní končetiny					
	rozštěp rtu			rozštěp rtu			horní ret					
	nízko nasazené uši a hluchota			nízko nasazené uši a hluchota					uši			
	mikroftalmie, katarakta, glaukom						oči					
	hypoplazie a zabarvení skloviny						zuby					
	rozštěp patra						patro					
	maskulinizace ženských genitálií						zevní genitálie					
	TĚŽKÉ VROZENÉ VADY						FUNKČNÍ DEFEKTY A DROBNÉ ANOMÁLIE					

## 1.2. Vymezení pojmů – embryotoxicita, teratogen, pásmo bezpečnosti

**Embryotoxicita** – je obecnou vlastností zevních faktorů a může způsobit vývojovou vadu, růstovou retardaci nebo smrt zárodku. Vykazuje vždy pozitivní závislost na dávce. Incidence poškozených zárodků zpočátku stoupá v závislosti na intenzitě embryotoxického impulzu, ale po dosažení určitého limitu jejich absolutní počet klesá a malformované zárodky jsou vystřídány zárodky mrtvými.

**Teratogenicita** je schopnost látky vyvolat vývojovou vadu. Teratogen bývá definován jako faktor vyskytující se v prostředí v takovém množství, které v exponované části populace významně zvýší výskyt projevů embryotoxicity nad jejich bazální frekvenci v populaci neexponované.

**Pásmo bezpečnosti** je rozdíl mezi začátkem pásma embryotoxicity a pravděpodobnou dávkou expoziční. (3)

## 1.3. Výzkum teratogenity

Důkaz 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. (1)

Podle FDA (Food and Drug Administration) dělíme látky do několika kategorií:

**Kategorie A:** Látka u těhotných žen prokazatelně nevyvolává poškození plodu

**Kategorie B:** Studie na zvířatech jsou negativní, ale neexistují adekvátní studie u těhotných žen

**Kategorie C:** Studie na zvířatech zachytily nepříznivý efekt na plod, ale neexistují adekvátní studie u těhotných žen

**Kategorie D:** Zahrnuje látky potenciálně teratogenní, u nichž terapeutický efekt převáží riziko vzniku malformace plodu (propylthiouracil při těžkém onemocnění štítné žlázy, streptomycin při tbc a phenytoin u těžké epilepsie). Když je látka podávána těhotné ženě nebo když žena otěhotní v průběhu léčby, je třeba, aby ji lékař na toto riziko upozornil.

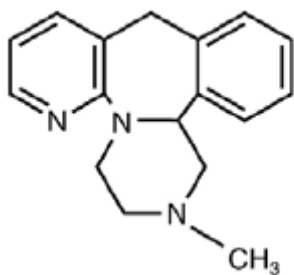
**Kategorie X:** Zahrnuje látky v těhotenství zásadně kontraindikované, protože způsobují abnormality u zvířat i u člověka a potenciální riziko vzniku vady jasně převažuje nad ziskem z léčby. (1)

## 2. Testování vlivu Mirtazapinu

### 2.1. Mirtazapin

Mirtazapin je z prvních nových antidepresiv patřících do skupiny NaSSA – noradrenergic and specific serotonergic antidepressants. Má dualistický účinek – blokuje  $\alpha_2$  receptory noradrenergických a serotoninových neuronů. Je antagonistou i na histaminových nervových zakončeních (sedace, zvýšení tělesné hmotnosti) a účinkuje slabě anticholinergně. Působí antidepresivně, sedativně a hypnoticky a anxiolyticky. Indikací je deprese s insomnií, nechutenstvím, snížením hmotnosti, anxiétou a sexuálními dysfunkcemi, na které má pozitivní vliv. Nadějný je i pro depresivně nemocné, kteří jsou farmakorezistentní k inhibitorům reuptaku monoaminů a inhibitorům monoaminoxidázy. Klinické studie ukázali, že mirtazapin má lepší účinek než placebo a srovnatelný efekt jako tricyklická antidepresiva – amitriptylin a klomipramin. Oproti SSRI účinkuje rychleji, proti TCA je lépe snášen. Výhodou mirtazapinu je i blokáda 5-HT<sub>2</sub> a 5-HT<sub>3</sub> receptorů, čímž nepůsobí nežádoucí serotoninové účinky jako SSRI. Jako nežádoucí účinky se mohou objevit únava, somnolence, závratě, sucho v ústech, obštipace, zvýšená chuť k jídlu, zvýšení tělesné hmotnosti, vzácně ortostatická hypotenze, přesmyk do mánie, benigní zvýšení aminotransferáz, cholesterolu a triacylglycerolů, ojediněle se mohou objevit křeče, třes nebo svalové záškuby. Zcela ojediněle se mohou vyskytnout kožní vyrážky, žloutenka nebo poruchy krvetvorby, projevující se zvýšenou únavou, horečkou, bolestí v krku a tvorbou modřin. Mirtazapin potencuje účinek všech látek působících tlumivě na CNS včetně alkoholu a benzodiazepinů. Nesmí být kombinován s inhibitory MAO, které by měly být vysazeny 2 týdny před začátkem užívání. (4,5,6)

Chemickou strukturu mirtazapinu znázorňuje obrázek č.1.



**Obrázek č. 1: Chemická struktura mirtazapinu**

## ***2.2. Dostupná data o užití mirtazapinu v těhotenství***

Mirtazapin má malou molekulární hmotnost, proto se předpokládá jeho dobrý transport skrz placentární bariéru. (11) Jedná se o nové léčivo užívané při depresi, je tedy dostupných jen málo informací o jeho efektu na vyvíjející se plod. V literatuře je ale popsáno něco málo studii těhotných žen exponovaných mirtazapinu.

Kessim a kol. publikovali kasuistiky dvou těhotných žen exponovaných mirtazapinu. První žena byla exponovaná dlouhou dobu před těhotenstvím v kombinaci s triflorperazinem, všechny gynekologické nálezy byly normální, dítě porodila spontánně ve 40. týdnu těhotenství, bez zjištění přítomnosti vrozené vývojové vady.

Druhá žena brala mirtazapin v kombinaci s triflorperazinem po dobu 4 týdnů těhotenství, všechny gynekologické nálezy byly normální. Porod proběhl císařským řezem pro předčasné odloučení placenty v 39. týdnu. Dítě trpělo do 5. týdnu gastroezofageálním refluxem, jeho vznik ale nebyl připisován účinku mirtazapinu. (8)

Yaris a kol. publikovali kazuistiku 9 těhotných žen – 5 užívalo mirtazapin v kombinaci s ostatními psychofarmaky a 4 ženy samostatně mirtazapin v dávce 30-60 mg/den po dobu v průměru 1-12 gestačních týdnů. Terapie byla indikovaná již

před těhotenstvím a byla vysazena na přání těhotných kromě jednoho případu, kdy byla indikovaná interrupce ze strany matky. Všechny gynekologické a sonografické nálezy byly normální. Děti byly sledovány v průběhu jednoho roku a nebyly nalezeny žádné vývojové vady. (9)

Sokolover a kol. popsali případ dvojčat, kdy matka byla léčená mirtazapinem po celou dobu trvání těhotenství. Děti se narodily v 35. týdnu těhotenství císařským řezem. Oba novorozenci trpěli mírnou až střední hypotermií (35,8-36 °C). Všechny příčiny hypotermie jako sepse, meningitida, encefalitida a malnutrice byly vyloučeny. Autoři dospěli k závěru, že příčinou hypotermie bylo užívání mirtazapinu v těhotenství. Ten pravděpodobně inhibuje termoregulační centrum v hypotalamu. Po vyloučení mirtazapinu z těla po 10 dnech hypotermie vymizela. (11)

Další studie publikovaná kolektivem autorů v The Journal of Clinical Psychiatry se zabývala porovnáváním skupin žen, které byly během těhotenství exponovány mirtazapinu, jiným antidepressivům a neteratogenním farmakům. Ve skupině, která byla léčena mirtazapinem, bylo 106 žen. Většina žen byla exponována v průběhu prvního trimestru a asi 25% žen bylo exponováno v průběhu celého těhotenství. Ze skupiny se 77 ženám narodilo zdravé dítě bez malformací, u 20 žen těhotenství skončilo spontánním abortem, 6 žen přistoupilo k umělému přerušování těhotenství, dvě děti měly malformace a jeden plod byl porozen mrtvý. Při pozorování se zjistila vyšší incidence spontánních potratů ve skupině žen užívajících mirtazapin (19% oproti 11% u žen s neteratogenními farmaky) a bylo zaznamenáno zvýšení počtu předčasných porodů (10% oproti 2% u žen s neteratogenními farmaky), výskyt malformací však zvýšen nebyl. (12)

Následující tabulka ukazuje dostupná data z Teratologické informační služby (CZTIS) na Oddělení histologie a embryologie

3.lékařské fakulty UK v Praze těhotných pacientek užívaných mirtazapin v průběhu těhotenství. Ze souboru 15 pacientek byl u dvou pacientek přítomen spontánní abort, jedna pacientka podstoupila umělé přerušování těhotenství, jedna pacientka porodila předčasně a tři pacientky porodily v termínu. Tabulka uvádí pohlaví, porodní hmotnosti a porodní délku. U osmy pacientek nejsou dostupná data (jedná se o nové pacientky, nebo pacientky, které již nekontaktovali CZTIS).

