

Univerzita Karlova v Praze
1. lékařská fakulta
Anatomický ústav

DIZERTAČNÍ PRÁCE



MECHANISMY VÝVOJE KREVNÍCH CÉV V ŽABERNÍ OBLASTI

Mgr. Hana Kolesová

Vedoucí dizertační práce: Prof. MUDr. Miloš Grim, DrSc.
Obor: Vývojová biologie

Obsah

1	Summary	1
1.1	Aortic arches development in the course of <i>Pelobates fuscus</i> metamorphosis	1
1.2	Influence of Sonic hedgehog (Shh) onto the blood vessel development in the branchial arches region	1
2	Souhrn	3
2.1	Vývoj aortálních oblouků u <i>Pelobates fuscus</i>	3
2.2	Vliv Sonic hedgehog na vývoj cév žaberní oblasti	3
3	Úvod	5
3.1	Vývoj aortálních oblouků v průběhu metamorfózy <i>Pelobates fuscus</i>	5
3.1.1	Fylogenetický vývoj žaberní oblasti	5
3.1.2	Vývoj aortálních oblouků	6
3.2	Vývoj aortálních oblouků a dalších cév žaberní oblasti u ptačích embryí	6
3.2.1	Žaberní oblouky	6
3.2.2	Vývoj cév žaberní oblasti	6
3.2.3	Aortální oblouky a další cévy žaberní oblasti	7
3.2.4	Mechanismy vzniku cév	8
3.2.5	Vliv Shh na vývoj žaberních oblouků	8
3.2.6	Sonic hedgehog	9
3.2.7	Signální kaskáda Sonic hedgehog	10
4	Cíle dizertační práce	12
5	Materiál a metody	13
5.1	Modelové organismy	13
5.2	Metody použité při studiu <i>Pelobates fuscus</i>	13
5.2.1	Korozivní nástřik cévního systému	13
5.2.2	Rastrovací elektronová mikroskopie	14
5.3	Metody použité při studiu ptačích embryí	14
5.3.1	Immunohistochemie a katalytická histochemie	15

5.3.2	mRNA <i>in situ</i> hybridizace	16
5.3.3	Nástřík cévního systému tuší	17
5.3.4	Kultivace hybridomových buněk 5E1, 12cA5 a QT6 fibroblastů a jejich příprava pro aplikaci do embryí	17
5.3.5	Inhibice Shh pomocí anti-Shh (5E1) protilátky	18
5.3.6	Inhibice Shh pomocí cyclopaminu	19
5.3.7	Kvantifikace změn růstu a diferenciaci po inhibici Shh	19
6	Výsledky	21
6.1	Přestavba aortálních oblouků u <i>Pelobates fuscus</i>	21
6.1.1	Pozdní larvální stádia (50–53 NF)	21
6.1.2	Prometamorfóza (56–58 NF)	25
6.1.3	Metamorfóza (59–66 NF)	28
6.2	Vývoj cév žaberní oblasti u ptačích embryí; analýza vlivu Shh	36
6.2.1	Vývoj cév v oblasti žaberních oblouků	36
6.2.2	Inhibice Shh signalizace pomocí anti-Shh protilátky produkované 5E1 hybridomovými buňkami	36
6.2.3	Malformace cév u Shh inhibovaných embryí	41
6.2.4	Angiogenní buňky a macrophage-like cells u Shh inhibovaných embryí	47
6.2.5	Mechanismus působení Shh na endotelové buňky cévní stěny	53
6.2.6	Malformace cév žaberní oblasti po aplikaci cyclopaminu	57
7	Diskuse	59
7.1	Vývoj aortálních oblouků u <i>Pelobates fuscus</i>	59
7.1.1	Larvální vývoj	59
7.1.2	Metamorfóza	61
7.1.3	Fylogenetický vývoj aortálních oblouků	62
7.2	Vývoj cév žaberní oblasti u ptačích embryí	62
7.2.1	Vliv Shh na nově vznikající cévy	63
7.2.2	Vliv Shh na stabilizaci a přestavbu cév	63
7.2.3	Vliv Shh na apoptózu a proliferaci v oblasti žaberních oblouků	64
7.2.4	Mechanismus Shh působení na cévy	64

8 Závěry	65
8.1 Vývoj aortálních oblouků u <i>Pelobates fuscus</i>	65
8.2 Vliv Shh na vývoj cév žaberní oblasti	65
9 Přílohy	67
9.1 Seznam zkratk	67
9.2 Laboratorní protokoly	68
9.2.1 Immunohistochemie a katalytická histochemie	68
9.2.2 Roztoky pro imunohistochemii	73
9.2.3 Roztoky a chemikálie pro přípravu sond a ISH	77
10 Reference	81
11 Publikace	89

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat zejména manželovi a rodičům za podporu během studia a prof. MUDr. Miloši Grimovi, DrSc. z Anatomického ústavu 1. lékařské fakulty UK za vedení doktorandského studia a možnost pracovat v jeho laboratoři.

Dále bych chtěla poděkovat prof. Henku Roelinkovi z Department of Molecular and Cell Biology, University of California at Berkeley, California, USA za možnost spolupráce na projektu vlivu Shh na vývoj cévního systému a možnost pracovat jeden rok v jeho laboratoři na University of Washington, Seattle, USA. Dále prof. RNDr. Zbyňku Ročkovi, DrSc. z katedry zoologie Přírodovědecké fakulty UK a prof. Aloisu Lametschwandtnerovi z Institut für Zoologie Universität Salzburg, Rakousko za možnost spolupráce na problematice vývoje cévního systému u *Pelobates fuscus*.

Za technickou spolupráci a podporu v laboratoři bych chtěla poděkovat paní Evě Kluzákové, Mgr. Markétě Pleschnerové, Mgr. Michalu Tůmovi a Mgr. Aleně Kvasilové.

Hybridomové buňky a plasmid pro přípravu *ptc1* sondy na hybridizaci in situ mi laskavě poskytl prof. Henk Roelink, protilátku VEGFR2 prof. Anne Eichmann.

Grantová podpora

Podpořeno Výzkumným záměrem 0021620806 Ministerstva školství mládeže a tělovýchovy České republiky (Miloš Grim), Grantovou agenturou Univerzity Karlovy: GAUK 54/203209 (Hana Kolesová) a grantem National Institutes of Health: NIH-1R01HD042307 (Henk Roelink).

Prohlašuji, že jsem dizertační práci vypracovala samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů. Souhlasím se zapůjčováním práce.

V Praze dne 29. července 2008

Mgr. Hana Kolesová

1 Summary

1.1 Aortic arches development in the course of *Pelobates fuscus* metamorphosis

Larval development of Spade-foot Toad *Pelobates fuscus* (Amphibia, Anura) is modified compared to tetrapod ancestors. However, it is still possible from its metamorphosis to reconstruct changes, which have occurred during the transition of vertebrates onto the dry land. Transformations of aortic arches during the metamorphosis have been studied by the corrosion casting of the vascular system with Mercox. Corrosion casts were subsequently studied with a scanning electron microscope.

Aim of this study is to compare development of aortic arches of *Pelobates fuscus* with other anuran species and contribute to the findings about the transformation of the aortic arches during the transition of the vertebrates onto the dry land.

Aortic arches, which in larval period supply the gills, are considerably transformed due to the reduction of the gills and transition on the breathing of atmospheric oxygen. Aortic arches are in *Pelobates* suddenly transformed after a long period of gradual preparation and reduction of gill blood vessels. Among main changes occurring during the metamorphosis, belong disappearance of *ductus Botalli*, which cause the direct shunting of the blood to the lungs and skin. Further *ductus caroticus* is reduced. Also the fifth aortic arch disappears as it loses its function and yield to the developing breathing muscle of the adult frog. The fourth aortic arch becomes the main blood stem for the body, as it is the only arch not losing connection to the dorsal aorta. Lungs of *Pelobates* are well developed even in stages when they do not participate on the air breathing.

It is probable that vertebrates were already preadapted to the transition onto the dry land and have i.e. lungs well developed. Therefore we assume that the final transformation occurred relatively fast as in the course of *Pelobates* metamorphosis. It is supposed that the branching pattern of the aortic arches of permanently water-dwelling piscine ancestors and of primitive tetrapods capable of spending longer periods on land, had been similar as in the *Pelobates* premetamorphic or metamorphosing larvae. Their *ductus caroticus* and *ductus Botalli* were not interrupted, the fifth aortic arch was still complete and these structures have reduced after the longer period spends on the dry land.

1.2 Influence of Sonic hedgehog (Shh) onto the blood vessel development in the branchial arches region

Branchial arches region and its blood vessels are extensively transformed in the embryonic development. Aim of this study is to investigate mechanisms of the branchial arches region development and to study which way a morphogen Sonic

hedgehog (Shh) participate on the formation and remodeling of branchial arches and their blood vessels. Influence of Shh was evaluated based on the changes caused by its inhibition *in vivo*. Shh function was inhibited with an anti-Shh antibody, which was produced to the embryo from the applied hybridoma cells. Shh signaling cascade was also inhibited by cyclopamine.

Results show that Shh is important for *de novo* formation of the blood vessels in the branchial arches region. Further Shh is necessary for stabilization of the vessel wall, mainly for anterior cardinal vein. Shh also affects later vessel development and transformation, which includes i.e. fusion of the dorsal aorta, branching of the internal carotid artery and outflow tract development. Short time inhibition of Shh has minor effect on the apoptosis and proliferation activity of the branchial arches region mesenchymal cells. We assume that Shh signals directly to the blood vessels endothelial cells, as Shh receptor *ptc1* is also expressed in endothelial cells and its signal is reduced with Shh inhibition. In studied stages Shh does not affect distribution of the smooth muscle cells in the vessel wall or the expression of the vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR). Morphogen Shh is therefore one of the important factors, which affect not only formation of luminized vessels, but also their stability and remodeling in the region of branchial arches.

2 Souhrn

2.1 Vývoj aortálních oblouků u *Pelobates fuscus*

Ačkoliv je larvální vývoj *Pelobates fuscus* (Amphibia, Anura) modifikován oproti situaci rybích předků tetrapod, je možné studiem metamorfózy *Pelobates* rekonstruovat změny, které se odehrály při přechodu obratlovců na souš. Přestavbu aortálních oblouků v průběhu metamorfózy *Pelobates fuscus* jsme studovali pomocí metody korozivního nástřiku cévního systému Mercoxem a jeho pozorováním elektronovým rastrovacím mikroskopem. Cílem bylo porovnat výsledky s nálezy u dalších druhů a přispět k souboru poznatků o přestavbě aortálních oblouků při přechodu obratlovců na souš.

Aortální oblouky, které v larválních stádiích zásobují žábry krví, se spolu se zánikem žaber a přechodem na dýchání vzdušného kyslíku, radikálně transformují. Tato transformace je u *Pelobates* velmi rychlá a předchází ji dlouhá doba postupné přípravy a pozvolné redukce žaberních cév. Transformace aortálních oblouků zahrnuje zánik *ductus Botalli*, který umožní přímé vedení krve do plic a kůže. Dále zaniká také *ductus caroticus* a tím i přímé zásobování hlavy a krku. V průběhu metamorfózy také zaniká V. aortální oblouk, který ztratil svoji původní funkci a ustupuje vznikajícímu dýchacímu svalu dospělých žab. Hlavním kmenem pro rozvod krve do těla se tak stává IV. aortální oblouk, který jako jediný neztrácí napojení na *aorta dorsalis*. U *Pelobates* se vyvíjejí plíce a jejich cévy ještě ve stádiích, kdy plíce neslouží k dýchání vzdušného kyslíku.

Je pravděpodobné, že obratlovci při přechodu na souš již byli na změnu dýchání připraveni (měli např. vytvořené plíce) a vlastní změna dýchání tak proběhla poměrně rychle, podobně jako při metamorfóze *Pelobates*. Způsob větvení aortálních oblouků u vodních rybích předků tetrapod, jejich přechodných forem, které občas vodu opouštěly a původních tetrapod, kteří mohli žít delší dobu na souši byl pravděpodobně podobný jako u larev *Pelobates* v průběhu metamorfózy. *Ductus Botalli*, *ductus caroticus* a V. aortální oblouk byly u nich pravděpodobně vytvořeny a k jejich redukci došlo až při dlouhodobějšímu pobytu na souši.

2.2 Vliv Sonic hedgehog na vývoj cév žaberní oblasti

Žaberní oblast a její cévy prochází v embryonálním vývoji rozsáhlou přestavbou, která odráží také její fylogenetický vývoj. Studovali jsme mechanismy vývoje žaberní oblasti, abychom zjistili, jak se známý morfogen Sonic hedgehog (Shh) podílí na formování a přestavbě této oblasti a jejích cév. Význam Shh pro vývoj žaberní oblasti jsme posuzovali podle změn, které vyvolala jeho inhibice. Funkci Shh jsme u ptačích embryí krátkodobě inhibovali pomocí anti-Shh protilátky produkované do embrya *in vivo* hybridomovými buňkami 5E1; dále jsme Shh signální kaskádu inhibovali pomocí cyclopaminu.

Výsledky ukazují, že Shh je nutný pro tvorbu *de novo* vznikajících cév v oblasti žaberních oblouků; dále také pro stabilitu cévní stěny, hlavně u *vena cardinalis anterior*. Shh ovlivňuje i další vývoj a přestavbu cév, jakou je například fúze *aorta dorsalis*, větvení *arteria carotis interna* a vývoj výtokového traktu srdečního.

Shh nemá při krátkodobé inhibici vliv na proliferační aktivitu a apoptózu v mesenchymu žaberní oblasti. Domníváme se, že Shh ovlivňuje endotel krevních cév přímo, protože jeho receptor *ptc1* je exprimován v endotelových buňkách a při inhibici Shh exprese *ptc1* klesá. Zjistili jsme, že Shh neovlivňuje distribuci hladkých svalových buněk ve stěně cév a neovlivňuje ani expresi receptoru růstového faktoru krevních cév (VEGFR2). Morfogen Shh je tedy jedním z faktorů, který ovlivňuje nejen vznik nových cév v žaberní oblasti, ale i jejich stabilitu a následný vývoj.

3 Úvod

Přestavba aortálních oblouků je zajímavé a tradiční téma vývojové a evoluční biologie. V průběhu metamorfózy obojživelníků dochází v souvislosti se změnou dýchání z žaberního na plicní k rozsáhlé přestavbě žaberního aparátu a jeho cév – aortálních oblouků. Toto období odráží evoluční proces přechodu obratlovců na souš. Také v embryonálním vývoji ptačích embryí existuje období, kdy embrya svojí stavbou připomínají vývoj anamniot. Embrya mají vytvořeny žaberní oblouky, které procházejí rozsáhlou přestavbou a odráží tak vývoj žaber a žaberních oblouků u ryb a obojživelníků. Proto je i přestavba cév v období metamorfózy obojživelníků a embryonální vývoj cév ptačích embryí do určité míry podobný a odráží i fylogenetický vývoj obratlovců. Ptačí embrya mají významnou přednost, protože období celého embryonálního vývoje je ve vajíčku snadno dostupné, a je tedy možné sledovat vývojové mechanismy cévního systému na molekulární úrovni.

3.1 Vývoj aortálních oblouků v průběhu metamorfózy *Pellobates fuscus*

3.1.1 Fylogenetický vývoj žaberní oblasti

Přechod obratlovců na souš v devonu před 360 miliony let doprovázela i výrazná změna fyziologie a anatomie obratlovců. U vodních předků tetrapodů došlo k výrazné změně dýchání. Z dýchání kyslíku rozpuštěného ve vodě pomocí žaber, přešli obratlovci na dýchání vzdušného kyslíku plicemi. Díky tomu opěrný aparát žaber – žaberní oblouky, začal procházet rozsáhlou přestavbou a získal nové funkce. Při přestavbě žaberních oblouků část jejich kostěných elementů zanikla, redukovala se nebo se naopak spojila a získala novou funkci (Moy-Thomas & Miles, 1971; Jarvik, 1980). První žaberní oblouk tvoří čelisti, druhý přetrvává ve formě jazyčky, na kterou se upínají svaly spodiny dutiny ústní a ve formě sluchové kůstky. Dalším žaberním obloukům se pozastavila osifikace a podílejí se na tvorbě hrtanových chrupavek. Žaberní štěrby zanikly s výjimkou spirakula, tj. první žaberní štěrby mezi I. a II. žaberním obloukem. Zánik žaber doprovázel vznik plic, které se přetvořily z plynového měchýře devonských předků obratlovců. Část této transformace lze vysledovat ve fosilních nálezech, např. vznik *collumela auris* (Clack, 1994, 1998; Clack et al. 2003; Brazeau & Ahlberg, 2006). Většinu těchto fylogenetických transformací ale můžeme lépe studovat u larválních nebo embryonálních stádií současných obratlovců.