**Tabulka č. 2: Tabulka těhotných pacientek užívajících mirtazapin**

číslo pacientky	porod/abort/UPT	pohlaví hmotnost	porodní délka
02-0078	spontánní abort		
03-0111	porod v 39. týdnu	F 3550 g	52 cm
04-0035	-		
05-0002	UPT		
06-0095	-		
07-0044	porod v termínu	-	-
07-0104	-		
07-0122	-		
09-002	porod v 32+2	M 1980 g	47 cm
08-0132	abort do 20 týdnu		
09-0112	porod v 39 týdnu	F 2600 g	46 cm
08-0206	-		
09-0183	-		
10-0070	-		
10-0144	-		

### **2.3. Popis metody testování**

Testování toxicity mirtazapinu bylo prováděno metodou CHEST (Chick Embryotoxicity Screening Test). Je to alternativní metoda, která zahrnuje testování embryotoxicity a teratogenity látek na kuřecích zárodcích. Metoda CHEST má dvě základní fáze. CHEST I, kdy rostoucí dávky aplikujeme do zárodků na vývojovém stadiu 10 a 11 podle Hamburgera a Hamiltona. Po 24hodinové inkubaci měříme přírůstek nově tvořených částí

pomocí mikrometru. Měří se vzdálenost mezi aa. vitellinae a koncem ocasu. Výrazné zkrácení těla zárodku dokazuje, že látka interferuje s funkcí kaudálního morfogenetického systému. Při použití metody CHEST II aplikujeme vzestupnou dávku intraamniálně, zárodky inkubujeme a hodnotíme výskyt mrtvých a malformovaných embryí. Velkou výhodou CHEST metody je fakt, že není přítomen mateřský organizmus, který by mohl výsledky podstatně změnit. Zkreslení výsledků by mohlo být způsobeno hlavně tím, že v mateřském organizmu dochází k biochemické degradaci a tím i k metabolickým změnám primárně podávaného farmaka. Metabolizmus pokusného zvířete může být zcela odlišný od metabolismu člověka. Ve výsledku by mohlo být teratogenní působení látky mylně vysvětleno metabolity, které se u člověka vůbec nevyskytují, pokud je teratogenese u člověka výsledkem působení metabolitů.

Při testování teratogenního účinku léčiv lze v zásadě postupovat dvojím způsobem. Buď přepočítáváme maximální přípustnou terapeutickou dávku u člověka na váhový ekvivalent pro zvolené pokusné zvíře a zkusíme, zda vyvolává malformace, nebo zvolíme nejnižší embryotoxickou dávku u pokusného zvířete a tu porovnáme s terapeutickou dávkou u člověka. Vzdálenost zjištěné hranice teratogenního pásma od maximální terapeutické dávky je pak měřítkem bezpečnosti použití léčiva v praxi s ohledem na možný vznik vrozených vad. (10)

Horní limit nspecifického efektu byl opakovaně vypočten jako  $0,3=30\%$ . To znamená, že všechny hodnoty nad tento limit jsou statisticky významné. Počáteční embryotoxicita je dána nejnižší dávkou, při které signifikantně vzrůstá počet mrtvých a malformovaných zárodků.

Prediktivní hodnota pro alternativní testovací metodu CHEST je v porovnání s oficiálními testy na savcích 80%. (6)

Pro testování embryotoxicity jsme použili metodu CHEST II. Pro testování jsme užili 4-denní kuřecí zárodky, živé a morfologicky normální ve vývojových stádiích HH 21-24 (vývojová stádia dle Hamburgera a Hamiltna – popis viz tabulka č. 3).

Na počátku testování bylo nezbytné vyřadit vejce neoplodněná, zárodky mrtvé a malformované. Přítomnost zárodku ve vejci jsme ověřovali prosvícením. Polohu zárodku jsme si označili křížkem a propíchlí jsme vzduchovou bublinu, aby došlo k poklesu obsahu vejce. Nad zárodkem jsme následně pomocí brusky vyřízli okénko a pinzetou odstranili membránu papyraceu. Výhodou okénka je, že máme možnost pozorovat morfologické změny nebo úmrtí zárodku před začleněním do výzkumu, po aplikaci, po dobu inkubace až do okamžiku odebrání všech zárodků. Pod preparačním mikroskopem jsme ověřili vývojové stadium kuřecího zárodku a skleněnou mikropipetou jsme pod mikroskopickou kontrolou aplikovali intraamniálně 3 $\mu$ l roztoku mirtazapinu rozpuštěného v DMSO (dimethyl sulfoxide) a 3 $\mu$ l roztoku mirtazapinu rozpuštěného v DMSO a destilované vodě.

DMSO bylo užito jako ředidlo, protože mirtazapin není ve vodě rozpustný. Některé zárodky jsme ponechali jako kontroly bez aplikace jen s otevřením, nebo jsme jako kontrolu aplikovali 3 $\mu$ l DMSO, 3 $\mu$ l Ringrova roztoku, 3 $\mu$ l destilované vody a 10 $\mu$ l Ringrova roztoku. Vytvořené otvory jsme překryli sterilním sklíčkem a upevnili do parafinového rámečku. Zárodky jsme inkubovali v termostatu v horizontální poloze po dobu 5 dní při teplotě 37,5 °C. Každý den jsme kontrolovali přežití zárodků. Po 5 dnech (9-denní zárodky) jsme znovu otevřeli vejce (odstranili jsme sklíčko s parafínem), všechny zárodky jsme zvážili a zkontrolovali na přítomnost malformací jednotlivých orgánů. Kontrolovali jsme normální morfologii hlavy (mozkové váčky, obličej - zobák, oči), končetin, ocasu, uzávěr dutiny břišní



a hrudní a stavbu srdce. Výsledky jsme zaznamenali do protokolu.

**Tabulka č. 3: Stadia kuřecích zárodků podle Hamburgera a Hamiltna**  
(Převzato z 14)

vývojové stadium podle Hamburgera a Hamiltna	znaky
21	proximální končetinové pupeny se zvětšují, proximální jsou širší než delší, dolní zakřivení zahrnuje lumbosacrální oblast, dorsální obrys trupu je přímý nebo lehce zakřivený, je zřetelná oční pigmentace
22	proximální končetinové pupeny jsou stále symetrické, délka je pravidelně shodná s šířkou, ventrálně vpravo zřetelně viditelný váček allantoidy, cévní řečiště allantoidy nediferencováno
23	proximální i distální končetiny o málo delší, než je jejich šířka, proximální končetina směřuje ke kaudální části zárodku, počátek diferenciacce cévního systému allantoidy
24	proximální i distální končetiny zřetelně delší než širší, prstová destička zřetelně vyznačena u distální končetiny, zřetelné odškrfování distální končetiny v ramenní oblasti, diferenciacce cévního systému allantoidy, která dosahuje k distální končetině nebo ji překrývá
25	na končetinách jsou zřetelné loketní a kolenní spoje, zřetelná prstová destička u proximální končetiny, ale bez vyznačení prstů, na distální končetině náznak mělkých žlábků ohraničující třetí prst - je však překryta allantoidou

### 3. Výsledky testování

V testování jsme aplikovali několik skupin zárodků.

První skupině jsme aplikovali 3 $\mu$ l roztoku mirtazapinu rozpuštěného v destilované vodě a DMSO. Této skupině zárodků jsme aplikovali dávky 0,004 $\mu$ g, 0,04 $\mu$ g a 1,2 $\mu$ g roztoku ve 3 $\mu$ l roztoku a 0,36 $\mu$ g roztoku v 10 $\mu$ l roztoku. Jako kontroly k těmto zárodkům jsme aplikovali 3 $\mu$ l a 10 $\mu$ l Ringrova roztoku. Výsledky aplikací ukazují tabulky č. 4-9 v příloze.

Druhé skupině zárodků jsme při testování rozpouštěli mirtazapin pouze v DMSO, protože jsme zjistili jeho špatnou rozpustnost v kombinaci s destilovanou vodou ve vysokých dávkách. V této skupině jsme aplikovali 3 $\mu$ l roztoku o dávkách 0,03 $\mu$ l, 0,05 $\mu$ l, 0,1 $\mu$ l, 0,15 $\mu$ l, 0,2 $\mu$ l. Jako kontrolu jsme aplikovali 3 $\mu$ l DMSO a 3 $\mu$ l destilované vody. Výsledky této skupiny jsou zaneseny v tabulkách č.10-16 .

V druhé skupině zárodků jsme porovnávali statistickou významnost jednotlivých vad diagramem aritmetických průměrů s 95% intervalem spolehlivosti. Předpokládali jsme, že mezi skupinou zárodků, kterým jsme aplikovali 0,05 $\mu$ l roztoku, a skupinou zárodků, kterým jsme aplikovali kontrolní roztok DMSO, není statisticky signifikantní rozdíl. Hodnoty jsme vynesli do grafů č. 5-12, které jsou součástí přílohy. Naše hypotéza se nám potvrdila ve všech případech kromě malformace, která postihovala břišní a hrudní stěnu. Aritmetické průměry obou porovnávaných skupin se statisticky významně liší. Při testování zárodků aplikací mirtazapinu v dávce 0,05 $\mu$ g dochází ke statisticky významně nižší početnosti malformací břišní a hrudní stěny než je tomu u aplikace kontroly DMSO.

Z grafu č. 8 vidíme rozdíl mezi malformacemi tělní stěny ve skupině zárodků s aplikací mirtazapinu a kontrolních zárodků. Ve skupině kontrolních zárodků bylo množství těchto vad vyšší.

### 3.1 Diskuse

Z výsledku, které jsou uvedeny v tabulkách č. 4-9 vyplynulo, že dávky 0,004 $\mu$ g a 0,04 $\mu$ g můžeme považovat za dávky bezpečné, zatímco při dávkách 0,12 $\mu$ g a 0,36 $\mu$ g docházelo k úmrtí víc než 50% zárodků a zbylé zárodky byli malformované ve 100%. Tuto skupinu výsledků ale nemůžeme správně interpretovat, protože jsme empiricky zjistili, že ve vyšších dávkách nedocházelo k úplnému rozpuštění mirtazapinu v DMSO s destilovanou vodou. Proto bylo velmi obtížné stanovit, jaká dávka se ve skutečnosti dostala k zárodkům.

Druhé skupině aplikací jsme aplikovali roztok mirtazapinu rozpuštěného v DMSO. V této skupině aplikací jsme použili dávky 0,03 $\mu$ g, 0,05 $\mu$ g, 0,1 $\mu$ g, 0,15 $\mu$ g a 0,2 $\mu$ g. Jako kontroly jsme použili 3 $\mu$ l roztoku DMSO a 3 $\mu$ l destilované vody. Souhrn výsledků této skupiny ukazuje následující tabulka č. 17. V každé skupině jsme hodnotili počet a procentuelní zastoupení mrtvých, malformovaných zárodků v jednotlivých dávkách a zastoupení jednotlivých vad.

**Tabulka č.17: Souhrn výsledků aplikací roztoku mirtazapinu rozpuštěného v DMSO a kontrol**

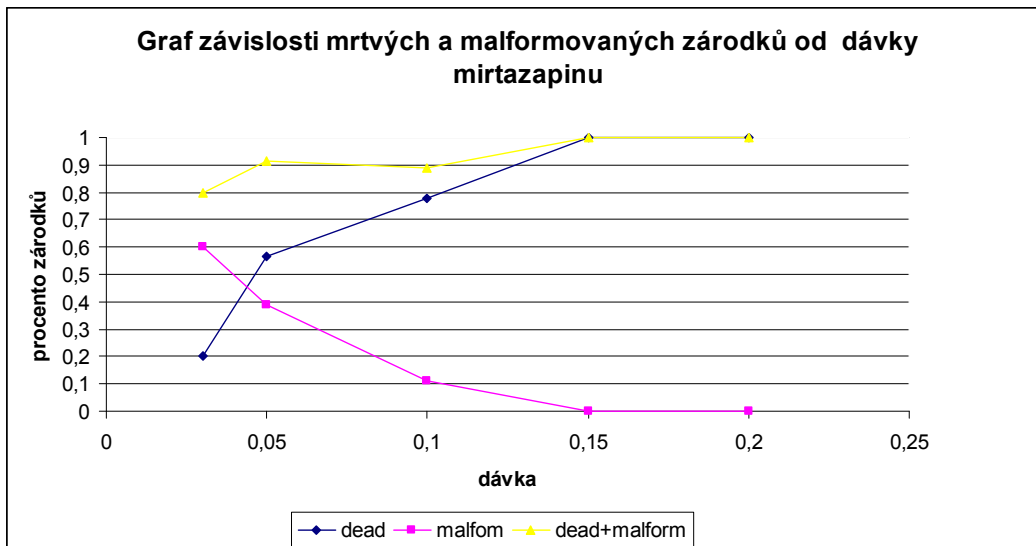
Dose of Mirtazapine	Solvent	Body Weight	Number of					Body Wall	Limbs	Rump	Heart	IUGR
			Dead	Malform	CNS	Eye	Face					
0,2 $\mu$ g v 3 $\mu$ l	DMSO	0	10/10 100%	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,15 $\mu$ g v 3 $\mu$ l	DMSO	0	10/10 100%	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,10 $\mu$ g v 3 $\mu$ l	DMSO	1635 $\pm$ 191	7/9 78%	1/9 11%	0	0	0	0	1/9 11%	0	0	0
0,05 $\mu$ g v 3 $\mu$ l	DMSO	1516,8 $\pm$ 280,6	13/23 57%	9/23 39%	0	2/23 9%	4/23 17%	2/23 9%	1/23 4%	4/23 17%	2/23 9%	1/23 4%
0,03 $\mu$ g v 3 $\mu$ l	DMSO	1488,6 $\pm$ 119,87	2/10 20%	6/10 60%	2/10 20%	0	6/10 60%	6/10 60%	0	0	0	0
KONTROLA 3 $\mu$ l DMSO	DMSO	1478,7 $\pm$ 229,35	1/26 4%	13/26 50%	1/26 4%	0	0	13/26 50%	0	3/26 12%	3/26 12%	0
KONTROLA 3 $\mu$ l destil. vody		1590 $\pm$ 133,98	0	4/6 67%	0	0	0	4/6 67%	0	3/6 50%	1/6 17%	0

Z této aplikace vyplývá, že dávky 0,15 $\mu$ g a 0,2 $\mu$ g jsou dávky letální, dávka 0,05 $\mu$ g se rovná hodnotě LD<sub>50</sub>. Při dávce 0,03 $\mu$ g je počet mrtvých zárodků malý, ale počet malformovaných je vysoký, což by mohlo ukazovat na eventuelní embryotoxicitu této aplikované dávky. Z malformací se ale v této skupině

významně nacházely eventrace hrudní a břišní stěny a malformace obličeje. V porovnání s kontrolami, kdy jsme jedné skupině aplikovali 3 $\mu$ l DMSO a druhé skupině 3 $\mu$ l destilované vody, můžeme říct, že tyto malformace nebyly způsobené ani účinkem mirtazapinu, ani účinkem DMSO, protože se vyskytovaly i u kontrol s DMSO a destilovanou vodou. Vznik těchto malformací mohl být způsoben mechanickým účinkem, nebo změnami během transportu (změny teploty, vlhkosti), případně účinkem jiných látek během chovu slepic.

Výskyt mrtvých a malformovaných zárodků, který nepřesahuje 30%, není významný a mohl být způsobený spontánními vadami. Výskyt těchto spontánních vad, jako i neoplozených vajec, byl poměrně vysoký, což je pravděpodobně způsobeno přítomností příliš starých nebo příliš mladých slepic v chovu, ročním obdobím, případně jinými podmínkami, které nejsme schopni ovlivnit.

Následující graf č. 2 ukazuje závislost mezi dávkou a výskytem mrtvých a malformovaných zárodků. Z grafu je zřejmé, že při nižších dávkách je vyšší výskyt malformovaných a nízký výskyt mrtvých zárodků, zatímco směrem k dávkám vyšším výskyt vad klesá a stoupá počet mrtvých zárodků. Součet mrtvých a malformovaných zárodků se zvyšující se dávkou stoupá.