Metamorfóza obojživelníků z vodní larvy (pulce) na vzduch dýchající žabu do určité míry odráží fylogenetický proces přechodu obratlovců na souš. Dochází k rozsáhlým změnám přestavby žaberního aparátu (např. Roček 2003). Tuto změnu doprovází i přestavba aortálních oblouků a dalších měkkých tkání, které není možné studovat z fosilií.

3.1.2 Vývoj aortálních oblouků

Aortální oblouky jsou cévy, které prochází a zásobují jednotlivé žaberní oblouky. Z larválních aortálních oblouků, které jsou přerušeny žábrami, se během metamorfózy stávají plynulé aortální oblouky. Čtyři aortální oblouky, které zásobují žábry, během metamorfózy zanikají a stávají se součástí *arteria carotis interna*, oblouku aorty a *arteria pulmonalis*. Obecně se tedy aortální oblouky, které u larev spíše připomínají situaci u ryb, změni do uspořádání podobné amniotům a odráží tak situaci přechodu obratlovců na souš.

Vývojem aortálních oblouků žab se zabývalo jen málo autorů. Většina prací se zabývá vývojem u *Xenopus laevis*, který je běžnou laboratorní žabou. Aortální oblouky u *Xenopus* studovali např. Millard (1945, 1942), Nikitin (1925), Nieukoop a Faber (1956). Cévní systém *Xenopus* je ale velmi odlišný od cévního systému *Pelobates* a i ostatních moderních žab (viz dále). Několik dalších autorů (např. Strawinski, 1956; Witschi, 1956; De Saint-Aubain, 1985; Magnin, 1959; Lanot, 1962) se zabývali vývojem aortálních oblouků u *Rana* případně *Bufo*. Znalosti o této problematice jsou ale spíše útržkovité. Aortálními oblouky u dospělé *Pelobates* se zabýval jen Szarski (1937). Obecně platí, že stavba aortálních oblouků je lépe prozkoumána u dospělců. Podrobnější studie o vývoji aortálních oblouků moderních žab v embryogenezi, v larválních stádiích a ani během metamorfózy není zpracována.

3.2 Vývoj aortálních oblouků a dalších cév žaberní oblasti u ptačích embryí

3.2.1 Žaberní oblouky

Žaberní oblouky jsou u ptačího embrya pouze přechodnou strukturou vytvořenou přibližně mezi stádií 12–26 HH (Hamburger a Hamilton, 1951). Žaberní oblouky se v embryogenezi zakládají jako párové váčky, které jsou z laterální strany ohraničeny výchlípkou ektodermu a z mediální strany výchlípkou entodermu trávicí trubice. Na vnějším povrchu jsou tedy žaberní oblouky pokryty ektodermem, na vnitřní straně entodermem a jejich vlastní hmota vzniká z mesenchymových buněk neurální lišty a z buněk paraaxiálního mezodermu. Mezi žaberními oblouky obou stran je dutina embryonálního hltanu (žaberní dutina). Endotelové buňky a buňky příčně pruhovaných svalů vznikají z paraaxiálního mezodermu. Ostatní tkáň žaberních oblouků, jako např. chrupavka a kost, pochází z neurální lišty (Evans a Noden, 2006).

3.2.2 Vývoj cév žaberní oblasti

Cévy žaberní oblasti prochází stejným vývojem jako cévy v dalších částech embrya. Embryonální cévy vznikají *de novo* z angioblastů procesem zvaným vaskulogeneze

(Pardanaud et al., 1989; Christ et al., 1991; Risau a Flamme, 1995). Angioblasty vznikají nezávisle v několika oblastech paraaxiálního mezodermu (von Kirschhofer et al., 1994; Pouget et al., 2006) ale i extraembryonálně (Flamme, 1989). Předpokládá se, že endotelové buňky vznikají ze stejného prekursoru jako krevní buňky, tzv. hemangioblastu (Pardanaud a Dieterlen-Lievre, 1993).

V žaberní oblasti se v mesenchymu okolo přední části střeva vytvoří provazce angioblastů, ve kterých se postupně vytvoří cévní lumen. První intraembryonální cévou je nejprve párová *aorta dorsalis*. V dalším vývoji endotelové buňky těchto cév proliferují a vytvářejí pupeny, které se následně luminizují. Tento proces vzniku nových cév z již existujících se nazývá angiogeneze (Pardanaud et al., 1989) a je znám i z dalších embryonálních oblastí (Brand-Saberi et al., 1995).

Cévní trubice jsou tvořeny pouze endotelovou vrstvou, ke které se postupně přidává vrstva hladké svaloviny. Endotelová výstelka cév žaberní oblasti pochází z buněk nesegmentovaného hlavového paraaxiálního mezodermu (Noden a Trainor, 2005; Evans a Noden, 2006). Hladké svalové buňky pochází z několika různých zdrojů. Například je známo, že hladká svalovina cévní stěny v *aorta dorsalis* pochází ze sklerotomu (Wiegrefe et al., 2007), ale pravděpodobně také z myotomu (Esner et al., 2006). Hladké svalové buňky aortálních oblouků pochází z buněk neurální lišty (Le Lievre a Le Douarin, 1975).

3.2.3 Aortální oblouky a další cévy žaberní oblasti

Hlavními cévami v oblasti hlavy a žaberních oblouků jsou výtokový trakt srdeční, který přímo navazuje na srdce a postupně přechází do *aorta ventralis*. Z *aorta ventralis* odstupují jednotlivé aortální oblouky, které prochází příslušným žaberním obloukem. Aortální oblouky se pak napojují na *aorta dorsalis*. V námi studovaných stádiích (15–23 HH) (Hamburger a Hamilton, 1951) všechny cévy žaberní oblasti prochází rozsáhlou přestavbou. Ve stádiu 15 HH kaudální části *aorta dorsalis* fúzí a tvoří nepárovou sestupnou *aorta dorsalis* a v hlavové oblasti z nich vzniká *arteria carotis interna*. Kraniální pokračování *aorta ventralis* po odstupu aortálních oblouků tvoří *arteria carotis externa*. Aortální oblouky (I–VI) se vytvářejí postupně a v kranio-kaudálním gradientu (Hiruma a Hirakow, 1995) od stádia 12 do stádia 23 HH. U ryb a obojživelníků většina aortálních oblouků zásobuje kreví žábry na žaberních obloucích. U amniot žábry zanikly, a proto žaberní i aortální oblouky přejímají novou funkci a stávají se součástí hlavy krku a krčních a hlavových cév.

První, druhý a pátý aortální oblouk zanikají přibližně od stádia 21 HH. Třetí, čtvrtý a šestý aortální oblouk se postupně přestavují a získávají novou funkci. Třetí aortální oblouk se stává součástí *arteria carotis communis* a *arteria carotis interna*. Čtvrtý aortální oblouk vytváří *arcus aortae*. U ptáků přetrvává do dospělosti pouze pravý *arcus aortae* a levá část čtvrtého aortálního oblouku se podílí na stěně *arteria subclavia*. Šestý aortální oblouk tvoří *arteria pulmonalis* a vede krev do plic.

Hlavními žilami v oblasti hlavy a žaberních oblouků jsou párové *venae cardinales anteriores*, které vedou krev z hlavy a krku do srdce přes *vena cardinalis communis*. *Vena cardinalis anterior* se vyvíjí ve stádiu 12 HH a až v pozdním embryonálním období z ní vzniká *vena cava superior*.

3.2.4 Mechanismy vzniku cév

V naší práci jsme se zabývali mechanismy, které se podílejí na tvorbě a přestavbě cév žaberní oblasti. Mechanismy, které řídí vznik a vývoj prvních embryonálních cév, nejsou dosud úplně objasněny, přesto že se již dlouho intenzivně studují.

Jedním z faktorů, které kontrolují vývoj, cév jsou pravděpodobně morfogeny vznikající v entodermu. Už jedny z prvních prací o vývoji cév ukázaly, že entoderm produkuje signály, které indukují vznik cév a angiogenních buněk v okolním mezodermu (Pardanaud et al., 1989). Další pokusy upřesňovaly vliv entodermu na vývoj a indukcí cév a zjistily, že entoderm není nutný jen na primární indukci vznikajících cév, ale podílí se i na správném formování endotelových trubic (Vokes a Krieg, 2002). Mezi první intraembryonální cévy, které se vyvíjí pod vlivem entodermu, patří cévy žaberní oblasti.

Později se u Smo nulových myších mutant prokázalo, že Hedgehog je jednou z molekul, která indukcí cév entodermem zprostředkovává (Byrd et al., 2002). V dalších pokusech bylo zjištěno, že Shh (Sonic hedgehog) je nutný pro fúzi *aorta dorsalis* (Nagase et al., 2006). V současnosti se ukazuje, že Shh může indukovat v mesenchymu okolo cév angiogenní faktory jako VEGF a angiopietiny (Pola et al., 2001). Jejich prostřednictvím tak může Shh ovlivňovat distribuci hladkých svalových buněk ve stěně cévy, její stabilizaci a další vývoj (van Tuyl et al., 2007). Je však nutné konstatovat, že mechanismus vlivu Shh na tvorbu cév není objasněn. Jednou z cest řešení této otázky je sledovat jednotlivé složky signální kaskády Shh a jejich případnou expresi v angiogenních a endotelových buňkách.

3.2.5 Vliv Shh na vývoj žaberních oblouků

Jednou z funkcí Shh je i vliv na vývoj žaberních oblouků. *Shh* nulové mutantní myši mají první žaberní oblouk špatně vytvořený a spojený ve střední čáře (Yamagishi et al., 2006). Druhý a třetí žaberní oblouk je redukován a čtvrtý a šestý žaberní oblouk se dokonce vůbec nevyvíjí (Smoak et al., 2005). Podle pozorování (Ahlgren a Bronner-Fraser, 1999; Jeong et al., 2004) jsou mesenchymové buňky žaberních oblouků stimulovány k proliferaci a chráněny od apoptózy pomocí Shh.

V naší práci jsme se rozhodli spojit poznatky o vlivu Shh na vývoj cév a na vývoj žaberní oblasti. Vyvinuli jsme metodu, kterou je možné lokálně inhibovat funkci Shh a tím i studovat jeho vliv na pozdější vývoj cév žaberních oblouků, což není možné u Shh a Smo nulových mutant.

3.2.6 Sonic hedgehog

Sonic hedgehog (Shh) je klíčovou signální molekulou embryonálního vývoje a mimo mozaikovitých informací o jeho působení na cévy a žaberní oblouky, je spíše znám z morfogeneze dalších orgánů.

Hedgehog (Hh) jako signální protein byl objeven u *Drosophila melanogaster*. Jeho nulová mutanta larev *Drosophila* je pokryta ostrými výběžky kutikuly a vypadá tedy jako ježek. U obratlovců byly objeveny tři homology Hedgehog. První dva Hedgehog proteiny byly pojmenovány po dvou druzích amerických ježků: Indian hedgehog (Ihh) a Desert hedgehog (Dhh). Třetí objevený Sonic hedgehog (Shh) byl pojmenován podle populární postavy z kreslených amerických seriálů (Riddle et al., 1993).

Sonic hedgehog má ze všech tří homologů Hh u obratlovců nejvíce funkcí, z nichž uvádíme jen některé. Nejvíce je prozkoumán jeho vliv na vývoj ventrální části nervové trubice a indukci motoneuronů (Roelink et al., 1995; Poh et al., 2002). Velmi ranou funkcí Shh je formování pravo-levé tělní asymetrie. Koordinovaný pohyb cílů v Hensenově uzlíku vytváří proud, který určí expresi Shh v levé polovině těla (Nonaka et al., 2005). Expresie Shh na levé straně aktivuje celou kaskádu genů, které nakonec určí pravo-levou asymetrii těla (Rodriguez Esteban et al., 1999; Yokouchi et al., 1999). Dále je Shh produkovaný chordou nutný pro vývoj somitů, například indukuje tvorbu chrupavky budoucích obratlů v mediální části somitu (Fan a Tessier-Lavigne, 1994; Johnson et al., 1994). Shh je také nutný pro vytvoření antero-posteriorní osy končetiny. Shh je produkován na posteriorní straně končetinového pupenu v zóně polarizační aktivity (ZPA), která zodpovídá za vývoj a polarizaci končetiny (Saunders a Gasseling, 1963; Tickle et al., 1975; Riddle et al., 1993). Další důležitou funkcí Shh je řízení vývoje a diferenciaci jednotlivých oddílů střeva. Nejprve je Shh produkován v orální a aborální části střeva, včetně dutiny žaberních oblouků. S postupujícím vývojem se obě části prodlužují, až je nakonec Shh produkován v celém entodermu, i když v různé intenzitě (Roberts et al., 1995). Shh je společně s cévami nutný pro diferenciaci slinivky břišní ze základu střeva (Lammert et al., 2001).

Shh je důležitým morfogenem při mnoha vývojových procesech, a proto při poruchách jeho signalizace dochází k širokému spektru defektů. Nejvýraznější jsou poruchy centrálního nervového systému a hlavy. Známý je například open brain syndrom, který je letální a u embryí má charakteristický fenotyp. Další poruchou Shh signalizace je cyklopie, kdy plod má vytvořeno jen jedno oko, protože oba oční základy splynuly v mediální čáře.

Shh jako významný morfogen embryonálního vývoje se také uplatňuje v některých nádorech. Obecně lze říci, že nádory souvisí do určité míry s funkcí Shh v embryonálním vývoji. Shh je častý v primárních nádorech mozku a mozečku (medulloblastomas) (Corcoran a Scott, 2001). Shh je například produkován nádorech trávicího traktu a i pankreatu, kde má i vliv na cévní zásobení nádoru

(Yamazaki et al., 2008). Dále je Shh například v kožních karcinomech (basal-cell carcinomas) (Lupi, 2007).

3.2.7 Signální kaskáda Sonic hedgehog

Signalizace Shh a ostatních Hedgehog (Hh) proteinů je složitý proces ovlivněný řadou faktorů a tedy přístupný zásahům na mnoha různých úrovních. Uvádím zde jen stručný přehled Hedgehog a také Shh signální kaskády.

Hh proteiny signalizují v short-range signalling, to znamená, že signál je schopen se přenést přibližně přes 12 buněk, tedy několik desítek mikrometrů (McMahon et al., 2003). Protein tvoří ve tkáni strmý gradient, kde největší koncentrace Shh je v okolí produkujících buněk a nejmenší u buněk nejvíce vzdálených.

Gradient vzniká nejen intenzitou produkce Shh, ale i jeho schopností pronikat tkání a jeho odbouráváním z tkáně. Pro mechanismus prostupu Hh tkání jsou pravděpodobně důležité jeho lipidové modifikace, kdy palmitát a cholesterol jsou vázány na N a C konec Hh proteinu v průběhu maturace v sekrečních váčcích (McMahon et al., 2003)

Přesný mechanismus prostupu Hh tkání není zatím zcela znám a uvažuje se o několika variantách. První z nich je transport Hh ve formě multimerů, kdy Shh vázaný v multimeru je 50-krát výkonnější k aktivaci biologické odpovědi (Tian et al., 2004). Další možností je vazba Shh na buňku a jeho transport tkání pomocí transcytózy. Poslední možností je pohyb volného Shh mezibuněčným prostorem, vazbou na extracelulární matrix a jeho rychlá internalizace buňkou (Koziel et al., 2004). Za velmi pravděpodobnou se považuje také kombinace všech tří zmíněných možností přenosu Hh (Hooper a Scott, 2005).

Hedgehog (Hh i Shh) se na cílové buňce váže na transmembránový protein Patched 1 (Ptc1). Ptc1 při chybějícím Hh signálu inhibuje aktivitu dalšího transmembránového proteinu Smoothened (Smo). Přesný mechanismus jejich komunikace ale není zatím znám (Chen a Struhl, 1996). V buňce, která není pod vlivem Hh, je Smo vázán na endozómy, na které se spolu s ním váže mnoho dalších molekul a hlavně transkripční faktory Gli 1–3 a různé kinázy (Eggenchwiler et al., 2001). Bez přítomnosti Hh signálu kinázy fosforylují Gli3 a zatím neznámým mechanismem vytváří jeho neaktivní, kratší formu Gli3 represor (Gli3R). Gli3R se jako transkripční faktor přesouvá do jádra a tam blokuje aktivaci cílových genů Hh kaskády. Alternativní cestou je zadržování aktivní formy Gli3 v cytoplasmě a tím znemožnění aktivace cílových genů (Hooper a Scott, 2005).

Při ovlivnění buňky Hh signálem se Hh váže na Ptc1. Ptc1 díky vazbě Hh přestane blokovat funkci Smo. Smo je aktivován fosforylací kinázami, které jsou vázány na proteinové komplexy, endozómy nebo mikrotubuly. Přiblížení kináz vázaných na tyto struktury zamezí tvorbě GliR a naopak tvoří aktivní formu Gli, která jako transkripční faktor jde do jádra a aktivuje přepis genů cílové odpovědi (Hooper a Scott, 2005).