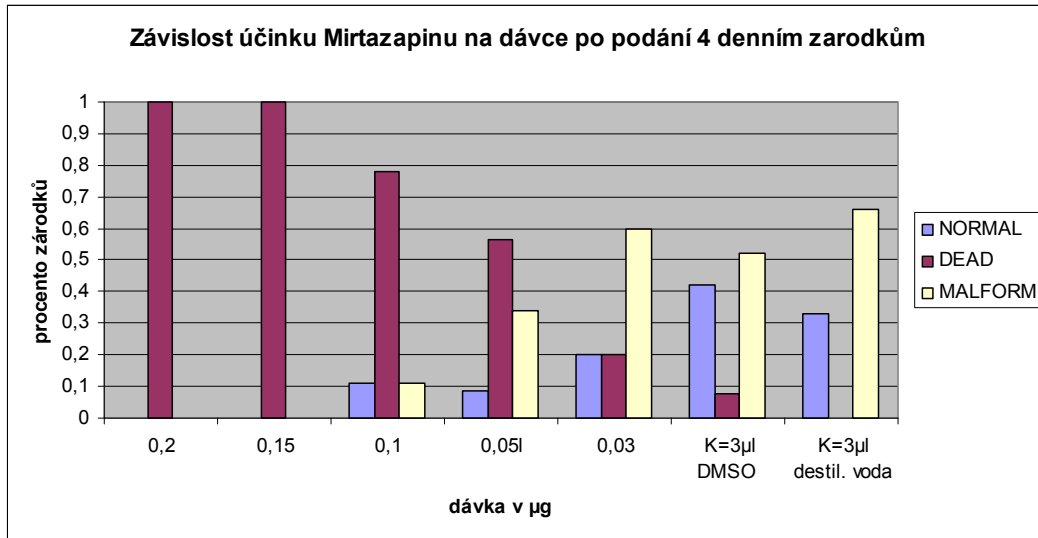


**Graf č. 2: Grafické znázornění závislosti dávky mrtvých a malformovaných zárodků**

Z aplikací dále vyplynulo, že toxická dávka u kuřecích zárodků je podstatně vyšší než je doporučená denní terapeutická dávka, která se pohybuje v hodnotách 40-60mg/24 hod. Pro bezpečnost mirtazapinu dále svědčí fakt, že dostupné informace o užívání mirtazapinu v těhotenství nevykazují negativní efekt na vyvíjející se plod. Otázkou může být působení farmaka na vyšší výskyt spontánních abortů a předčasných porodů, případně toxické působení farmaka při intoxikaci matky.

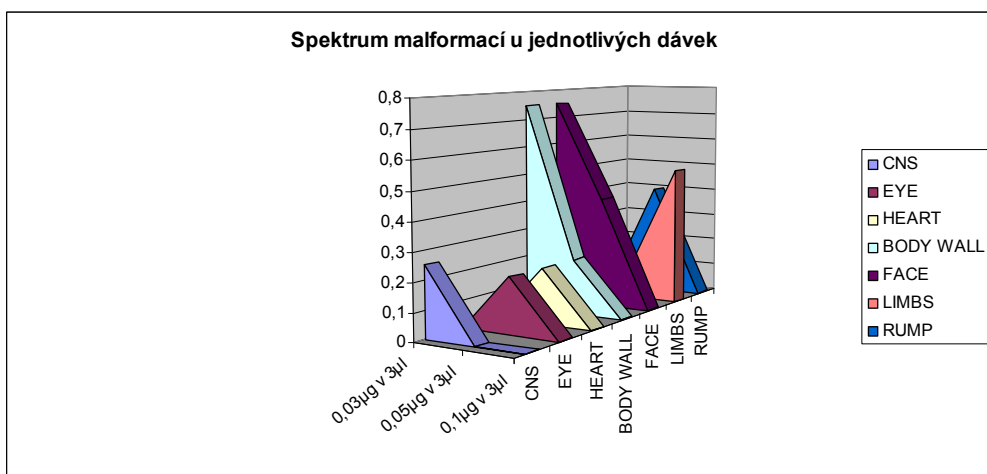
Dále je potřebné si položit otázku, jaká je distribuce látky v mateřském organizmu. Jedná se o látku lipofilní, tím pádem přestupuje přes placentární bariéru, ale je otázka, jaká dávka se ve skutečnosti dostane až k plodu. Distribuce farmaka v organizmu je závislá od mnoha faktorů, jako je i způsob užívání farmaka s potravou. Proto se těhotným užívajícím mirtazapin doporučuje lék užívat vždy se stejnou potravou.

Graf č. 3 nám ukazuje závislost dávky a účinku. Při vyšších letálních dávkách dochází k úmrtí všech zárodků, postupně směrem k nižším dávkám klesá počet zárodků mrtvých a stoupá počet zárodků malformovaných.



**Graf č. 3: Grafické znázornění závislosti dávky mrtvých a malformovaných zárodků**

V následujícím grafu můžeme vidět spektrum malformací u jednotlivých dávek. Nejčastější malformací byla eventrace hrudní a břišní stěny (BODY WALL) a dále pak malformace obličeje (FACE). Z méně častých vad se vyskytovaly vady centrální nervové soustavy (CNS)- mikrocefalie, anencefalie, petechie a hematomy na kalvě, oči (EYE) – mikroftalmie a anoftalmie, srdce (HEART) – defekty septa komor, kardiomegalie, vady končetin (LIMBS) – amelie, mikromelie, a syndrom kaudální regrese (RUMP).



**Graf č. 4: Grafické znázornění spektra malformací u jednotlivých dávek**

## Závěr

Na modelové populaci zárodků kuřete vystavených účinku vzestupných dávek mirtazapinu ve 4. dnu inkubace, jsme určili dávkovou závislost projevů malformací a usmrcení zárodků. Hodnotili jsme počet zárodků mrtvých a malformovaných a výskyt jednotlivých malformací.

Expozice 4-denních zárodků stoupajícím dávkám mirtazapinu se jednoznačně projevila v letalitě dávky nad 0,15 $\mu$ g, při které zemřelo víc než 50 procent zárodků, při dávce nad 0,15 $\mu$ g byla letalita 100 procentní.

Malformační změny postihovaly všechny orgány se zvýšeným postižením hrudní a břišní stěny, kde se vyskytovaly četné eventrace. Z častějších vad byla ještě přítomna malformace obličeje ve smyslu rozštěpu čelisti a zkříženého zobáku. Vzhledem k četnému výskytu obdobných malformací u kontrol nepředpokládáme souvislost těchto malformací s mirtazapinem a použitým rozpouštědlem. Výskyt těchto vad můžeme přičíst věku slepic, ročnímu období, změnami během transportu, nebo změnami v chovu slepic.

Z uvedených výsledků můžeme považovat terapeutickou dávku mirtazapinu za bezpečnou. Otázkou může být působení farmaka na vyšší výskyt spontánních abortů a předčasných porodů, případně toxické působení farmaka při intoxikaci matky.

Pro spolehlivé výsledky je ale nutné doplnit výsledky o účinek mirtazapinu na další vývojová stadia 2- a 3-denních zárodků tak, abychom pokryli všechna důležitá vývojová období.

## Souhrn

Ve své diplomové práci jsem se věnovala účinku mirtazapinu na vyvíjející se zárodek. V současné době jsou vyvíjena nová léčiva používaná k terapii deprese. Mezi tyto léky patří i mirtazapin. Dokumentace rizika užívání léku v těhotenství je ale malá, a proto těhotné ženy nemohou tyto léky užívat pro nedostatek dat o jejich vlivu na vyvíjející se zárodek. Často se jedná o velmi účinná a dobře tolerovaná léčiva, proto je velmi žádoucí doplnit vliv léčiv na vyvíjející se plod.

Na výzkum účinku mirtazapinu na vyvíjející se zárodek jsme použili metodu CHEST (chick embryotoxicity screening test), kdy jsme 4-denním kuřecím zárodkům aplikovali vzestupné dávky roztoku mirtazapinu rozpuštěného v DMSO. Použité dávky byly 0,2 $\mu$ g, 0,15 $\mu$ g, 0,1 $\mu$ g, 0,05 $\mu$ g, 0,03 $\mu$ g ve 3 $\mu$ l roztoku. K těmto zárodkům jsme použili kontroly, kdy jsme aplikovali 3 $\mu$ l DMSO a 3 $\mu$ l destilované vody. Zárodky jsme inkubovali 5 dnů v termostatu. 9. den jsme hodnotili zárodky mrtvé, malformované a rovněž spektrum vyskytujících se vad.

Z našich pozorování jsme získali letální dávku, která se pohybovala nad dávkou 0,15 $\mu$ g ve 3 $\mu$ l roztoku, a dávku, která se rovnala LD<sub>50</sub> – 0,05 $\mu$ g ve 3 $\mu$ l DMSO. Nižší dávky byly bezpečné. Tyto zárodky sice byli malformované, ale malformace se významně nelišily od malformací vyskytujících se u kontrol.

Ve výzkumu je ale nutné ještě pokračovat a doplnit data o 2- a 3-denní zárodky, abychom pokryli všechna vývojová období a mohli prohlásit užívání mirtazapinu v těhotenství za bezpečné. Vzhledem k nejisté extrapolaci dat získaných na jiných živočišných druzích na člověka, je nutné tento výsledek interpretovat opatrně.