Intenzita Hh kaskády odpovídá i intenzitě signálu Hh. Hh se uplatňuje v mnoha tkáních jako morfogen, jehož různé koncentrace vyvolávají u cílové buňky různou odpověď. Jedním z mechanismů jimiž Hh aktivuje podle své různé koncentrace různé cílové geny je regulace rovnováhy mezi Gli3 aktivní formou a Gli3 represorem. Tímto způsobem vznikají nejméně tři formy signálu: potlačený, neutrální a aktivovaný, které aktivují různou paletu cílových genů (Muller a Basler, 2000).

Jedním z mechanismů regulace Hh odpovědi je regulace exprese *ptc1*. *Ptc1* je cílovým genem signální kaskády Hh, je vždy aktivován a je tedy výborným markerem probíhající Hh signalizace. Zvýšené množství Ptc1 receptoru při probíhající Hh signalizaci tak pozitivní zpětnou vazbou zvyšuje míru Hh odpovědi (Marigo a Tabin, 1996).

4 Cíle dizertační práce

Cílem práce je přispět k objasnění vývoje a přestavby cév v oblasti žaberních oblouků:

- Technikou korozivního preparátu a elektronové rastrovací mikroskopie přispět k objasnění vývoje a transformace jednotlivých aortálních oblouků u *Pelobates fuscus* v průběhu metamorfózy. Tento druh je evolučně zajímavý jako archetyp v rámci třídy Anura. Dílčím cílem je zjistit do jaké míry si dospělec uchovává larvální a evolučně starobylé struktury a jestli se objevují evolučně nové struktury. Srovnat vývoj *Pelobates* a ostatních obojživelníků. Dále porovnat tento vývoj v evolučních souvislostech u dalších živočichů s důrazem na přechod obratlovců na souš.
- Metodou krátkodobé inhibice Shh studovat význam Sonic hedgehog (Shh) pro vývoj aortálních oblouků a žaberní krajiny ptačích embryí. Zhodnotit vliv Shh na vznik krevních cév v žaberní oblasti, na jejich stabilitu a přestavbu. Posoudit význam Shh pro přežívání a proliferaci buněk tvořící žaberní oblouky. Dílčím cílem je zjistit mechanismus působení Shh na endotel a hladkou svalovinu cévní stěny, posoudit případný vliv dalších morfogenů na formování a přestavbu cév.

5 Materiál a metody

V této kapitole jsou stručně popsány modelové organismy a metodické postupy. Detailní laboratorní protokoly dále uvedených postupů jsou obsaženy v příloze.

5.1 Modelové organismy

Pulci blatnice skvrnité (*Pelobates fuscus*) byli použiti ke studiu přestavby aortálních oblouků. Pulci byli chováni v teráriích na katedře zoologie PřF UK. Celkem jsme zpracovali cévní systém 34 exemplářů ve 13 různých stádiích (od stádia 50 NF do stádia 66 NF). Vývojová stádia pulců se nejčastěji určují podle klasifikace Nieukoop a Faber (1967) (dále jen NF) pro *Xenopus laevis*, proto i my používáme tuto klasifikaci. Při obvyklých teplotách celý proces metamorfózy trvá přibližně 20 dní. K anestezii a usmrcení byl použit 0,03% vodný roztok anestetika pro vodní živočichy MS 222 (Sigma).

Embrya japonské křepelky (*Coturnix coturnix japonica*) byla použita jako experimentální model pro studium vlivu Shh na vývoj cév žaberní oblasti. Pro část studie byla použita **embrya bílé leghornky** (*Gallus gallus domesticus*, var. white leghorn). Zdrojem oplozených křepelčích vajec byl chov Ústavu zemědělské výroby v Uhřetěvsi a B&D Farm v Harrah, Oklahoma, USA. Oplozená kuřecí vejce jsme získávali z chovu Ústavu molekulární genetiky AV ČR v Kolči u Prahy. Křepelčí i slepičí embrya byla inkubována při 38,5 °C po dobu 23–100 hodin a vývojová stádia byla určována podle systému stádií, která pro bílou leghornku vypracovali Hamburger a Hamilton (1951).

5.2 Metody použité při studiu *Pelobates fuscus*

5.2.1 Korozivní nástřik cévního systému

Metoda korozivního nástřiku cévního systému je poměrně nová a pro studium vývoje cév žab byla použita pouze u *Xenopus* (Bartel a Lametschwandtner, 2000) a u *Hyla* (McIndoe a Smith, 1984a,b). Tyto práce se zabývaly hlavně vývojem cévního zásobení žaber, filtračního aparátu a plic. Většina prací o vývoji aortálních oblouků používala metodu rekonstrukce ze seriálních histologických řezů, popřípadě systém aortálních oblouků nastříkávali tuší nebo jinou kontrastní látkou. V této práci používáme metodu korozivního nástřiku směsí metylmetakrylátů – Mercocox (Bartel a Lametschwandtner, 2000). Zhotovený korozivní preparát je vhodný k pozorování pomocí elektronového rastrovacího mikroskopu, který umožní studium větších detailů. Použití této metody při studiu vývoje vlastních aortálních oblouků u žab i *Pelobates fuscus* je ojedinělé.

Pulci *Pelobates* byli uspáni v 0,03% vodném roztoku anestetika pro vodní živočichy MS 222 (Sigma – $C_9H_{11}NO_2 \cdot CH_4SO_3$) a připevněni na preparační misku. Postupně jsme odpreparovali kůži na ventrální straně těla, svaly a perikard a zpřístupnili tak srdce. Pod preparační lupou jsme připravili uzlík z chirurgické nitě okolo *conus arteriosus*, vsunuli pomocí mikromanipulátoru skleněnou kapiláru do tepajícího srdce a upevnili ji uzlíkem v *conus arteriosus*. Poté jsme otevřeli cévní systém rozstřížením obou srdečních síní a začali jsme proplachovat fyziologickým roztokem pro obojživelníky podle Ringera (6,5 g NaCl, 0,14 g KCl a 0,12 g $CaCl_2$ na 1000 g vody). Po vyplavení krve z cév jsme začali aplikovat Mercocox. MERCOX – CL – 2R (Dainippon Ink a Chemicals, Tokyo, Japonsko; Ladd Burlington, Vermont, USA) je směs metakrylátů, která navíc obsahuje červené barvivo. Na zahájení polymerizace je nutné těsně před nástříkem do cévního systému smíchat Mercocox s monomerem metyl metakrylátu v poměru 4:1. Pro pulce *Pelobates* je vhodné množství 4 ml Mercocoxu smíchané s 1 ml monomeru přímo v injekční stříkačce. Na 10 ml monomeru se navíc přidává 0,625 g iniciátoru – paste MA. Mercocox je velmi vhodný na tvorbu korozivních preparátů cévního systému, protože jeho částice jsou dostatečně drobné a při polymerizaci jen nepatrně zmenší svůj objem. Mercocox polymerizuje při nízké teplotě a zachovává svůj tvar v KOH i při pozorování v elektronovém rastrovacím mikroskopu. Nástříknutého pulce jsme ponořili na 24 hodin do 60 °C teplé vodní lázně pro úplné dokončení polymerizace. Pak jsme 24–48 hodin odstraňovali okolní tkáň v 7,5% KOH při 40 °C. U metamorfujících a dospělých žab je ještě vhodné provést dekalifikaci kostních tkání v 5% kyselině mravenčí po dobu 5–15 minut. Tímto postupem jsme získali korozivní preparát (přesný odlitek cévního systému) zbavený všech okolních tkání.

5.2.2 Rastrovací elektronová mikroskopie

Korozivní preparát pulců *Pelobates* jsme dále připravovali pro pozorování elektronovým rastrovacím mikroskopem. Preparáty jsme zbavili zbytkové vody v exikátoru a upevnili je na kovový nosič pomocí koloidního stříbra. Preparát jsme dále uzemnili pomocí několika vodivých měděných můstků, které pomáhají odvádět náboj z velkého preparátu (Bartel a Lametschwandtner, 2000). Nakonec jsme na preparát naprášili tenkou vrstvou zlata. Pozorování jsme prováděli na elektronovém rastrovacím mikroskopu (SEM) katedry zoologie Salzburské university v Rakousku (Stereoscan 250, Cambridge, UK) při napětích 5–10 kV, na SEM Anatomického ústavu 1. LF UK v Praze (Sigma 100) při napětí 20 kV a na SEM Mikrobiologického ústavu AV v Praze.

5.3 Metody použité při studiu ptačích embryí

Po odběru jsme ptačí embrya okamžitě fixovali přes noc při 4 °C. Pro imunohistochemické reakce v kryostatových řezech jsme fixovali 4% paraformaldehydem (PFA), pro parařínové řezy fixačním roztokem dle Serry (Serra, 1946). Embrya pro

in situ hybridizaci v parafínových řezech byla fixována roztokem dle Serry. Embrya pro histochemické znázornění kyselé fosfatázy byla fixována v ledovém acetonu.

Technický postup byl ověřen v řadě předpokusů. Pro vlastní studii pak bylo k hodnocení použito 5–8 embryí pro každé stádium a metodický postup (aplikace 5E1 hybridomových buněk, aplikace kontrolních hybridomových buněk 12cA5, aplikace cyclopaminu, imunohistochemické postupy, postupy katalytické histochemie, mRNA *in situ* hybridizace a nástřik cévního řečiště tuší).

5.3.1 Imunohistochemie a katalytická histochemie

U křepelčích embryí jsme Shh značili v kryostatových řezech pomocí monoklonální protilátky 5E1 (Hybridoma Bank) v ředění 1:500. Jako sekundární protilátku jsme používali goat anti-mouse biotin (Sigma B7264) (1:500) a extravidin značený peroxidázou (Px) (Sigma 2886) (1:100) a diaminobenzidin (DAB) (Sigma, D5905) jako chromogen.

Endotelovou výstelku cévní stěny křepelk jsme značili monoklonální protilátkou QH1 (Hybridoma Bank) v parafínových řezech (1:1000). Jako sekundární protilátku jsme používali goat anti-mouse Px (Sigma A 4416) a DAB pro vizualizaci.

Endotel jsme také značili pomocí monoklonální protilátky proti VEGFR2 (vascular endothelial growth factor receptor 2), kterou jsme získali od A. Eichmann, (Wilting et al., 1997). Supernatant s VEGFR2 protilátkou jsme ředili 1:1 a používali pouze v kryostatových řezech. Pro zesílení signálu bylo nutné použít tyramide signal amplification system (TSA, Dako). Zesílení pomocí tyramidu jsme prováděli v souladu s doporučením dodavatele s tím rozdílem, že jsme používali streptavidin-peroxidázu místo extravidin-peroxidázy, protože takto se výrazně snížilo pozadí. Jako sekundární protilátku k VEGFR2 jsme používali rabbit anti-mouse IgG1-biotin. VEGFR2 (Flk1) je hlavním receptorem pro růstový faktor endotelu krevních cév VEGF (VEGF-A) (Jaffredo et al., 1998). VEGF-A se také může vázat na VEGFR1, který ale spíše moduluje aktivitu VEGFR2. Další molekuly VEGF (VEGFR-C a D) se váží na VEGFR3 a hlavní úlohu hrají při vývoji lymfatických cév (Oh et al., 1997).

Buňky v apoptóze jsme značili pomocí anti-cleaved caspase-3 monoklonální protilátky (BD Pharmingen 559565) při ředění 1:500 v parafínových řezech. Jako sekundární protilátku jsme používali goat anti-rabbit biotin (1:500), extravidin Px (Sigma 2886) (1:100) a DAB. Její exprese je součástí aktivace procesu apoptózy (Stadelmann a Lassmann, 2000).

Proliferující buňky jsme znázorňovali polyklonální protilátkou anti-phospho histon H3 (Upstate 06570) 1:200 v kryostatových řezech. Jako sekundární protilátku jsme používali goat anti-rabbit rhodamine (Cappel Pharmaceutical) (1:500). Tato reakce prokazuje histon, který je fosforilován pouze v mitóze (Chadee et al., 1995).

Hladké svalové buňky, které tvoří spolu s endotelem cévní stěnu, jsme značili anti-smooth muscle actin (anti-SMA) protilátkou (Sigma A2547) 1:500 a jako sekundární protilátku jsme používali goat anti-mouse TRITC (1:150). SMA je pro hladké svalové buňky charakteristický již od počátku jejich diferenciaci (Skalli et al., 1986).

Fagocytickou funkci macrophage-like cells jsme znázorňovali průkazem kyselé fosfatázy rezistentní ke kyselině vinné. Reakce je charakteristicky pozitivní ve všech fagocytujících buňkách bez ohledu na jejich specifickou diferenciaci (Cuadros et al., 1992). Embrya byla fixována přes noc ve 100% acetonu při 4 °C, potom zpracována pro zalití do parafínu přes řadu xylenů. Po celou dobu zpracování nesmí preparát přijít do kontaktu s alkoholem, proto jsme i pro odparafinování řezů používali xylen a rehydratovali jsme přes aceton a roztok acetonu v destilované vodě (1:1). Řezy jsme inkubovali přes noc při pokojové teplotě v roztoku připraveném smícháním 10 mg naphthol-AS-BI phosphate (Sigma, 70491-Fluka) s 0,5 ml N,N-dimethyl formamide. Tento roztok byl celý rozpuštěn v 50 ml 0.1M pufru kyseliny octové (pH 5.2, walpore acetate) a bylo přidáno 20 mg fast red violet (Sigma, F3381). Nakonec bylo přidáno minimálně 140 mg kyseliny vinné (Sigma Aldrich, 14314DE).

5.3.2 mRNA *in situ* hybridizace

U kuřecích embryí jsme na parafinových řezech značili pomocí *in situ* (ISH) hybridizace mRNA *ptc1*. Ptc1 protein má důležitou funkci v signální kaskádě Shh a jeho exprese je také Shh kaskádou regulována (Marigo a Tabin, 1996). Pro ISH jsme používali kuřecí embrya, protože plasmid nese kuřecí *ptc1* a výsledky ISH tohoto plasmidu u křepelek byly velmi rozdílné kvality.

Pro přípravu digoxigeninem značené RNA anti-sense sondy, která se na řezech naváže na *ptc1* mRNA, jsme použili plasmid (Bluescript SK-), do kterého byla vložena sekvence kuřecího *ptc1* (clone 200; získáno od M. Scotta) (Xie et al., 1997). Plasmid jsme amplifikovali v bakteriální kultuře po její transformaci tepelným šokem (E. coli XL-1 Blue, Stratagene). Amplifikovaný plasmid jsme izolovali metodou alkalické lýze pomocí Qiagen Plasmid Midi kitu. Poté jsme plasmid lineárnízovali pomocí restriční endonukleázy SallI a přečistili ho fenol-chloroformovou extrakcí a etanolovou precipitací. Vlastní anti-sense RNA sondu jsme připravili transkripcí *in vitro* pomocí T3 polymerázy za přítomnosti nukleotidů, které mají digoxigeninem značený uracyltrifosfát (UTP). Nakonec jsme sondu přečistili na kolonkách RNA Mini Quick Spin Column.

Hybridizaci na parafinových řezech jsme dělali podle Nieto et al. (1996) a Naňka et al. (2006). Všechny odběry, následné zpracování embryí a vlastní ISH reakce probíhaly za podmínek zabraňujících kontaminaci RNAázami. Parafinové řezy 16 μ m jsme krájeli na skla potažená silanem. Řezy jsme odparafinovali, rehydratovali, natrávili proteinázou K a prefixovali 4% PFA. Poté jsme řezy hybridizovali se značenou sondou v hybridizačním roztoku po dobu 24 hodin. Následné praní v SSC zamezilo nespecifické vazbě sondy a odstranilo nenavázanou RNA sondu. Přes noc

jsme inkubovali řezy s protilátkou proti digoxigeninu značenou alkalickou fosfatázou (AP), která v posledním kroku ISH tvoří viditelnou barevnou sraženinu se substrátem NBT a BCIP. Kontrolou nespecifické reakce byly řezy inkubované s antisense a sense mRNA sondou pro *pax3*.

5.3.3 Nástřík cévního systému tuší

Další metodou znázornění cévního systému ptačích embryí bylo jeho nastříknutí roztokem tuše v PBS 1:20. Skleněnou mikrokapilárou s ústním naústkem jsme nastříkli tuš do extraembryonálních vitelinních žil a bijící srdce rovnoměrně rozmístilo tuš do celého cévního systému. Hned po nástřiku jsme embrya odebrali, fixovali v 4% PFA a analyzovali.