## Summary

In my diploma thesis, I researched the effect of mirtazapine on a developing embryo. Nowadays, new drugs are being developed and used for the treatment of depression. These drugs also include mirtazapine. The risk of using mirtazapine during pregnancy has not been documented yet and therefore it can not be used by pregnant women. These drugs are often very effective and well tolerated so it is very important to recognize the effect on a developing embryo.

In our research, we used the method of CHEST (chick embryotoxicity screening test). We applied a dose of mirtazapine solution dissolved in DMSO to 4-day old chickens. The doses were 0.2 $\mu$ g, 0.15 $\mu$ g, 0.1 $\mu$ g, 0.05 $\mu$ g, 0.03 $\mu$ g in 3 $\mu$ l of the solution. As controls, we applied 3 $\mu$ l DMSO and 3 $\mu$ l distilled water. Embryos were being incubated for 5 days in an incubator and on the 9th day, we evaluated dead and malformed embryos and the spectrum of defects.

From our observations, we have obtained the lethal dose, which was above 0.15 $\mu$ g and the dose that was equivalent to the LD<sub>50</sub> – 0.05 $\mu$ g. Lower doses were safe, although these embryos were malformed. These malformations, however, were not statistically significantly different from the malformations occurring in controls. It is necessary to continue and complete data for 2 -and 3-day old embryos, so that we cover all developmental periods and therefore prove the safety of mirtazapine in pregnancy. Due to problems with interpolation of data obtained from other animal species to men, it is understandable to interpret the results with caution.

## Seznam použité literatury

1. Jelínek, R., Dostál, M. a Peterka, M. Základy vývojové toxikologie a teratologie. Ministerstvo životního prostředí České Republiky, 1996. 69 s. ISBN 80-7078-364-8
2. Moore, L. a Persaud, T.V.N. Zrození člověka. Embryologie s klinickým zaměřením. ISV nakladatelství Praha, 2002. 564 s. ISBN 80-85866-94-3
3. Novotná, B., Mošnová V. Vybrané kapitoly z teratologie. 3 Lékařská fakulta UK v Praze, 1994. 25 s. ISBN 80-85121-15-8
4. Höschl, C., Libinger, J., Švestka, J., Psychiatrie. Tigris spol s.r.o 2002, s. 714
5. Raboch, J., Zvolský, P. et al. Psychiatrie. Galén 2001 s. 434 a 460
6. Lincová, D., Farghali, H., Základní a aplikovaná farmakologie. Galén 2007, s.191
7. Peterka, M., Jelínek, R., Pavlík, A. Embryotoxicity of 25 drugs: a study using CHEST. Reproductive Toxicology, 1992, VI 6, pp. 367-374
8. Kesim, M. et al. Mirtazapin Use in Two Pregnant Women: Is it Safe? dostupnost z [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com)
9. Yaris, F. et al. Newer antidepressants in pregnancy: prospective outcomes of a case series. Dostupnost z [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)
10. Jelínek, R., Richter, Z., Peterka, M., Metoda rychlé detekce teratogenního účinku na zárodku kuřete. Československá pediatrie, 1972, ročník 27, č. 8

11. Sokolover, N., Merlob, P., Kliner, G., Neonatal recurrent prolonged hypothermia associated with maternal mirtazapine treatment during pregnancy. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 2008, VI 15, pp.188-190
12. Djulus, J., et al. Exposure to mirtazapine during pregnancy: a prospective, comparative study of birth outcomes. *The Journal of Clinical Psychiatry* 2006
13. Bellantuono, C., Migliarese, G., Imperadore, G. Pharmacologic therapy of depression during pregnancy. Dostupné z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16671276>
14. Hamburger, V., Hamilton, H.L., A Series of Normal Stages in the Development of the Chick Embryo. *Journal of Morphology*, 1951; 88(1):49-92.

# Přílohy

**Tabulka č. 4: Aplikace roztoku mirtazapinu o dávce 0,004 $\mu$ g ve 3 $\mu$ l DMSO a destilované vodě**

č.zárod. HH stg	Dose of M.	Solvent	Body Weight	Number of			CNS	Eye	Face	Body Wall	Limbs	Rump	Heart	IUGR
				Dead	Malform									
01	24	D. č.1	DMSO	1440			N	N	N	N	N	N	N	
02	24	(0,004 $\mu$ g) a voda		-	X									
03	24	ve 3 $\mu$ l		1630			N	N	N	N	N	N	N	
04	24			1450			N	N	N	N	N	N	N	
05	24			1020		X	X	X	X	N	N	N	N	
n=5				1385	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	0	0	0	0	
proporce				$\pm$ 258,52	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2					

**Tabulka č.5: Aplikace roztoku mirtazapinu o dávce 0,04 $\mu$ g ve 3 $\mu$ l DMSO a destilované vodě**

č.zárod. HH stg	Dose of M.	Solvent	Body Weight	Number of			CNS	Eye	Face	Body Wall	Limbs	Rump	Heart	IUGR
				Dead	Malform									
09	21	D. č.2	DMSO a	1200			N	N	N	N	N	N	N	
10	21	(0,04 $\mu$ g) voda		1150		X	N	N	N	X	N	N	X	
11	23	ve 3 $\mu$ l		1590			N	N	N	N	N	N	N	
12	23			-	X									
13	20			980		X	X	X	N	N	N	N	N	
14	23			1520			N	N	N	N	N	N	N	
15	22			1460			N	N	N	N	N	N	N	
16	22			1630			N	N	N	N	N	N	N	
17	21			1310		X	N	N	N	X	N	N	N	
18	22			1530		X	N	N	X	N	N	N	N	
19	22			1340			N	N	N	N	N	N	N	
20	21			1170		X	N	N	N	XX	N	N	N	
n=12				1352,727	1/12	5/12	1/12	1/12	1/12	3/12	0		0	1/12
proporce				$\pm$ 210,43	0,083	0,41667	0,08333	0,08333	0,08333	0,25				0,08333

**Tabulka č.6: Aplikace roztoku mirtazapinu o dávce 0,12 $\mu$ g ve 3 $\mu$ l DMSO a destilované vodě**

č.zárod. HH stg	Dose of M.	Solvent	Body Weight	Number of			CNS	Eye	Face	Body Wall	Limbs	Rump	Heart	IUGR
				Dead	Malform									
21	22	D. č.3	DMSO a	1350		X	N	N	N	XX	N	N	N	
23	23	(0,12 $\mu$ g) a voda		-	X									
24	21	ve 3 $\mu$ l		1180		X	N	N	N	XX	N	N	N	
25	23			-	X									
26	23			-	X									
n=5				1265	3/5	2/5	0	0	0	2/5	0	0	0	
proporce				$\pm$ 120,21	0,6	0,4				0,4				

**Tabulka č.7: Aplikace roztoku mirtazapinu o dávce 0,36 $\mu$ g v 10 $\mu$ l DMSO a destilované vodě**

č.zárod. HH stg	Dose of M.	Solvent	Body Weight	Number of			CNS	Eye	Face	Body Wall	Limbs	Rump	Heart	IUGR
				Dead	Malform									
29	21	D č.4:	DMSO a	-	X		N	N	N	N	N	N	N	
30	22	0,36 $\mu$ l voda		-	X		N	N	N	N	N	N	N	
33	22	ve 10 $\mu$ l		-		X	N	N	N	X	N	N	N	
34	22			-	X									
35	21			-	X									
36	22			1270		X	N	N	N	X	N	N	N	
37	23			-	X		N	N	N	N	N	N	N	
n=7					5/7	2/7	0	0	0	2/7	0	0	0	
proporce					0,71428571	0,28571				0,28571				

**Tabulka č.8: Aplikace 10µl Ringrova roztoku jako kontroly**

č.zárod.	Dose of		Body	Number of					Body				
HH stg	M.	Solvent	Weight	Dead	Malform	CNS	Eye	Face	WALL	Limbs	Rump	Heart	IUGR
38	23	Kontroly	1510		X	N	N	N	XX	N	N	N	
39	21	Ringer	1530			N	N	N	N	N	N	N	
40	20	10ul	1290		X	N	N	N	X	N	N	N	
41	21		1420		X	N	N	N	X	N	N	N	
42	22		1790			N	N	N	N	N	N	N	
43	22		1450		X	N	N	N	XX	N	N	N	
44	22		1570		X	N	N	N	XX	N	N	N	
n=7				0/7	5/7	0	0	0	5/7	0	0	0	
proporce					0,71				0,71				

**Tabulka č.9: Aplikace 3µl Ringrova roztoku jako kontroly**

č.zárod.	Dose of		Body	Number of					Body				
HH stg	M.	Solvent	Weight	Dead	Malform	CNS	Eye	Face	WALL	Limbs	Rump	Heart	IUGR
06	24	Kontroly	1510			N	N	N	N	N	N	N	
07	23	Ringer	1060		X	X	X	X	XX	N	N	X	
13A	?	3 µl	1430			N	N	N	N	N	N	N	
13B	?		1430			N	N	N	N	N	N	N	
n=4			1357,5	0	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	0	0	1/4	
proporce			±201,887		0,25	0,25	0,25	0,25	0,25			0,25	

**Tabulka č.10: Aplikace roztoku mirtazapinu o dávce 0,03µg v 3µl DMSO**

č.zárod.	Dose of		Body	Number of					Body				
HH stg	M.	Solvent	Weight	Dead	Malform	CNS	Eye	Face	Wall	Limbs	Rump	Heart	IUGR
115	24	D. č.8	-	X									
116F	24	0,03 ug	1590			N	N	N	X	N	N	N	
117M	24	ve 3 ul	1433		X	X	N	N	X	N	N	N	
118M	23		1470		X	X	N	N	XX	N	N	N	
119M	23		1240			N	N	N	N	N	N	N	
120	23		-	X	X	N	N	N	X	N	N	N	
121M	24		1450		X	N	N	N	X	N	N	N	
122F	24		1556			N	N	N	N	N	N	N	
123M	24		1570		X	N	N	N	X	N	N	N	
124M	24		1600		X	N	N	N	X	N	N	N	
n=10			1488,63	2/10	6/10	2/10	2/10	0	6/10	0	0	0	0
proporce			±119,87	0,2	0,6	0,2	0,2	0	0,6	0	0	0	0



**Tabulka č.14: Aplikace roztoku mirtazapinu o dávce 0,2 $\mu$ g v 3 $\mu$ l DMSO**

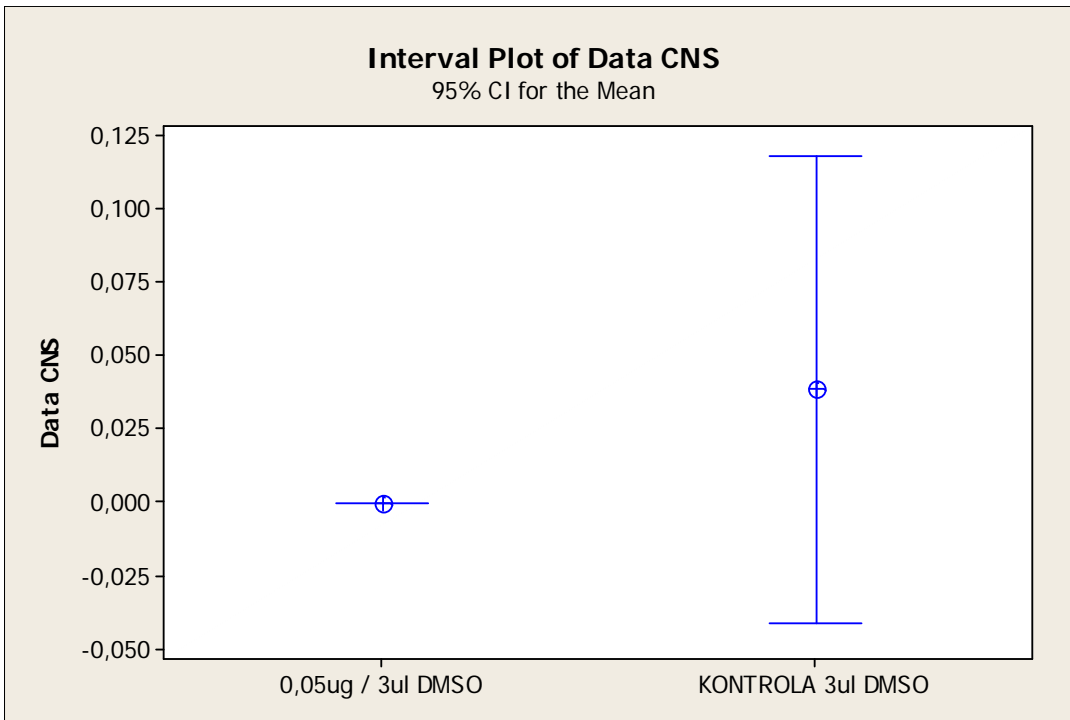
č.zárod. HH stg	Dose of		Body Weight	Number of		Malform	CNS	Eye	Face	Body Wall	Limbs	Rump	Heart	IUGR
	M.	Solvent		Dead										
45	23	D č. 5	DMSO	-	X									
46	23	0.2 $\mu$ g ve		-	X									
47	24	3 $\mu$ l DMSO		-	X									
64	23			-	X									
65	22			-	X									
66	23			-	X									
67	24			-	X									
68	22			-	X									
69	23			-	X									
70	23			-	X									
n=10					10/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
proporce					1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Tabulka č.15: Aplikace 3 $\mu$ l DMSO jako kontrola**

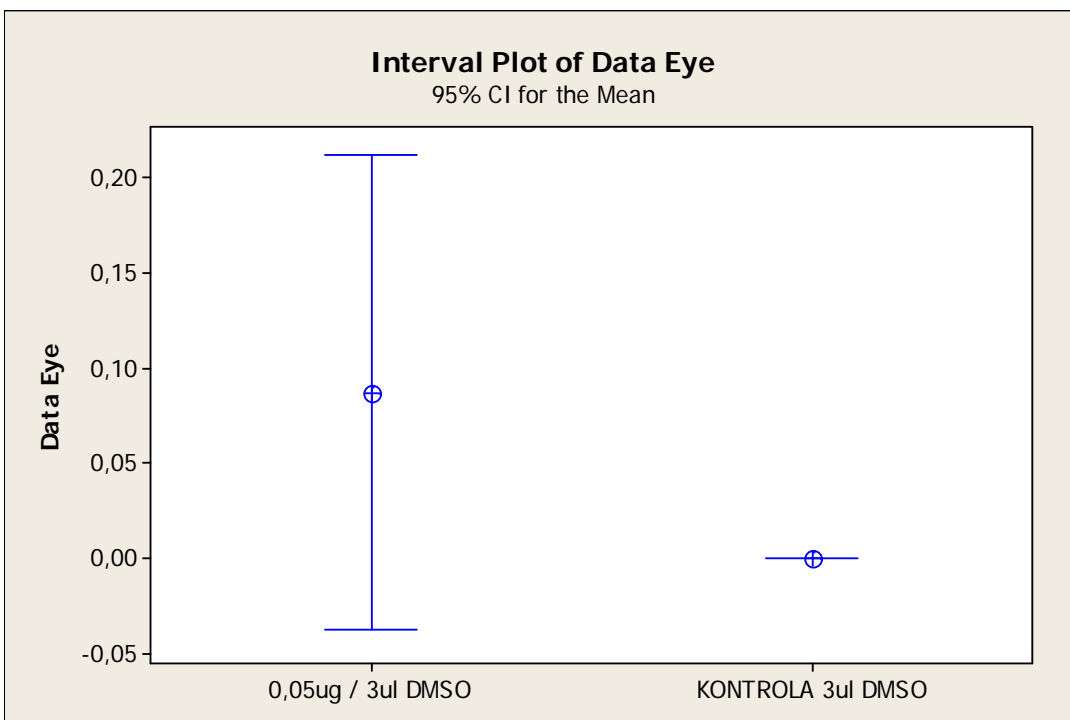
č.zárod. HH stg	Dose of		Body Weight	Number of		Malform	CNS	Eye	Face	Body Wall	Limbs	Rump	Heart	IUGR	
	M.	Solvent		Dead											
48	24	Kontroly	DMSO	1740			N	N	N	N	N	N	N		
49	24	3 $\mu$ l		1830			N	N	N	N	N	N	N		
50	22			1220		X	N	N	N	XX	N	X	N	X	
51	22			1320			N	N	N	N	N	N	N		
52	22			1460			N	N	N	N	N	N	N		
81M	22			1440			N	N	N	N	N	N	N		
82F	24			1380			N	N	N	N	N	N	N		
83F	24			1380			N	N	N	N	N	N	N		
84M	24			1880			N	N	N	N	N	N	N		
105M	25			1790		X	N	N	N	X	N	SCR	N		
106	25			-		X									
107F	27			1510		X	N	N	X	X	N	N	N		
108F	24			1383			N	N	N	N	N	N	N		
109F	24			1450		X	N	N	N	XX	N	N	N		
110 F	22			871		X	X	N	N	XX	N	N	N	X	
111F	24			1650			N	N	N	N	N	N	N		
112M	24			1139		X	N	N	N	XX	N	SCR	N		
113	24			-		X									
114M	24			1620		X	N	N	N	X	N	N	N		
138F	23			1408		X	N	N	N	X	N	N	N		
139F	24			-		X				X		SCR	defekt septa petechie		
140F	24			1608		X	N	N	N	X	N	N	velké		
141F	23			1430		X	N	N	N	X	N	N	velké		
142F	24			1436		X	N	N	N	X	N	N	N		
143F	24			1442			N	N	N	N	N	N	N		
144F	24			1627		X	N	N	N	X	N	N	N		
n=26				1478,87		2/26	13/26	1/26	0	1/26	13/26	0	3/26	3/26	2/26
proporce				±229,36		0,08695652	0,5	0,0385	0	0,03846	0,5	0	0,11538	0,1154	0,07692