5.3.4 Kultivace hybridomových buněk 5E1, 12cA5 a QT6 fibroblastů a jejich příprava pro aplikaci do embryí

Hybridomové buňky jsou uměle připravené buňky, které v kultuře mohou neomezeně růst a mají schopnost neustále produkovat danou monoklonální protilátku. Hybridomové buňky se obecně připravují *in vitro* fúzí B-lymfocytů a myelomových buněk. B-lymfocyty produkují žádanou protilátku, ale v kultuře mají krátkou životnost. Myelomové buněčné linie jsou nádorové plazmatické buňky, které v kultuře vydrží neomezeně růst (např. Hořejší a Bartůňková, 2002). Hybridomové buňky produkující anti-Shh protilátku 5E1 byly připraveny v laboratoři T. M. Jessella (Roelink et al., 1995). Hybridomové buňky 12cA5 produkují protilátku proti HA-tag a byly vytvořeny Handley-Gearhart et al. (1994). Hybridomové buňky 5E1 i 12cA5 jsme získali od H. Roelinka

Hybridomové buňky 5E1 a 12cA5 se kultivují podobně jako jiné druhy buněk, a proto je nutno dodržovat všechny zásady sterility běžné při práci s tkáňovými kulturami.

Stejně jako jiné druhy buněk se hybridomové buňky dlouhodobě uchovávají hlubokozmrazené v tekutém dusíku ve směsi 4:1 fetálního hovězího séra (FBS) a dimethylsulfoxidu (DMSO). Při rozmrazování se buňky postupně převádí do předehřátého kultivačního média, nakonec se buňky centrifugují 5 minut při 1200 rpm a resuspendují v novém kultivačním médiu. Hybridomové buňky jsme kultivovali v kultivačním médiu Dulbecco/Vogt modified Eagle's Medium (DMEM) (450 ml, Invitrogen), do kterého bylo přidáno 45 ml FBS, 5 ml antibiotik (Penicilin a Streptomycin) a 5 ml L-glutaminu. Buňky jsme kultivovali 3–7 dní v kultivačních lahvích v řízené atmosféře 5% CO₂.

QT6 fibroblasty produkují protein Shh, protože do nich byl virovým vektorem vpraven gen pro *shh* (Brito et al., 2006). QT6 křepelčí fibroblasty jsme získali od

N. LeDouarin. QT6 buňky se také kultivují ve sterilním prostředí. QT6 buňky jsme uchovávali hlubokozmrazené v tekutém dusíku ve směsi 4:1 fetálního hovězího séra (FBS) a dimethylsulfoxidu (DMSO). Při rozmrazování se buňky postupně převádí do předehřátého kultivačního média, nakonec se buňky centrifugují 5 minut při 1200 rpm a resuspendují v novém kultivačním médiu. QT6 buňky jsme kultivovali v kultivačním médiu Dulbecco/Vogt modified Eagle's Medium (DMEM) (450 ml, Invitrogen) s 4,5g glukózy na jeden litr. Do média bylo přidáno 45 ml FBS, 5 ml kuřecího séra, 5 ml antibiotik (Penicilin a Streptomycin) a 5 ml L-glutaminu. Pro selekci Shh produkujících QT6 buněk bylo do média přidáno 400 $\mu\text{g/ml}$ antibiotika G418, společně s genem pro Shh byla totiž do QT6 fibroblastů vsunuta rezistence k tomuto antibiotiku. Buňky jsme kultivovali 3–7 dní v kultivačních lahvích v řízené atmosféře 5% CO_2 . Při dlouhodobější kultivaci, kdy je nutné buňky rozdělit do dalších kultivačních lahví, jsme je oddělovali od podkladu suchou trypsinizací. Nejprve jsme odstranili kultivační médium, pak jsme buňky opláchli sterilním PBS bez vápenatých a hořečnatých iontů. Dále jsme do kultivačních lahví přidali 0,05% trypsin v EDTA a nechali asi minutu působit při pokojové teplotě. Tímto se fibroblasty oddělily od podkladu a bylo možné je přenést do nových kultivačních lahví.

5.3.5 Inhibice Shh pomocí anti-Shh (5E1) protilátky

Funkci Shh v ptačích embryích jsme *in vivo* inhibovali pomocí hybridomových buněk, které do embrya produkovaly anti-Shh (5E1) protilátku. 5E1 protilátka se v embryu po aplikaci buněk navázala na molekuly Shh a tím změnila jejich povrchovou strukturu. Změněná struktura znemožnila Shh se navázat na receptor a tím zablokovala aktivaci jeho signální kaskády. Po aplikaci hybridomových buněk Shh v embryu sice přetrvává, ale je nefunkční.

Těsně před aplikací buněk do embryí jsme buňky centrifugovali 1 minutu 1000 rpm a resuspendovali přibližně v 500 μl Liebovitz L-15 medium (Sigma) nebo PBS. Takto připravených přibližně 10^8 buněk jsme ihned aplikovali do embryí.

Pomocí skleněné mikropipiláry jsme hybridomové buňky aplikovali pod vitelinní membránu embrya do oblasti žaberních oblouků. Zkoušeli jsme několik metod aplikace buněk včetně aplikace buněk do paraaxiálního mezodermu embrya, které také bylo úspěšné. Nakonec jsme ale používali metodu aplikace buněk vně embrya do částečně uzavřeného prostoru žaberních oblouků. Tato aplikace je nejméně invazivní a prokázali jsme, že protilátka volně difunduje celým embryem a je tedy schopna se navázat i na struktury v axiální rovině embrya. Místo aplikace hybridomových buněk není tedy tak důležité, protože protilátka inhibuje Shh v celém embryu.

Po aplikaci buněk jsme embrya ve vajíčku inkubovali další 1–3 dni, poté je odebrali a analyzovali. Do embryí jsme aplikovali hybridomové buňky ve stádiích 10–12 HH a odebírali jsme je ve stádiích 18, 21 a 23 HH.

Jako kontrolu jsme používali normální neoperovaná embrya nebo embrya, do kterých jsme aplikovali kontrolní hybridomové buňky 12cA5. Hybridomové buňky 12cA5 produkují protilátku proti myší HA-tag, která se v kuřecím embryu neváže na žádnou strukturu (Handley-Gearhart et al., 1994). Volně difundující protilátka tak neovlivní vývoj žádných struktur a slouží tak ke kontrole, že ani aplikace hybridomových buněk, ani hybridomové buňky samotné neovlivňují vývoj embrya. Embrya s aplikovanými 12cA5 buňkami se nijak nelišila od normálních embryí.

5.3.6 Inhibice Shh pomocí cyclopaminu

Jako druhou metodu inhibice Shh jsme u ptačích embryí používali cyclopamin. Cyclopamin je rostlinný alkaloid z kýchavice bílé (*Veratrum album*), který specificky blokuje signální kaskádu Shh, konkrétně transmembránový protein Smoothened (Smo). Cyclopamin jsme aplikovali *in vivo* do embryí stádia 10–12 HH. Cyclopamin se pro aplikaci *in vivo* váže na nosič β -3 cyclodextrin (HBC, Sigma), který umožní jeho pozvolné uvolňování do embrya. Cyclopamin s HBC jsme aplikovali pomocí mikrokapiláry pod vitelinní membránu embrya do oblasti žaberních oblouků a embrya jsme reinkubovali jeden nebo dva dni. Třetina embryí nepřežila aplikaci cyclopaminu, třetina embryí vykazovala defekty centrálního nervového systému a tendenci k cyclopii a třetina embryí byla bez změněného vnějšího fenotypu. Efekt inhibice Shh jsme analyzovali pomocí QH1 protilátky.

5.3.7 Kvantifikace změn růstu a diferenciaci po inhibici Shh

Protože jsme v žaberní oblasti u Shh inhibovaných ptačích embryích ve stádiích 23 HH pozorovali zvýšené množství volných endotelových buněk, které netvořily funkční cévy, bylo nutné tyto buňky kvantifikovat. Dále jsme kvantifikovali macrophage-like cells, apoptotické buňky a proliferující buňky. Buňky jsme počítali každých 40 μm a minimálně jsme kvantifikovali 20 řezů dané oblasti. V šesti embryích jsme analyzovali výskyt volných endotelových buněk značených QH1. Ve čtyřech embryích jsme počítali množství macrophage-like cells, apoptotických buněk a proliferujících buněk.

Pozitivní buňky jsme počítali na seriálních 10 μm řezech v následujících morfologických oblastech embrya: v každém z žaberních oblouků, okolo *aorta dorsalis*, oblasti okolo *vena cardinalis anterior* a oblast okolo výtokového traktu srdečního. Oblast okolo *aorta dorsalis* obsahuje struktury ventrálně od ní až k šestému žabernímu oblouku a základu jater a dorsálně zasahuje až k nervové trubici. Oblast *vena cardinalis anterior* obsahuje mimo oka a mozku celou oblast dorsálně od prvního žaberního oblouku. Oblast výtokového traktu srdečního zahrnuje cévy a mesenchym kraniálně od srdce až k oblasti žaberních oblouků.

Grafy v obrázcích obr. 18 až obr. 21 vychází z těchto kvantifikací, kdy jsme pro každou oblast stanovili průměrné množství pozitivních buněk a vypočítali směrodatnou odchylku. Grafy jsou vypracované v programu Prism 5 GraphPad.

Fotodokumentaci řezů embryí a celých embryí jsme prováděli na mikroskopu Olympus BX51 a preparačním mikroskopu Olympus SZX10 s kamerou DP50. Obrázky byly pořizovány v programu Analysis 3.22 a zpracovávány v programu Adobe Photoshop CS3, Adobe Illustrator 10 a Corel Draw X3.

6 Výsledky

6.1 Přestavba aortálních oblouků u *Pelobates fuscus*

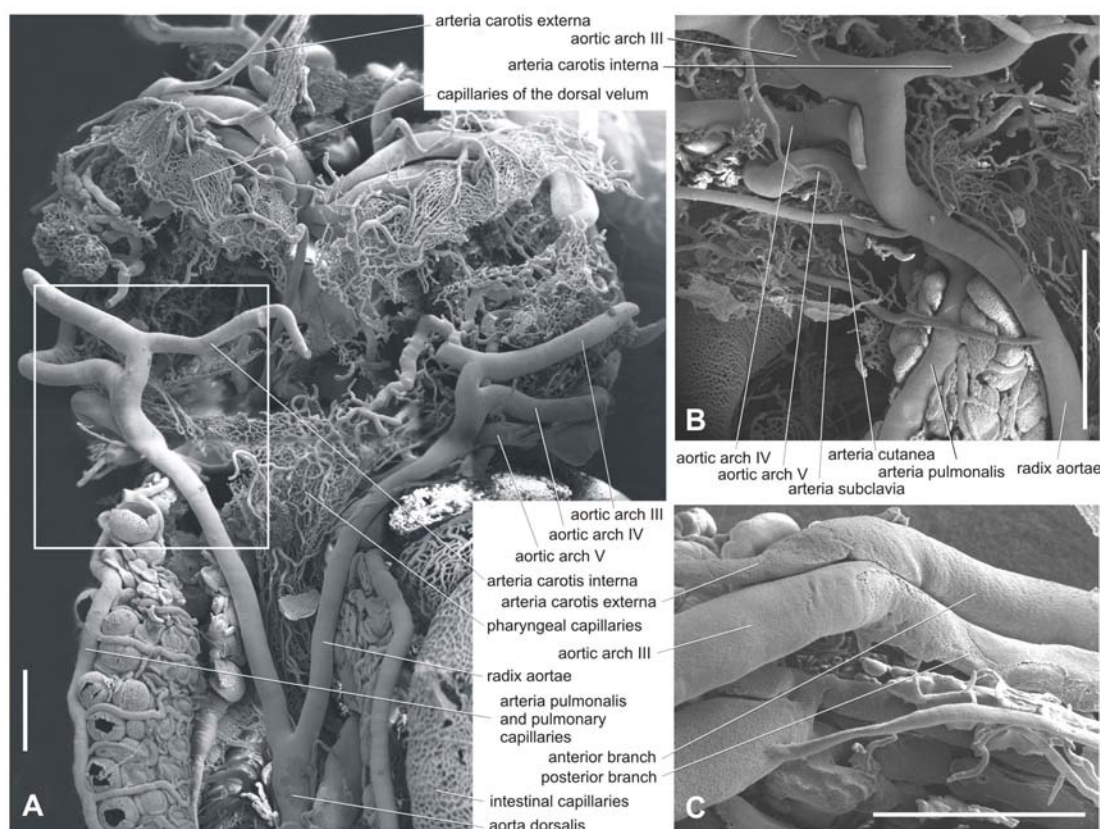
6.1.1 Pozdní larvální stádia (50–53 NF)

Ve stádiu 50 NF jsou vytvořeny čtyři aortální oblouky, označované jako III.-VI., protože první a druhý aortální oblouk byly přítomny pouze v časných larválních stádiích a záhy zanikly. V následujícím textu je uveden a dokumentován jejich popis, který je východiskem pro studium jejich přestavby v průběhu metamorfózy.

Aortální oblouky navazují na společný cévní kmen *truncus arteriosus* (*aorta ventralis*), který je plynulým pokračováním posledního oddílu srdce – *conus arteriosus*. *Conus arteriosus* obsahuje spirální chlopeň, která rozděluje krev do pravé a levé poloviny těla. Z *truncus arteriosus* odstupují tři párové cévní kmeny pro III. a IV. aortální oblouk a společný kmen pro V. a VI. oblouk.

Třetí aortální oblouk ve stádiích 50–53 NF odstupuje z *truncus arteriosus* a krátce po svém vzniku je přerušen vznikajícím karotidovým labyrintem, *glomus caroticum*. Z *glomus caroticum* odstupuje kraniálně *a. carotis externa* (obr. 1 C). *Arteria carotis externa* se nejdříve vrací podél III. oblouku a odděluje větve na zásobení okolních žaberních svalů a *velum ventrale* žaberního koše, dále se tepna stáčí medio-kraniálně a pokračuje na ventrální straně hlavy. V místě budoucího *glomus caroticum* se také III. aortální oblouk dělí na *ramus anterior et posterior* do žaber. *Ramus posterior* je silnější a je plynulým pokračováním aortálního oblouku. *Ramus anterior* jde po jeho laterální straně a přímo navazuje na *arteria carotis externa* (obr. 1 C). Z ventrální strany *ramus posterior* vedou *arteriae afferentes*, které se větví k vnitřním žábrám. Žábry jsou velmi dobře vytvořeny a jejich cévy a kapiláry vyplňují celou žaberní dutinu. Postupně se krev z žaber sbírá přes *arteriae efferentes*, které jsou stejně rozvětvené jako *arteriae afferentes* a kopírují jejich průběh. *Arteriae efferentes* se pak napojí na *ramus anterior* III. aortálního oblouku (obr. 6 A). Žábry jsou vždy na ventrální straně aortálních oblouků, na rozdíl od filtračního aparátu, který je vždy na straně dorsální (obr. 6 D). Filtrační aparát u III. aortálního oblouku je ale zásoben cévou z IV. aortálního oblouku. Za žábry se už tenčí *ramus posterior* napojí na silnější *ramus anterior*. III. aortální oblouk se pak stáčí dorso-mediálně a napojuje se na *aorta dorsalis lateralis* (obr. 1 A–B).

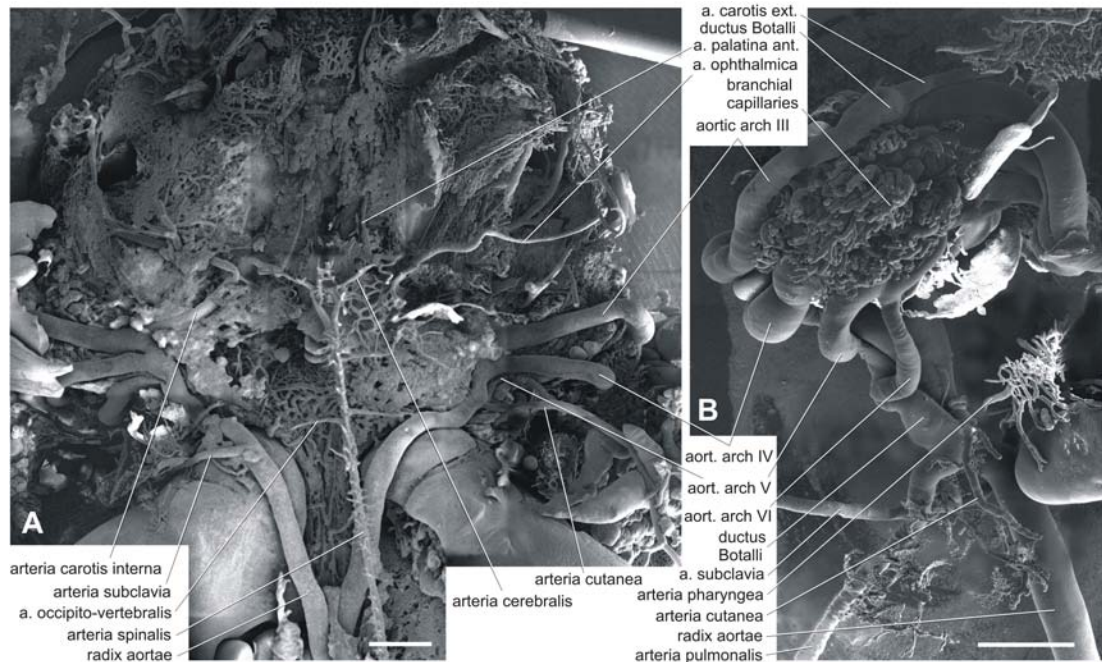
Čtvrtý aortální oblouk odstupuje z *truncus arteriosus* hned za III. aortálním obloukem a kopíruje i jeho průběh. Před vstupem do žaber z jeho dorsální strany vzniká céva k filtračnímu aparátu u III. a IV. žaberního oblouku. Čtvrtý aortální oblouk se pak podobně jako třetí aortální oblouk dělí na *ramus anterior et posterior*, také jeho systém větvení k žábrám je stejný. Po průchodu žábry se zase



Obrázek 1: Korozivní preparát cévního systému larev *Pelobates*. (A) Celkový pohled na dorsální stranu aortálních oblouků a asociovaných cév larvy *Pelobates* stádia 50 NF. (B) Aortální oblouky a jejich napojení na *aorta dorsalis lateralis* ve stádiu 56 NF, podobná oblast je na obrázku A označena čtvercem. (C) Odstup aortálních oblouků a oblast vznikajícího karotidového labyrintu u stádia 56 NF. Dorsální pohled pravé poloviny těla. Měřítka je 1 mm. Obrázek je převzatý z publikace Kolesová et al. (2007).

obě větve spojí a IV. aortální oblouk se napojí na *aorta dorsalis lateralis* (obr. 1 A–B).

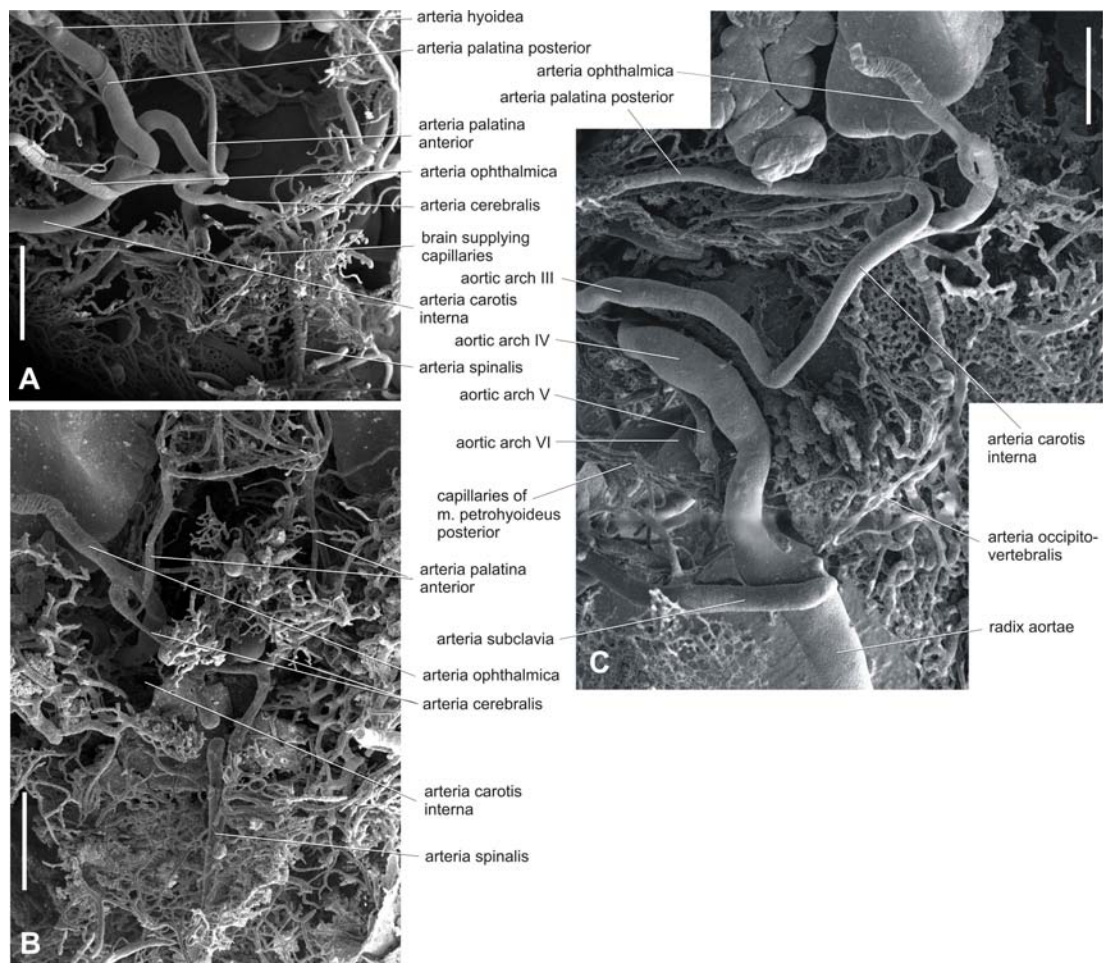
Pátý aortální oblouk vzniká z *truncus arteriosus* společně s VI. aortálním obloukem. Pátý aortální oblouk je v těchto stádiích stejně silný jako III. a IV. aortální oblouk. Před vstupem do žaber se z něj odděluje menší VI. aortální oblouk. Pátý aortální oblouk se podobně dělí na *ramus anterior et posterior* pro cévní zásobení žaber (obr. 8 A). Také z něj vzniká céva, která zásobuje filtrační aparát na dorsální straně pátého a šestého žaberního oblouku. Protože je V. aortální oblouk umístěn mediálněji než III. a IV. aortální oblouk, tak i délka *ramus anterior* a *ramus posterior* je kratší než u III. a IV. aortálního oblouku. Po průchodu žábry se *ramus anterior* a *ramus posterior* spojí. Těsně před vstupem V. aortálního oblouku do *aorta dorsalis lateralis* se na něj napojuje VI. aortální oblouk a oba se společně napojují na *aorta dorsalis lateralis*. V. a VI. aortální oblouk se napojují na *aorta*



Obrázek 2: Korozivní preparát cévního systému larev *Pelobates* na začátku metamorfózy (stádium 62 NF). (A) Dorsální pohled na aortální oblouky a větve *arteria carotis interna*. (B) Ventrální pohled na aortální oblouky a postupně se redukující oblast žaberních cév pravé strany. Měřítko je 1 mm. Obrázek je převzatý z publikace Kolesová et al. (2007).

dorsalis lateralis z ventrální strany narozdíl od III. a IV. aortálního oblouku, které do ní vstupují laterálně (obr. 1 A–B).

Šestý aortální oblouk má přibližně poloviční průměr než ostatní aortální oblouky a pokračuje po svém vzniku z V. aortálního oblouku kaudálně. Šestý aortální oblouk se nedělí na *ramus anterior et posterior* a vzniká z něj jen několik cév do žaber. Po průchodu žábry se VI. aortální oblouk napojuje z ventrální strany na *aorta dorsalis lateralis* skoro ve stejném místě jako V. aortální oblouk. Těsně před napojením VI. aortálního oblouku z něj odstupuje kaudálně *arteria pulmonalis* a hned za ní vzniká kranálně *arteria cutanea*. *Ductus Botalli*, tedy úsek VI. aortálního oblouku mezi odstupem *arteria pulmonalis* a napojením na *aorta dorsalis lateralis*, je velmi krátký. Z *arteria pulmonalis* se hned po jejím vzniku odděluje *arteria pharyngea*, která zásobuje dorsální stranu hltanu. Další větvi z *arteria pulmonalis* je céva, která jde po ventrální straně žaberního koše, ale pak se vrací zpět na dorsální stranu těla a zásobuje *velum dorsale* žaberní dutiny. Krev z *velum dorsale* je sbírána do žilního systému. Z *arteria pulmonalis* se pak oddělují drobné cévy ke kranálnímu výběžku plic a *arteria pulmonalis* pokračuje na laterální straně plic až na jejich kaudální konec. Její větve se rozpadají až do kapilární pleteně kolem jednotlivých plicních váčků, které jsou už v tomto stádiu vyvinuty



Obrázek 3: Detailní pohledy na cévní systém *Pelobates*. (A) Detailní větvení *arteria carotis interna* u stádia 56 NF. Dorsální pohled. (B) Detailní větvení *arteria carotis interna* v průběhu metamorfózy u stádia 63 NF. Dobře patrné je propojení *arteriae cerebrales* a *arteria spinalis* do Willisova okruhu. (C) Dorsální pohled na aortální oblouky v průběhu metamorfózy u stádia 63 NF. *Ductus caroticus* je redukován a III. aortální oblouk plynule přechází do *arteria carotis interna*. IV. aortální oblouk je největším cévním kmenem pro přívod krve do těla, V. aortální oblouk se redukuje a společně se VI. obloukem ztratily napojení na *aorta dorsalis lateralis*. Měřítko je 0,5 mm. Obrázek je převzatý z publikace Kolesová et al. (2007).

(obr. 1 A–B a obr. 7 A). Na pravé straně vede *arteria pulmonalis* mediálněji než na levé, vznikající plíce jsou totiž utlačovány játry a střevními kličkami. *Arteria cutanea* pokračuje z *ductus Botalli* laterálně a zásobuje krví kůži těla (obr. 1 B).

Aorta dorsalis lateralis je párová céva na dorsální straně těla, do které se napojují jednotlivé aortální oblouky. Její kraniální pokračování po napojení třetího aortálního oblouku se nazývá *arteria carotis interna*. Po III. aortálním oblouku se na *aorta dorsalis lateralis* napojuje IV. aortální oblouk a V. aortální oblouk

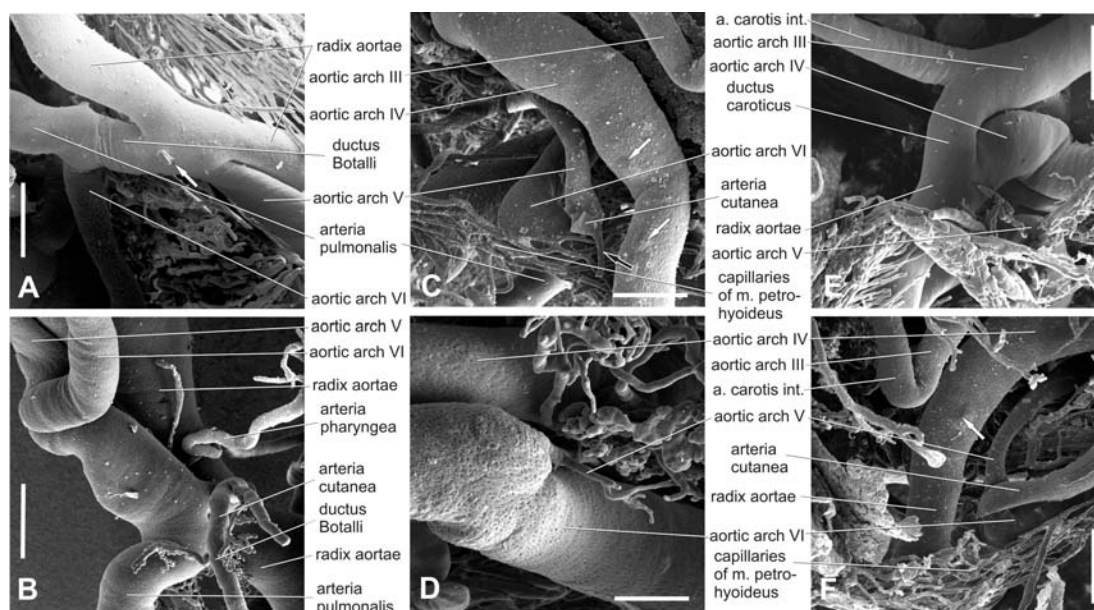
společně s VI. aortálním obloukem. *Aorta dorsalis lateralis* poté pokračuje medio-kaudálně a během svého průběhu odděluje *arteria palato-nasalis*, která nebyla u žab dosud popsána. Nazvala jsem ji podle podobné cévy známé u ocasatých obojživelníků. *Arteria palato-nasalis* jde po dorsální straně těla kraniálním směrem a končí v nozdrách (obr. 5). Společně s *arteria palato-nasalis* vzniká i *arteria occipito-vertebralis*, jejíž první větev zásobuje týlní oblast a druhá větev se napojuje v mediánní rovině na *arteria spinalis* (viz dále). Dále z *aorta dorsalis lateralis* vzniká *arteria subclavia*, přestože u larválních stádií není ještě přední končetina na povrchu těla patrná. V mediánní rovině se obě párové *aortae dorsales laterales* spojují a vytváří nepárovou *aorta dorsalis*.

Arteria carotis interna jde mediálně a odděluje *arteria palatina posterior*, která je stejně silná jako *arteria carotis interna* (obr. 3 A). *Arteria palatina posterior* dorsálně kříží vlastní *arteria carotis interna* a pokračuje kraneo-laterálně a odděluje cévu, která zásobuje kaudální oblast stropu žaberní dutiny, dále z ní vzniká *arteria hyoidea* a další drobné větve ke druhému žabernímu oblouku. *Arteria carotis interna* dále pokračuje medio-kaudálně, pak se prudce stáčí do kraniálního směru a vzniká z ní *arteria palatina anterior*, která zásobuje patro ústní dutiny. Po krátkém úseku se *arteria carotis interna* dělí na *arteria ophthalmica* a *arteria cerebralis* (obr. 3 A). *Arteria ophthalmica* pokračuje laterálně až k oční kouli a *arteria cerebralis* jde mediálně a anastomózuje se stejnou cévou z protilehlé strany těla. *Arteria cerebralis* pak pokračuje kaudálně, až se pod mozkem obě *arteriae cerebrales* spojí a vytvoří nepárovou *arteria spinalis* (obr. 3 B). *Arteria spinalis* prochází míšním kanálem a podobně jako *arteria cerebralis* zásobuje centrální nervový systém a jeho obaly. Do *arteria spinalis* se krev také dostává přes *arteria occipito-vertebralis* z *aorta dorsalis lateralis*. Mozek je tedy zásobován krví přes *arteria carotis interna* a také přes *arteria spinalis* z *aorta dorsalis* (obr. 3 B).

6.1.2 Prometamorfóza (56–58 NF)

Conus arteriosus a také *truncus arteriosus* jsou oproti předcházejícím larválním stádiím delší a lépe vytvořené.

Třetí aortální oblouk po odstupu z *truncus arteriosus* pokračuje laterálně do vznikajícího *glomus caroticum*. Schéma průchodu III. aortálního oblouku žábry je stejné jako u larválních stádií. V prometamorfóze, již ale žábry začínají pomalu zanikat, což se projeví vznikem přibližně osmi anastomóz mezi *ramus anterior et posterior* aortálního oblouku. Množství anastomóz se v průběhu prometamorfózy zvyšuje. Těmito anastomózami může krev protéci, aniž by prošla žábry přes *arteriae afferentes et efferentes*. Ve stádiu 57 a 58 NF koncová část *ramus posterior* ztrácí napojení na *ramus anterior* aortálního oblouku a slepě končí. *Ramus anterior* se jako III. aortální oblouk napojuje na *aorta dorsalis lateralis* (obr. 8 B–D).



Obrázek 4: Detailní pohledy na cévní systém *Pelobates*. (A) Napojení V. a VI. aortálního oblouku přes *ductus Botalli* na *aorta dorsalis lateralis* ve stádiu 61 NF. Laterální pohled na pravou stranu, rostrální směr je vpravo. Šipka ukazuje místo napojení *arteria cutanea* (odlomena). (B) Detail napojení V. a VI. aortálního oblouku na *aorta dorsalis lateralis* ve stádiu 62 NF. Ventrální pohled na pravou stranu. (C) Zanikající V. aortální oblouk (černá šipka) a kapilární pletěň *musculus petrohyoideus posterior*. Bílé šipky ukazují místa původního napojení V. a VI. aortálního oblouku na *aorta dorsalis lateralis*. Larva v průběhu metamorfózy, stádium 63 NF. Dorsální pohled na levou stranu. (D) Konec metamorfózy ve stádiu 65 NF, drobný V. aortální oblouk a jeho odstup z VI. aortálního oblouku. Ventrální pohled na pravou stranu. (E) Detail kompletního *ductus caroticus* v průběhu metamorfózy ve stádiu 61 NF. Dorsální pohled na pravou stranu. (F) Redukovaný *ductus caroticus* u stádia 63 NF. Šipka ukazuje místo napojení *ductus caroticus*. Stený pohled jako E. Všechny obrázky s výjimkou A mají rostrální směr nahore. Měřítka je 0,5 mm. Obrázek je převzatý z publikace Kolesová et al. (2007).