**Tabulka č.16: Aplikace 3 $\mu$ l destilované vody jako kontrola**

č.zárod. HH stg	Dose of		Body Weight	Number of		Malform	CNS	Eye	Face	Body WALL	Limbs	Rump	Heart	IUGR
	M.	Solvent		Dead										
145M	25	KONTOLA		1755		X	N	N	N	N	N	SCR	N	
146M	24	3 $\mu$ l destil.		1530		X	N	N	N	XX	N	N	N	
147M	25	vody		1690		X	N	N	N	X	N	SCR	X	
148F	25			1583		X	N	N	N	X	N	SCR	N	
149M	24			1612			N	N	N	X	N	N	N	
150M	24			1370			N	N	N	N	N	N	N	
n=6				1590		0	4/6	0	0	4/6	0	3/6	1/6	
proporce				±133,98		0	0,66	0	0	0	0	0,5	0,16	

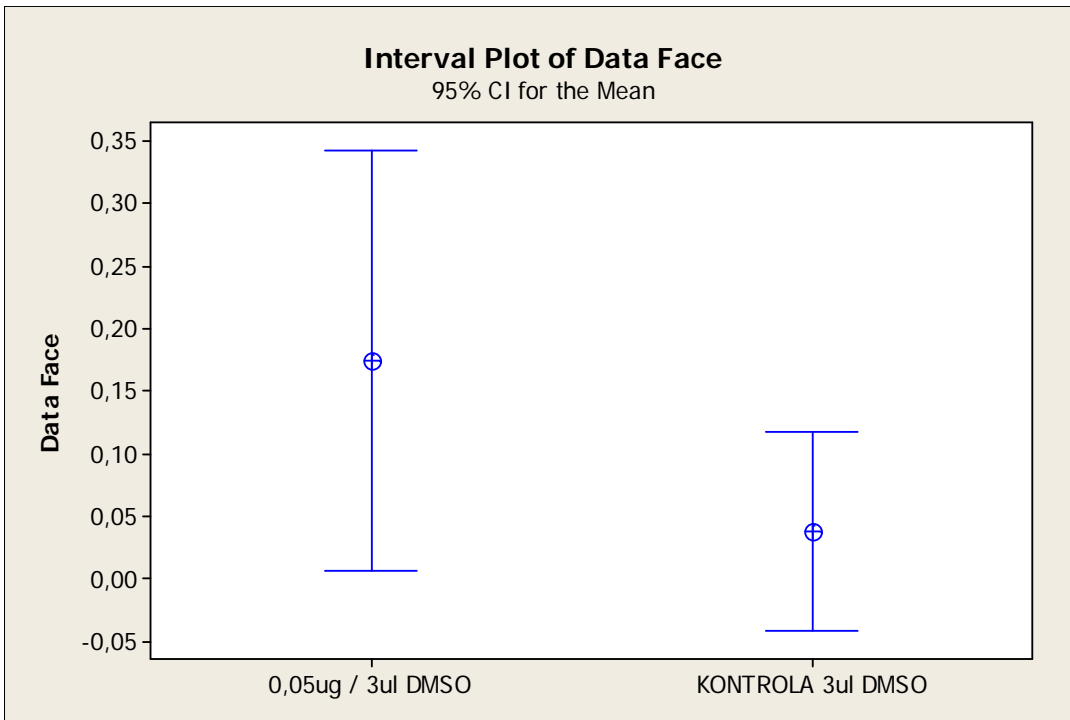


**Graf č. 5: Diagram aritmetického průměru s 95% intervalem spolehlivosti pro malformace CNS**

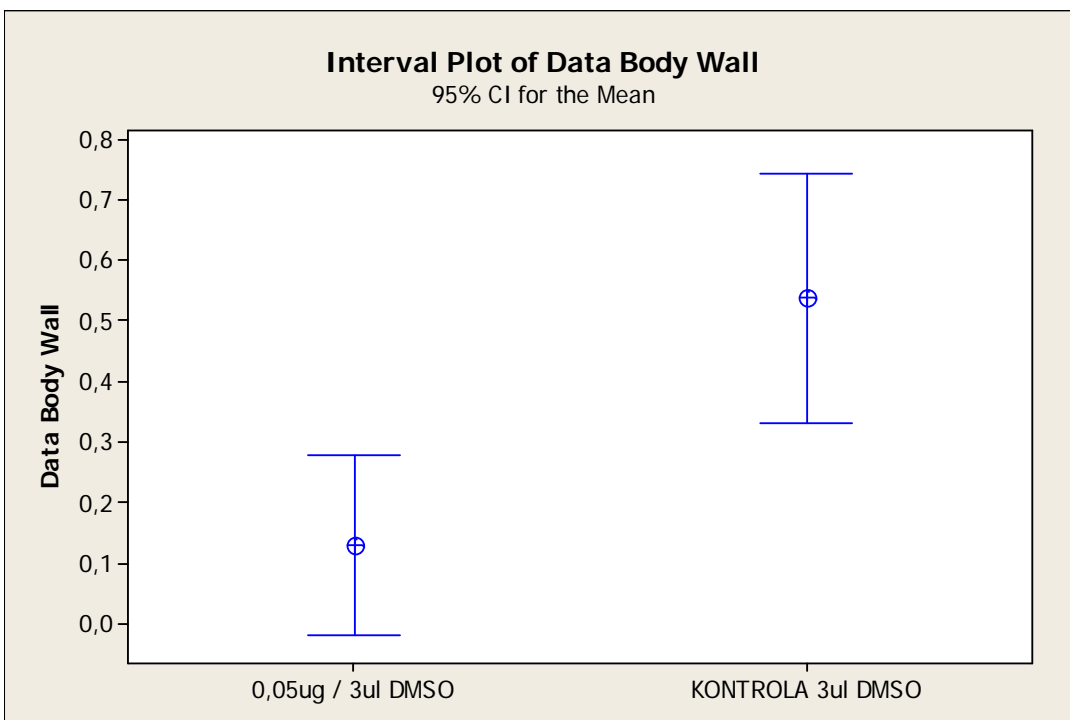


**Graf č. 6: Diagram aritmetického průměru s 95% intervalem spolehlivosti pro malformace oka**

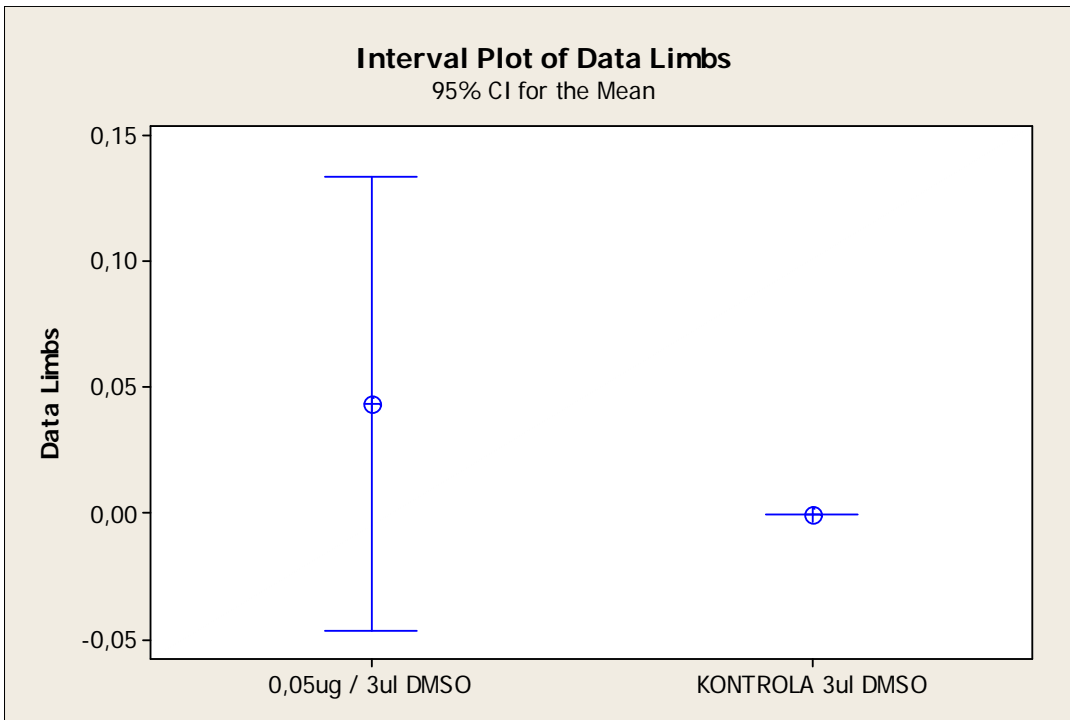