Čtvrtý aortální oblouk je svým vývojem podobný III. aortálnímu oblouku. Základní schéma větvení cév do žaber zůstává zachováno a v průběhu prometamorfózy se zvyšuje množství anastomóz mezi *ramus anterior et posterior*. Obdobně také koncová část *ramus posterior* ztrácí kontakt s aortálním obloukem a slepě končí. Z *ramus anterior* IV. aortálního oblouku vznikají dvě drobné cévy k *musculus interhyoideus*. Také se z IV. aortálního oblouku odděluje céva, která zásobuje filtrační aparát. Tato céva má laterální větev, která vede nad IV. aortálním obloukem k filtračnímu aparátu a větev mediální, která se dále dělí do stropu žaberní dutiny. Po průchodu zanikajícími žábry se IV. aortální oblouk napojí na *aorta dorsalis lateralis* (obr. 8 B–D).

Pátý aortální oblouk odstupuje z *truncus arteriosus* společně s VI. aortálním obloukem, který je výrazně menší a brzy se od V. aortálního oblouku odděluje. Pátý

aortální oblouk je kratší než III. a IV. oblouk, ale jeho základní schéma větvení k žábřám zůstává stejné. Také u něj vzniká několik anastomóz mezi *ramus anterior et posterior*. Slepé zakončení *ramus posterior* u něj ale není tak patrné jako u III. a IV. aortálního oblouku. Z pátého aortálního oblouku stejně jako v larválních stádiích vzniká céva k filtračnímu aparátu nad V. a VI. žaberním obloukem. Na V. aortální oblouk se po průchodu žábřami napojuje VI. aortální oblouk a společně vstupují do *aorta dorsalis lateralis*.

Šestý aortální oblouk má přibližně poloviční průměr než V. aortální oblouk, ze kterého se oddělil. VI. aortální oblouk jde mediálně podél V. aortálního oblouku a vzniká z něj hodně cév k žábřám. U jednoho exempláře byl dokonce na krátkém úseku rozdělen na *ramus anterior et posterior* do žaber. Po průchodu žábřami se V. a VI. aortální oblouk spojují a v tomto místě také odstupuje *arteria pulmonalis*. Společný úsek V. a VI. aortálního oblouku (*ductus Botalli*) je výrazně silnější než samostatný šestý aortální oblouk. Délka *ductus Botalli* byla u jednotlivých exemplářů velmi variabilní. Většina krve totiž do *arteria pulmonalis* přitéká přes V. aortální oblouk nebo přes *aorta dorsalis lateralis* a *ductus Botalli*. Dále z *arteria pulmonalis* odstupuje několik cév k horní části plic a *arteria pharyngea* k hltanu, který má také dýchací funkci. *Arteria pulmonalis* pak pokračuje na laterální straně plic a zásobuje plicní vřetky krví. Kaudální konec plic zasahuje v období prometamorfózy až na konec trupu. Z *ductus Botalli* vzniká také *arteria cutanea*, která pokračuje laterálně a dělí se na kraniální a kaudální větev, které zásobují hlavně kůži laterální a ventrální strany těla. *Arteria cutanea* je lépe vytvořená než v předcházejících stádiích, protože kůže postupně získává dýchací funkci (obr. 8 B–D).

Aorta dorsalis lateralis po napojení III., IV. a V. a VI. aortálního oblouku pokračuje medio-kaudálně. Z její dorsální strany vzniká *arteria palato-nasalis*, která vede nejprve kaudálně, pak se ale stáčí a pokračuje v dorsální části kranálně. Jde těsně po laterální straně lebky, kříží *arteria carotis interna* a pokračuje dál nad *arteria palatina anterior* až se na předním konci hlavy rozpadá do cév nozder. Laterálně z ní vzniká větev, která končí v očnici. Jako další větev se z *aorta dorsalis lateralis* odděluje céva k dorsálnímu povrchu trávicí trubice – *arteria oesophagea*. Dále odstupuje z *aorta dorsalis lateralis* laterálně *arteria occipito-vertebralis*, která se hned větví. První větev – *arteria occipitalis* se vrací kranálně podél *aorta dorsalis lateralis* a zásobuje kapilárami týlní oblast. Druhá větev jde mediálně k mozku a napojuje se na *arteria spinalis*. V místě odstupu *arteria occipito-vertebralis* se laterálně odděluje *arteria subclavia*. *Arteria subclavia* zásobuje přední končetinu, která se ještě vyvíjí pod kůží těla. Dále se *aortae dorsales laterales* spojují v mediální rovině a tvoří nepárovou *aorta dorsalis*. Z *aorta dorsalis* vznikají větve ke stěně střev – *arteria mesenterica* a nepárová *arteria iliaca*, která se hned dělí na *arteriae iliaceae* do zadních končetin. *Aorta dorsalis* pak pokračuje dále do ocasu.

Arteria carotis interna je kraniálním pokračováním *aorta dorsalis lateralis*. *Arteria carotis interna* pokračuje mediálním a kraniálním směrem a vzniká z ní vzniká *arteria palatina posterior*, která pokračuje kranio-mediálně. *Arteria palatina posterior* odděluje několik drobných cév, cévu ke stropu žaberní dutiny a *arteria hyoidea*, která zásobuje sval dorsální strany žaberního aparátu (obr. 3 A). *Arteria palatina posterior* dále pokračuje kraniálně a rozpadá se do tří svalů na přední a laterální části hlavy. Dále se *arteria carotis interna* stáčí kaudálním a mediálním směrem a větví se na *arteria palatina anterior* a *arteria ophthalmica*. *Arteria palatina anterior* se prudce otáčí a v mediální rovině jde kraniálně a několika větvemi zásobuje patro a horní čelist. *Arteria ophthalmica* jde laterálně a vzniká z ní *arteria cerebralis*. *Arteria ophthalmica* dále pokračuje až nad žábry a zásobuje oční kouli, je to jediná céva, která je zvlněná, aby umožňovala pohyby oční koule. *Arteria cerebralis* jde kaudo-mediálně a odděluje větev, která jde rostálním směrem nad *arteria palatina anterior*. Z *arteria cerebralis* vznikají drobné cévky na zásobení mozku, nakonec se *arteriae cerebrales* spojují pod mozkem a napojují se tak na *arteria spinalis*. Pod mozkem tak vzniká analogie Willisova okruhu, ze kterého odstupují drobné cévy zásobující mozek a míchu (obr. 3 A). *Arteria spinalis* je napojena *arteria occipito-vertebralis* na *aorta dorsalis lateralis* a zásobuje míchu.

6.1.3 Metamorfóza (59–66 NF)

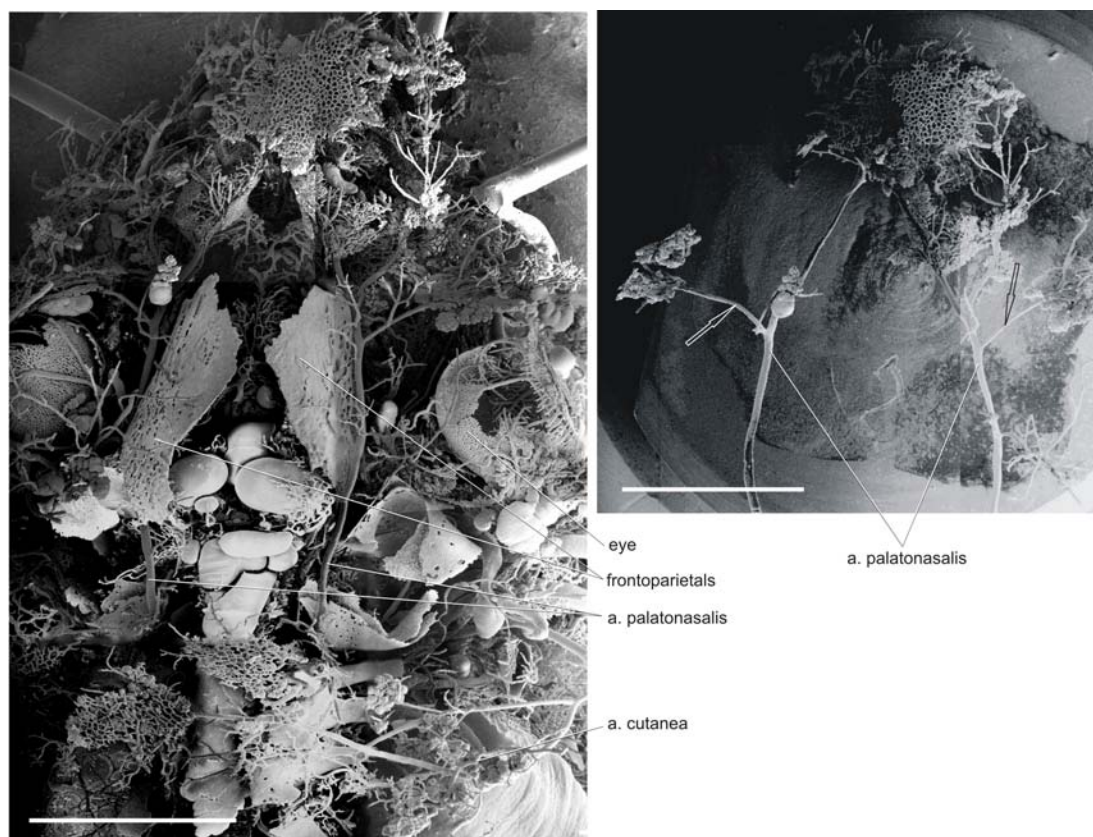
Stádium 59 NF

V tomto stádiu už dochází k postupné redukci žaber a žaberních cév všech aortálních oblouků. *Arteriae afferentes et efferentes*, které se u předcházejících stádií větvy až do pátého řádu, se začínají redukovat od svého distálního konce a větví se jen do třetího nebo čtvrtého řádu. Zánik kapilár se dá pozorovat i na změně struktury jejich stěn (obr. 6 B). Z IV. aortálního oblouku také vzniká céva k filtračnímu aparátu, který se také začíná redukovat. VI. aortální oblouk je stále výrazně tenčí než ostatní aortální oblouky.

Arteria palato-nasalis je v tomto stádiu velmi dobře vytvořená, odstupuje dorsálně z *aorta dorsalis lateralis* a odděluje několik drobných cév k oblasti páteře. Dále *arteria palato-nasalis* pokračuje kraniálním směrem na dorsální straně těla, prochází vně mozkovny a odděluje větev, která jde k rostrálnímu pólu očníce. *Arteria palato-nasalis* pak pokračuje až k nozdrám, kde se rozpadá do kapilární pleteně (obr. 5).

Arteria pulmonalis, *arteria cutanea* a *arteria subclavia* se zvětšují a mají více větví než v předcházejících stádiích. *Aortae dorsales laterales* jsou rozvíjejícími se plicemi zatlačovány mediálně.

Stádium 61 NF



Obrázek 5: *Arteria palato-nasalis* a její vztah k okolním cévám. Stádium 59 NF. Dorzální pohled. (A) Celkový pohled na cévní systém, preparát nebyl dekalifikován, proto se stále zachovala *ossa frontoparietalia*. *Arteria palato-nasalis* v kontextu ostatních struktur. (B) Odpreparovaná *arteria palato-nasalis*. Šipky znázorňují větve k očnici. Měřítko je 1 mm. Obrázek je převzatý z publikace Kolesová et al. (2007).

Na III. aortálním oblouku se dále zvětšuje *glomus caroticum* (obr. 6 E). Větvení cév do žaber odpovídá předcházejícímu stádiu, jen céva k filtračnímu aparátu už není vytvořena.

V. aortální oblouk se redukuje, je už tenčí než IV. aortální oblouk, ale jeho průběh zůstává stále stejný.

VI. aortální oblouk se začíná zvětšovat. Vzniká z něj *arteria cutanea*, která zásobuje kůži (obr. 8 E). V kůži jsou v tomto stádiu vytvořené dvě kapilární pleteně. Primární kapilární pletěň pulce postupně zaniká a pod ní vzniká sekundární kožní kapilární pletěň dospělé žáby (obr. 7 D).

Stádium 62 NF

Na III. aortálním oblouku se zvětšuje zesílení v místě budoucího karotidového labyrintu a začínají vznikat kapiláry, které ho budou zásobovat. U tohoto stádia

se podařilo zobrazit nástřikovou hmotou i štítnou žlázu u III. aortálního oblouku, která je zásobena *arteria thyroidea* (větev *arteria carotis externa*).

Celková délka žaber na III., IV. a V. aortálním oblouku je výrazně kratší než u předcházejících stádií (obr. 2 B). Velmi redukované jsou i žaberní cévy, které mají primární a sekundární úseky velmi silné a jen několik málo větví třetího řádu (obr. 6 C). Při redukci žaberních *arteriae afferentes et efferentes* tedy mizí větvení do dalších řádů a redukuje se také počet větví odstupujících z aortálních oblouků. Cévy filtračního aparátu již nejsou vytvořeny.

IV. aortální oblouk je v tomto stádiu už nejsilnějším aortálním obloukem. V. aortální oblouk se postupně redukuje, ale je stále ještě velmi silný. VI. aortální oblouk se dále zvětšuje a nevznikají z něj žádné cévy žaber. *Ductus Botalli* je výrazně tenčí než u předcházejícího stádia (obr. 4 A–B). *Arteria pulmonalis* je silná céva a zásobuje plicní váčky, které jsou už naplněné vzduchem (obr. 7 B). *Arteria cutanea* dále zvětšuje a větví se do kapilárních pletení kůže. Primární povrchová kapilární pleteň je více redukovaná než u předcházejícího stádia a vyskytuje se jen ostrůvkovitě. Pod ní vznikla nová kapilární síť dospělce (obr. 7 E–F).

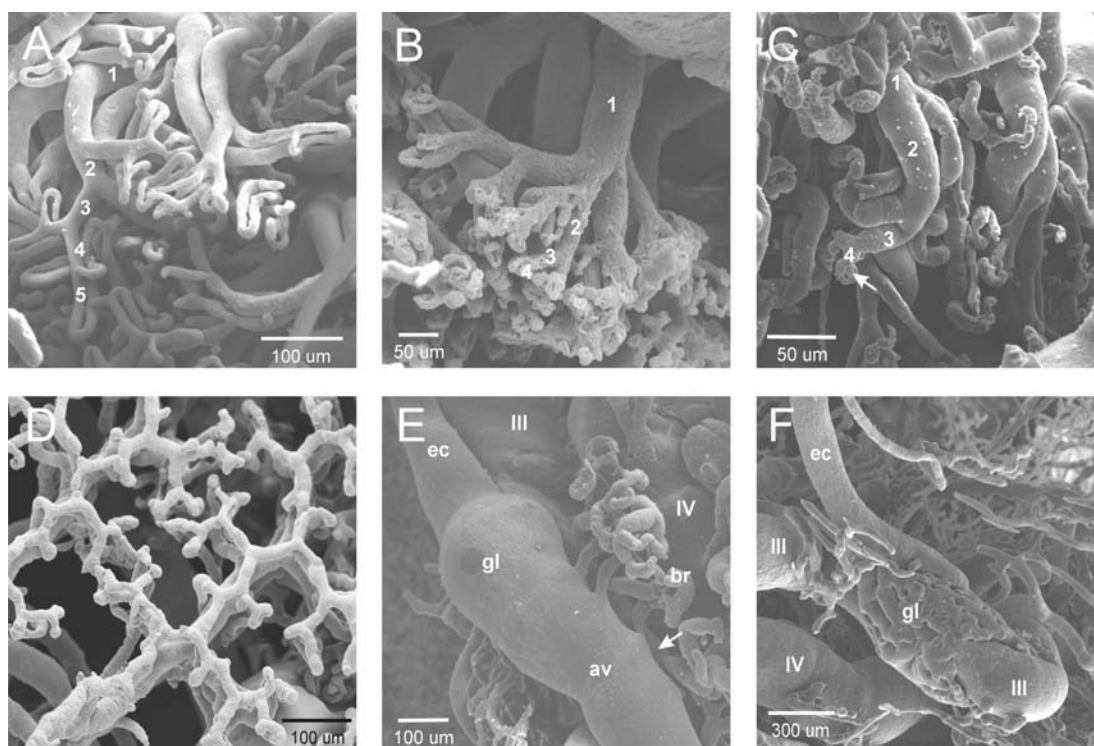
Aorta dorsalis lateralis je stále napojená na všechny aortální oblouky. III. aortální oblouk se na ni napojuje stejně jako v předcházejících stádiích a není patrná ani známka redukce *ductus caroticus* (obr. 4 E). Z *aorta dorsalis lateralis* odstupuje *arteria palato-nasalis*, která stejně jako v předcházejících stádiích jde po dorsální straně těla, odděluje větev k očnici a končí v kapilární pleteni nozder. *Arteria subclavia* je stejně mohutná céva jako *arteria pulmonalis* a dále se rozvíjí spolu s přední končetinou (obr. 8 F).

Stádium 63 NF

Okolo vznikajícího karotidového labyrintu se začíná tvořit kapilární pleteň. *Arteria carotis externa* vzniká jako u předcházejících stádií a odděluje větev, která zásobuje *velum ventrale*. *Velum ventrale* má u pulců také dýchací funkci a jeho kapiláry jsou v tomto stádiu již velmi redukované.