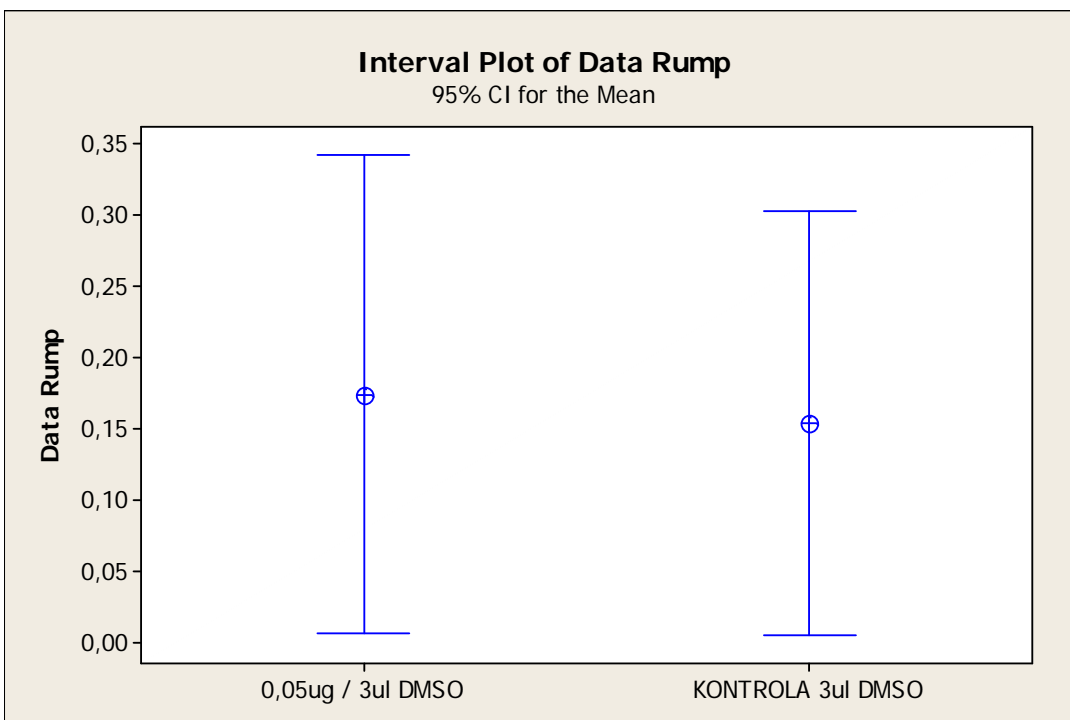
**Graf č. 7: Diagram aritmetického průměru s 95% intervalem spolehlivosti pro malformace obličeje**



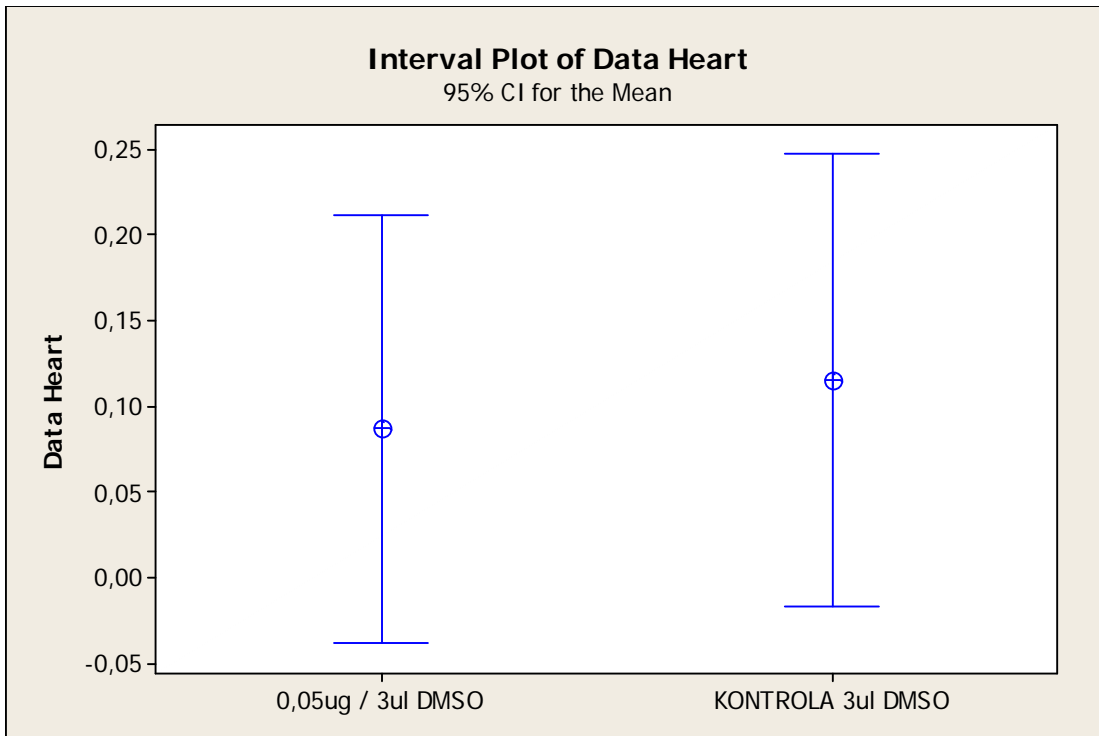
**Graf č. 8: Diagram aritmetického průměru s 95% intervalem spolehlivosti pro malformace tělní stěny**



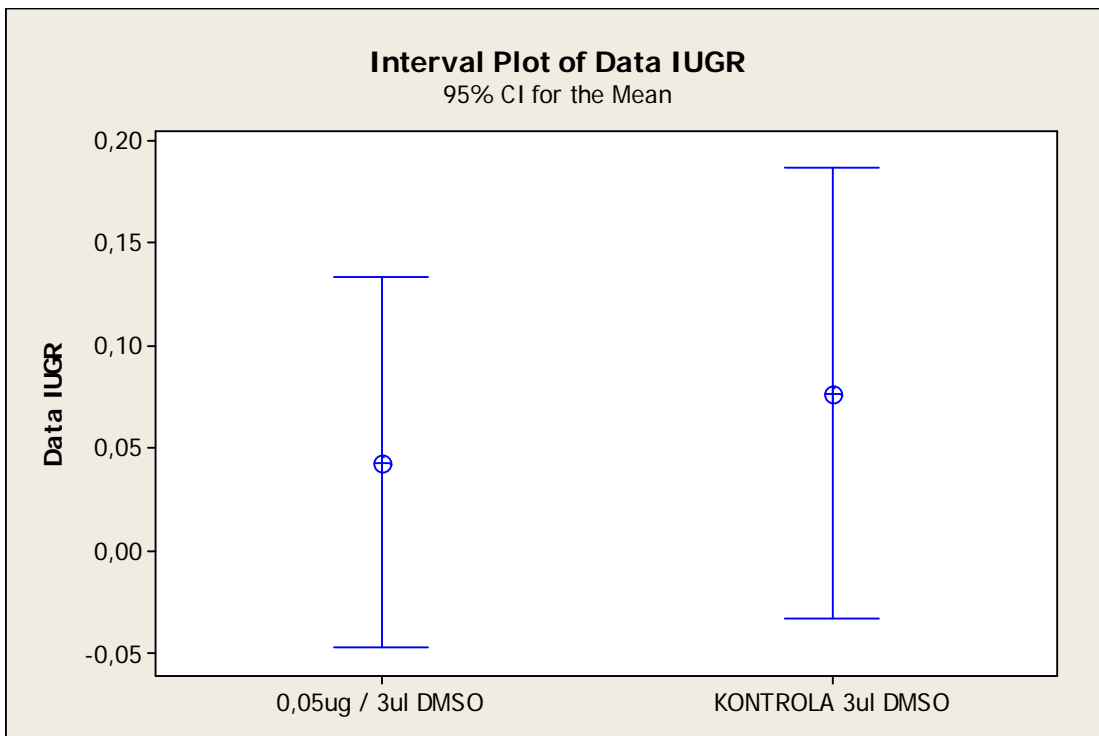
**Graf č. 9: Diagram aritmetického průměru s 95% intervalem spolehlivosti pro malformace končetin**



**Graf č. 10: Diagram aritmetického průměru s 95% intervalem spolehlivosti pro výskyt syndromu kaudální regrese**



**Graf č. 11: Diagram aritmetického průměru s 95% intervalem spolehlivosti pro malformace srdce**



**Graf č. 12: Diagram aritmetického průměru s 95% intervalem spolehlivosti pro výskyt IUGR**