V tomto stadiu už žábry úplně zanikly a s nimi i všechny žaberní tepny a kapiláry. Úseky aortálních oblouků, které jimi procházely, jsou výrazně zkrácené a zbývá z nich jen krátká klička. Protože ještě v předcházejícím stádiu byly žábry vyvinuty, došlo pravděpodobně k náhlému uzavření tenčích posteriorních větví aortálních oblouků. Aortální oblouky tak tvoří jen původní *ramus anterior* (obr. 8 G).

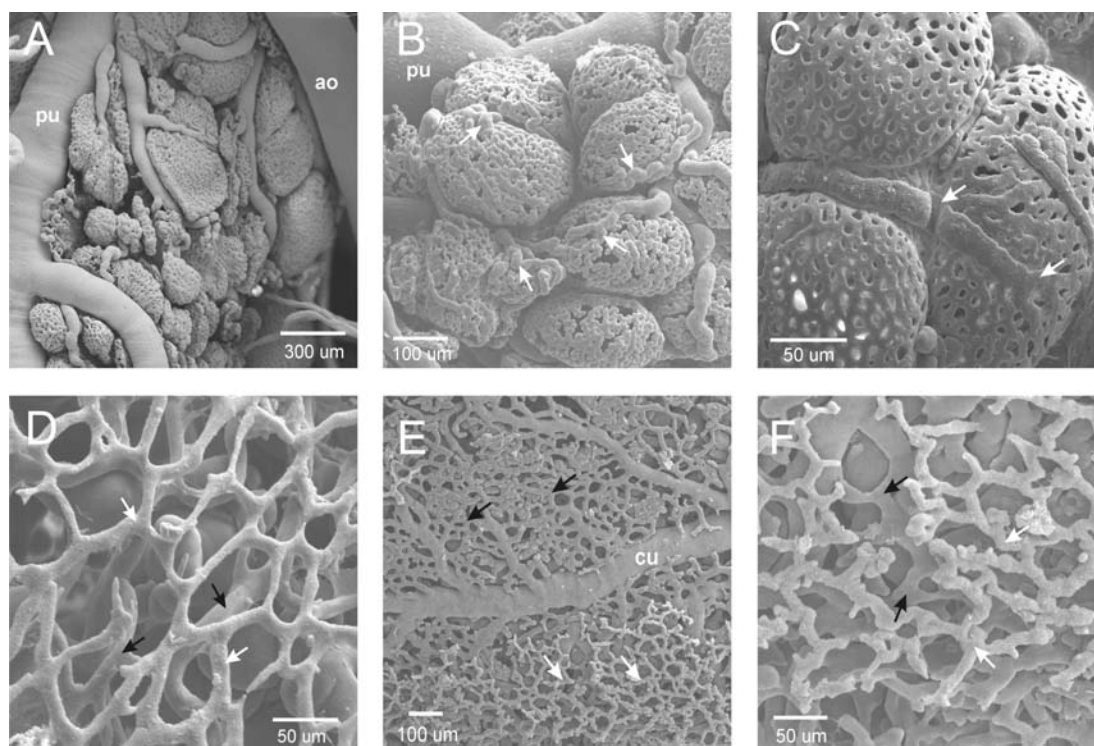
III. aortální oblouk ztratil napojení na *aorta dorsalis lateralis*. Část *aorta dorsalis* – *ductus caroticus*, který ještě byl v minulém stádiu vytvořený, úplně zanikl (obr. 3 C). V místě původního napojení zůstala jen drobná vyvýšenina (obr. 4 F). Přímým pokračováním III. aortálního oblouku je tedy *arteria carotis interna*. Laterálně z ní vzniká *arteria palatina posterior*, která se stáčí kaudálně a anastomózuje s *arteria cutanea*, pak se stáčí kranálně, z ventrální strany přichází k očnici



Obrázek 6: Detailní pohledy na vývoj cév a kapilár žaber, filtračního aparátu a *glomus caroticum*. (A–C) Postupná redukce žaberních cév a kapilár. Laterální pohled. (A) U larev ve stádiu 56 NF se plně vyvinuté kapiláry větví až do pátého řádu. (B) Redukce distálních úseků žaberních kapilár ve stádiu 59 NF. (C) Silně redukované distální úseky žaberních kapilár (šipka) a zesílené primární a sekundární větve žaberních cév ve stádiu 62 NF. (D) Detailní pohled cév filtračního aparátu ve stádiu 56 NF. (E–F) Postupný vývoj *glomus caroticum* v průběhu metamorfózy. Dorsální pohled. (E) Vznikající kapilární pletěň okolo *glomus caroticum* ve stádiu 62 NF. (F) Vytvořený *glomus caroticum* s kapilární pletěň na konci metamorfózy ve stádiu 65 NF. arabská čísla – úroveň větvení žaberních kapilár a cév, římská čísla – čísla aortálních oblouků, ao – *aorta dorsalis lateralis*, av – *ramus anterior* aortálního oblouku, br – žaberní cévy, ec – *arteria carotis externa*, gl – *glomus caroticum*.

a rozpadá se do její kapilární pletěně. *Arteria carotis interna* pokračuje mediálně a stejně jako u předcházejících stádií z ní vznikají tři větve. První se odděluje *arteria palatina anterior*, pak *arteria ophthalmica* a nakonec *arteria cerebralis* (obr. 2 A).

IV. aortální oblouk je jediným aortálním obloukem, který v tomto stádiu neztratil napojení na *aorta dorsalis lateralis* (obr. 3 C). IV. aortální oblouk je silnější než III. a začíná po něm přebírat funkci hlavního kmene pro rozvod krve do těla. *Aorta dorsalis lateralis* pokračuje od napojení IV. aortálního oblouku kaudálně. V místech bývalého napojení III., V. a VI. aortálního oblouku jsou na ní patrné drobné vyvýšeniny. Stejně jako u předcházejících stádií z ní vzniká *arteria oesophagea*, *arteria subclavia* a *arteria occipito-vertebralis*. *Arteria subclavia* je velmi



Obrázek 7: Detailní pohledy na vývoj cév a kapilár plic a kůže. (A–C) Vývoj plic a plicních kapilár v průběhu metamorfózy. (A) Již vytvořené plice a plicní váčky v larválním stádiu 56 NF. (B) Další rozvoj plicních váčků a jejich cév (šipky) ve stádiu 62 NF. (C) Plně vytvořené plicní váčky naplněné vzduchem a jejich kapiláry a cévy (šipky) po konci metamorfózy ve stádiu 66 NF. (D–F) Cévní pleteně v kůži. (D) Zanikající povrchová kapilární pleteně larev (bílé šipky) a vznikající kapilární pleteně dospělé (černé šipky). Stádium 61 NF. (E) celkový pohled na cévní zásobení kůže a *arteria cutanea* ve stádiu 62 NF. Černé šipky naznačují kapilární pleteně dospělé a bílé šipky primární kapilární pleteně larev. (F) Detailní pohled na sekundární kapilární pleteně dospělé (černé šipky) a zbytky primární kapilární pleteně (bílé šipky) ve stádiu 62 NF. ao – *aorta dorsalis lateralis*, cu – *arteria cutanea*, pu – *arteria pulmonalis*.

dobře vyvinutá, pokračuje laterálně a větví se až v přední končetině. Koncový úsek *aorta dorsalis* (*aorta caudalis*) se díky redukci ocasu, také začíná zkracovat.

V. aortální oblouk také ztratil napojení na *aorta dorsalis lateralis* a začal od své distální části redukovat. V tomto stádiu je již vytvořen jen jeho ventrální úsek. Redukce V. aortálního oblouku je pravděpodobně způsobena růstem *musculus petrohyoideus posterior*, který je důležitým dýchacím svalem dospělého (obr. 4 C). V místě původního napojení V. aortálního oblouku na *aorta dorsalis lateralis* je patrná vyvýšenina.

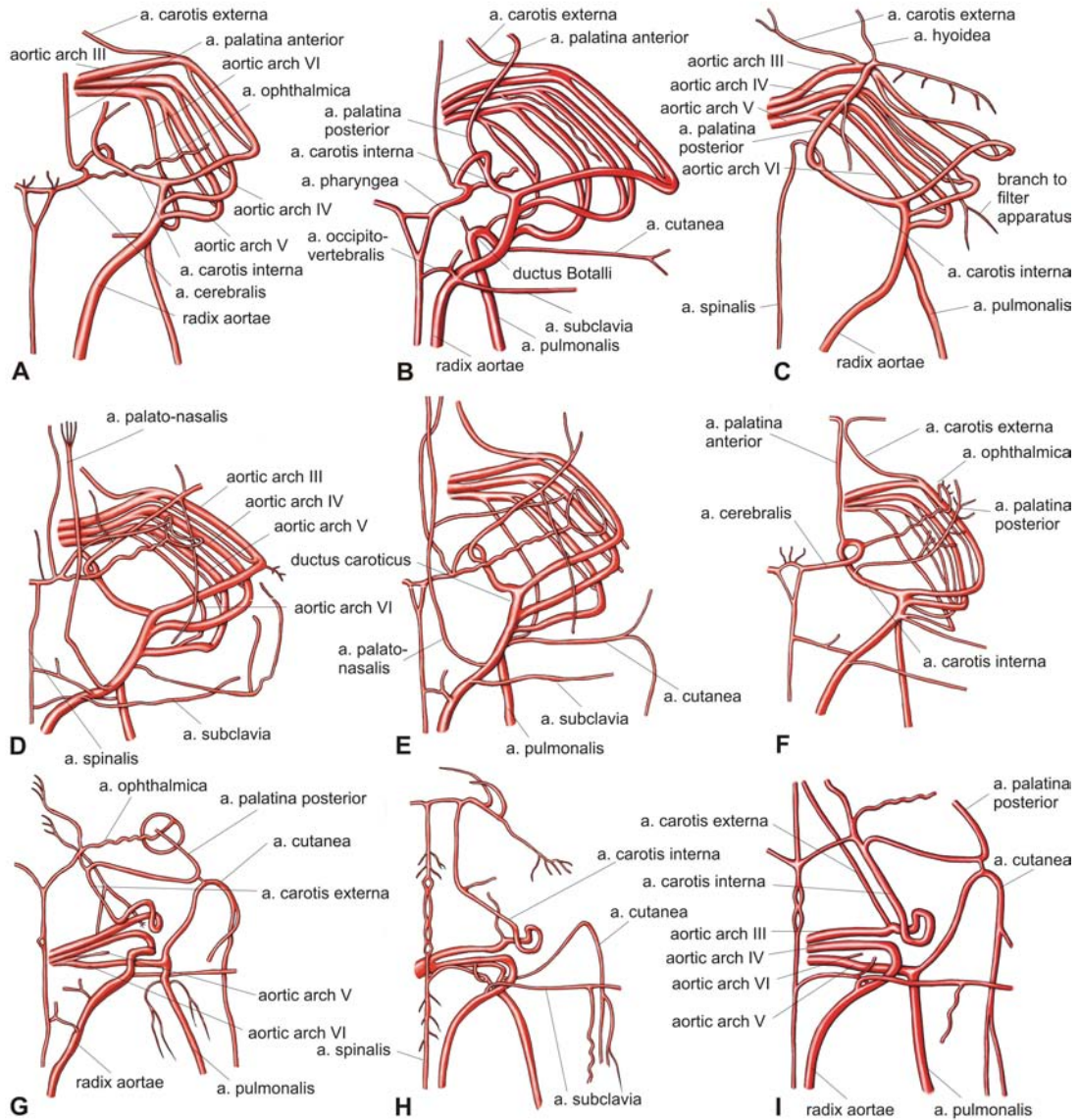
VI. aortální oblouk je stejně silný jako IV. aortální oblouk, a proto se V. aortální oblouk odděluje z něj a ne naopak jako u předcházejících stádií. Také VI. aortální oblouk ztratil napojení na *aorta dorsalis lateralis*, protože *ductus Botalli* zanikl (obr. 4 F). Zánik *ductus Botalli* způsobil, že se VI. aortální oblouk nestáčí jako III. a IV. aortální oblouk, ale pokračuje po svém vzniku stále laterálně a plynule přechází do své kraniální větve – *arteria cutanea* a kaudální větve – *arteria pulmonalis*. *Arteria cutanea* pokračuje kraniálně a odděluje větev pro zásobení kůže zad. V nejvyšším bodě svého průběhu anastomózuje s větví *arteria palatina posterior*, a pak se stáčí kaudálně a zásobuje kůži na bocích a na zádech. *Arteria pulmonalis* jde kaudálně na laterální straně plic. Redukce *ductus Botalli* a natažení VI. aortálního oblouku tak vytvořilo více místa pro plíce, které byly laterálně limitované právě *arteria pulmonalis*.

Stádium 65 NF

Karotidový labyrint má již jinou strukturu než u larev. Okolo zesíleného místa III. aortálního oblouku je vytvořena kompaktní kapilární pleteň, která je napojená jak na III. aortální oblouk, tak na *arteria carotis externa* (obr. 6 F). *Arteria carotis externa* zásobuje *musculus interhyoideus*, *velum ventrale*, které je již velmi redukované, a dále pokračuje kranio-mediálně až k okraji dolní čelisti.

III. aortální oblouk po vzniku *arteria carotis externa* pokračuje laterálně, a pak se stáčí kraniálně, dorsálně a nakonec mediálně, tím vzniká smyčka, která je pozůstatkem po redukovaných žábrách. Protože III. aortální oblouk ztratil napojení na *aorta dorsalis lateralis*, plynule tak pokračuje jako *arteria carotis interna*. Z *arteria carotis interna* podobně jako u předcházejících stádií vzniká *arteria palatina posterior*, která anastomózuje s *arteria cutanea*. *Arteria palatina posterior* se za anastomózou stáčí kraniálně, pokračuje po laterální straně hlavy a napojuje se na *arteria palatina anterior*. Před napojením se z ní oddělují cévy k horní a dolní čelisti a obě *arteriae palatinae* zásobují patro dutiny ústní. *Arteria carotis interna* se dále dělí na *arteria palatina anterior*, *arteria ophthalmica* a *arteria cerebralis*. *Arteria palatina anterior* pokračuje kraniálně, v rostrální oblasti se napojí na příčnou spojku mezi *arteria spinalis* a *arteria palatina posterior* a spojí se tak s oběma cévami (obr. 8 H).

IV. aortální oblouk pokračuje jako hlavní kmen pro přívod krve do těla. IV. aortální oblouk jde laterálně a pak se dorsálně stáčí a napojuje se na *aorta dorsalis lateralis*. U tohoto stádia již nelze rozeznat, kde končí IV. aortální oblouk a kde začíná *aorta dorsalis lateralis*. Mediálně se z *aorta dorsalis lateralis* odděluje *arteria occipito-vertebralis*, která se větví k týlní oblasti a jedna její větev se napojuje na *arteria spinalis*. *Arteria spinalis* vede kraniálně i kaudálně pod mozkem a míchou. V oblasti míchy se dělí na dvě cévy, které se okolo sebe obtáčí, aby se zase spojily do nepárové *arteria spinalis*. Z *aorta dorsalis lateralis* vzniká *arteria subclavia*, ze které se před vstupem do přední končetiny odděluje *arteria axillaris* pro laterální



Obrázek 8: Schéma postupného vývoje aortálních oblouků v průběhu metamorfózy *Pelobates fuscus*. Dorsální pohled, pouze pravá strana. (A) Larvální stádia 50-53 NF. (B) Začátek metamorfózy ve stádiu 56 NF. (C) Stádium 57 NF. (D) Stádium 58 NF. (E) Metamorfóza ve stádiu 61 NF. (F) Stádium 62 NF. (G) stádium 63 NF, období největších změn ve stavbě aortálních oblouků. (H) Stádium 65 NF. (I) Konec metamorfózy ve stádiu 66 NF. Nakresleno podle originálních preparátů, bez měřítka. Obrázek je převzatý z publikace Kolesová et al. (2007).

stranu těla. *Aorta dorsalis lateralis* pak pokračuje kaudálně a v mediánní rovině se setkává se s *aorta dorsalis lateralis* z druhé poloviny těla a společně tvoří nepárovou *aorta dorsalis*. V tomto stádiu je již nepárová céva, ze které vznikají *arteriae iliaceae* silnější než *aorta caudalis*, proto se zdá, že se redukovaná *aorta caudalis* odděluje od cévního kmenu k zadním končetinám.

V. aortální oblouk je u tohoto stádia vytvořen jen jako ventrálně uložená drobná céva, která se odděluje od VI. aortálního oblouku a po krátkém úseku zaniká (obr. 4 D).

VI. aortální oblouk odstupuje laterálně z *truncus arteriosus*, pak se kaudálně stáčí a rozděluje se na *arteria cutanea* a na *arteria pulmonalis*. *Arteria cutanea* jde nejdříve kraniálně, ale od místa anastomózy s *arteria palatina posterior* se stáčí kaudálně a větví se ke kůži boků a zad. *Arteria pulmonalis* je výrazně silnější než *arteria cutanea*, vede po laterální straně plic a vznikají z ní všechny cévy plic. Plice jsou u tohoto stádia velmi dobře vyvinuty, plicní váčky jsou plné vzduchu a podílí se na dýchání (obr. 7 C).

Stádium 66 NF

V tomto stádiu se dokončují děje z předcházejících stádií. Kličky na aortálních obloucích, které zůstaly po redukcí žaber, se dále zkracují (obr. 8 I). Karotidový labyrint se dále rozvíjí. III. aortální oblouk pokračuje plynule do *arteria carotis interna*, která se větví stejně jako u předcházejícího stádia. IV. aortální oblouk je plynule napojen na *aorta dorsalis lateralis* a je tak hlavním kmenem pro přívod krve do těla. *Aorta dorsalis lateralis* je utlačována rozvíjejícími se plicemi a je uložena blíže k mediánní rovině. Její větve jsou stejné jako v předcházejících stádiích, nejvíce se z nich rozvíjí *arteria subclavia*. V. aortální oblouk úplně zanikl. VI. aortální oblouk se napojuje na *arteria cutanea* a *arteria pulmonalis*, které se dále vyvíjejí.

Závěrem této kapitoly lze říci, že přestavbu aortálních oblouků v průběhu metamorfózy charakterizují následující děje. Spolu se zánikem vnitřních žaber dochází k redukcí kapilárního řečiště, přičemž krevní průtok zůstává zachován. Ve stádiu 63 NF dochází k rychlému uzavření a tím i zkrácení aortálních oblouků. V tomto stádiu metamorfózy také III., V. a VI. aortální oblouk ztrácí napojení na *aorta dorsalis*, redukcí *ductus caroticus* a *ductus Botalli*. V. aortální oblouk se začíná od svého dorsálního konce redukovat v důsledku růstu *m. petrohyoideus posterior*.

6.2 Vývoj cév žaberní oblasti u ptačích embryí; analýza vlivu Shh

6.2.1 Vývoj cév v oblasti žaberních oblouků

Vývoj cév v oblasti žaberních oblouků byl podrobně popsán u kuřecích embryí (Hiruma a Hirakow, 1995). U křepelčích embryí je vývoj cév velmi podobný, i když obecně lze říci, že jeho průběh v čase je mírně rychlejší. U křepelky se aortální oblouky vyvíjí, přestavují a zanikají o jedno až tři stádia (půlden) rychleji než u kuřat. První aortální oblouk se vyvíjí ve stádiu 15 HH jako jediná céva, která spojuje *aorta dorsalis et ventralis*. V tomto stádiu se také vyvíjí *vena cardinalis anterior* (obr. 9 A). Hned po prvním aortálním oblouku se začíná vyvíjet i druhý aortální oblouk. Třetí aortální oblouk se tvoří ve stádiu 18 HH (obr. 9 B) a čtvrtý aortální oblouk se vyvíjí ve stádiu 20 HH. Ve stádiu 21 HH se tvoří pátý a šestý aortální oblouk, které jsou plně vytvořeny ve stádiu 23 HH (obr. 9 C, D). První a druhý aortální oblouk nepřetrvávají až do dospělosti, ale transformují se do kapilární pleteně již ve stádiu 18 HH. Podobně také ve stádiu 24 HH zaniká pátý aortální oblouk, který spíše tvoří větev většího šestého aortálního oblouku. Zatímco první, druhý a pátý aortální oblouk zanikají, třetí, čtvrtý a šestý aortální oblouk přetrvávají až do dospělosti a podílí se na vzniku velkých cév.

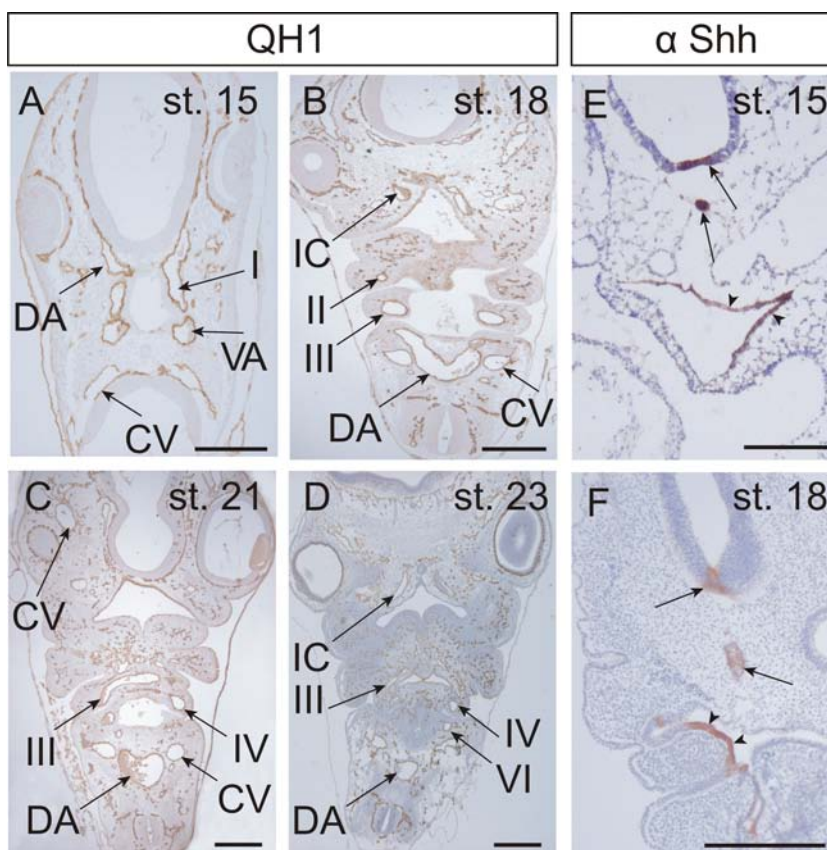
Drobné cévy žaberních oblouků se vyvíjí až v pozdějších stádiích. Ve stádiu 15 HH jsou aortální oblouky jediné cévy, které zásobují žaberní oblouky (obr. 9 A). Ve stádiu 18 HH se začínají tvořit drobné větve z aortálních oblouků, *aorta dorsalis* a *vena cardinalis anterior*. Ve stádiích 21 a 23 HH vývoj drobných větví a kapilár v embryu pokračuje a vytváří se kapilární pleteně v mesenchymu žaberních oblouků i oblasti okolo mozku a oka (obr. 9 C, D).

Embrya od stádia 18 HH obsahují mimo vytvořených funkčních cév a kapilár také množství volných angiogenních buněk, které jsou rovnoměrně rozloženy v mesenchymu (obr. 9 B, C, D). Nejvíce volných angiogenních buněk je v oblasti okolo *vena cardinalis anterior* a v žaberních obloucích, zatímco okolo *aorta dorsalis* se tyto buňky skoro nevyskytují.

6.2.2 Inhibice Shh signalizace pomocí anti-Shh protilátky produkované 5E1 hybridomovými buňkami

Expresce Shh v normě

Sledovali jsme expresi Shh u křepelky a ukázalo se že lokalizace Shh i načasování jeho exprese je stejné jako u kuřat (Roelink et al., 1995). Ve všech stádiích, která jsme studovali, je Shh exprimován nejprve v chordě, která indukuje expresi Shh v přilehlé části nervové trubice (spodinové ploténce – floor plate). Od stádia 15 HH se Shh exprimuje také v entodermu přední části střeva. Jeho exprese není rovnoměrně rozložena v celém entodermu, ale zvláště od stádia 18 HH je lokalizována

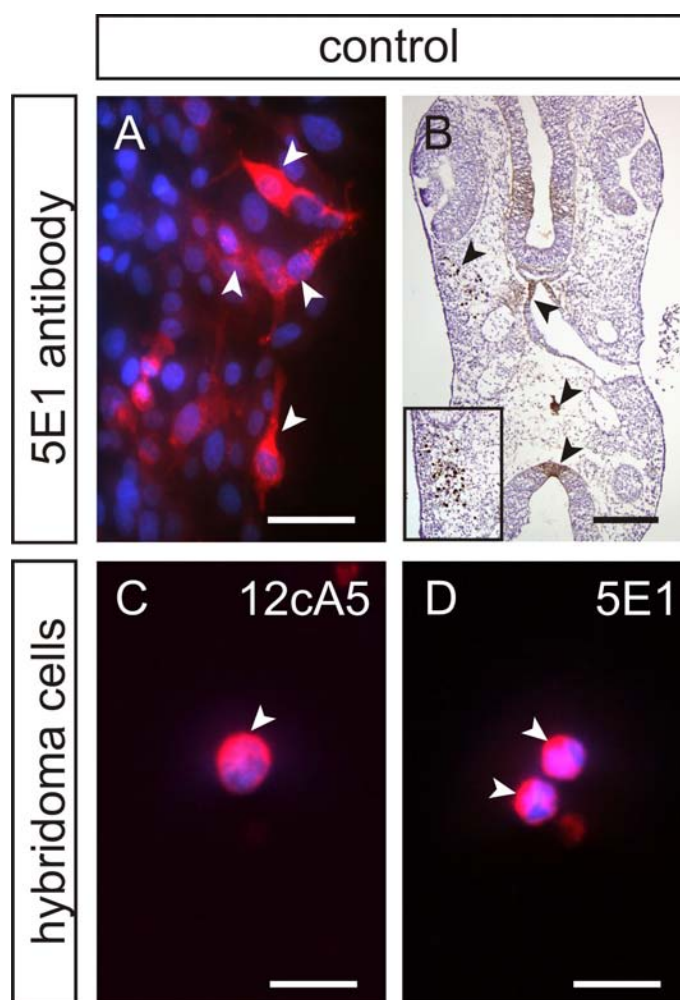


Obrázek 9: (A–D) Normální vývoj cév hlavy a krku u křepelčích embryí. Cévy jsou značeny QH1 protilátkou. (E–F) Exprese Shh značeného 5E1 protilátkou. (A) Embryo ve stádiu 15 HH s vytvořeným prvním aortálním obloukem (I), který spojuje *aorta ventralis* (VA) s *aorta dorsalis* (DA). *Vena cardinalis anterior* (CV) (B) Embryo ve stádiu 18 HH má vytvořený druhý (II), třetí (III) a čtvrtý (není zde patrný) aortální oblouk. Kraniální pokračování *aorta dorsalis* (DA) se nazývá *arteria carotis interna* (IC). (C) Stádium 21 HH. Viditelný čtvrtý aortální oblouk (IV). (D) Stádium 23 HH s vytvořeným pátým (V) a šestým (VI) aortálním obloukem. (E–F) Exprese Shh znázorněná 5E1 protilátkou u normálních embryí. (E) stádium 15 HH a (F) stádium 18 HH. Shh je produkován v chordě, spodinové ploténce nervové trubice (floor plate) a v přední části střeva a oblasti žaberních oblouků (šipky). Transverzální řezy, D, F dobarveno hematoxilinem, Měřítka je 100 μm na všech obrázcích. Obrázek je převzatý z publikace Kolesová et al. (2008).

na vnitřní straně I., II. a III. žaberního oblouku a dále pak v mediální rovině ve stropu a spodině embryonálního hltanu (obr. 9 E, F).

Ověření inhibice Shh *in vitro*

Naším cílem bylo inhibovat Shh signalizaci, proto jsme ověřovali zda postupy, které chceme použít, jsou účinné. Nejdříve jsme *in vitro* testovali vazebnou schopnost



Obrázek 10: Kontrola specificity protilátky, hybridomových buněk a jejich aplikace *in vivo*. (A) Na fibroblasty, které produkují Shh (QT6 buňky), se váže anti-Shh (5E1) protilátka. Měřítko je 200 μm . (B) Aplikace hybridomových buněk produkujících 5E1 protilátku do paraaxiálního mezodermu embrya. Protilátka pronikala embryem do všech míst produkce Shh (šipky) a hybridomové buňky byly také pozitivní (výřez). Měřítko je 200 μm . (C) Hybridomové buňky 12cA5, také *in vitro* váží sekundární protilátku. Měřítko je 100 μm . (D) Hybridomové buňky 5E1, které produkují anti-Shh protilátku, také *in vitro* váží sekundární protilátku. Měřítko je 100 μm .

anti-Shh protilátky, kterou produkují 5E1 hybridomové buňky. Také jsme ověřovali produktivitu 5E1 hybridomových buněk.

Protilátku 5E1 jsme testovali na tkáňové kultuře transgenních křepelčích fibroblastů (QT6) (Duprez et al., 1998), které produkují Shh. Na tuto kulturu jsme aplikovali primární anti-Shh (5E1) protilátku a pomocí značené protilátky druhého kroku jsme prokázali její vazbu na QT6 buňky (obr. 10 A).

Dále jsme ověřovali schopnost 5E1 hybridomových buněk produkovat takové množství protilátky, které lze imunohistochemicky prokázat. K buněčné kultuře 5E1

hybridomových buněk jsme proto přidali značenou sekundární protilátku (goat anti-mouse antibody) a ověřovali jsme její vazbu na 5E1 buňky. Tento pokus ukázal, že hybridomové buňky protilátku, kterou tvoří, nejen uvolňují do okolí, ale i udržují na svém povrchu (obr. 10 C–D). Můžeme tedy konstatovat, že účinnost anti-Shh (5E1) protilátky je prokazatelná.

Ověření inhibice Shh *in vivo* po aplikaci 5E1 buněk k žaberní oblasti

V objemu 20 μ l bylo skleněnou kapilárou aplikováno přibližně 10^7 buněk 5E1 pod vitelinní membránu do žaberní oblasti embryí ve stádiích 10–12 HH. Embrya jsme reinkubovali a analyzovali ve stádiích 18–23 HH. Na kryostatových řezech jsme po aplikaci sekundární protilátky zjistili, že 5E1 protilátka proniká do embrya a je prokazatelná i v jeho axiálních strukturách (obr. 11 B). Její vazba byla patrná v chordě, spodinové ploténce nervové trubice a entodermu přední části střeva, tedy ve všech místech produkce Shh. Sekundární protilátka také reagovala s 5E1 buňkami, které adherovaly k povrchu embrya (obr. 11 A–B).

Ověření inhibice Shh *in vivo* po aplikaci 5E1 buněk do paraaxiálního hlavového mezodermu

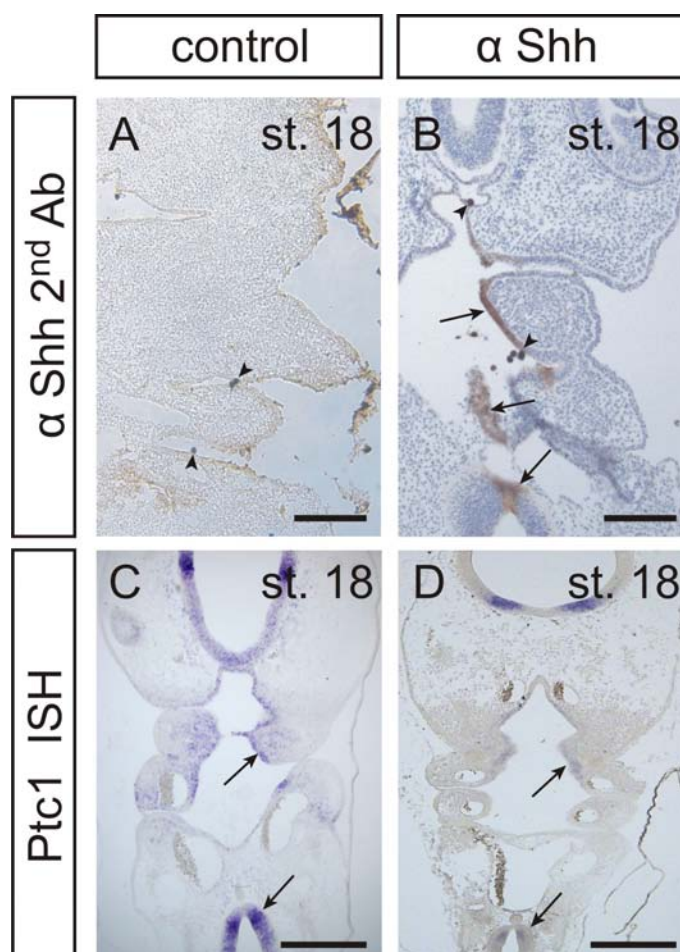
Ověřili jsme i možnost implantace 5E1 hybridomových buněk do paraaxiálního mezodermu, který obsahuje prekurzory endotelových buněk. Tento přístup je ovšem spojen s rizikem mechanického poškození embrya ve studované oblasti. Skleněnou mikrokapilárou bylo injektováno 10 μ l s přibližným množstvím $5 \cdot 10^6$ buněk 5E1. Zjistili jsme, že hybridomové buňky zůstaly lokalizovány na operované straně embrya v oblasti okolo vpichu. Protilátka ale pronikala embryem až na protilehlou stranu (obr. 10 B). Přesto, že při odběru ve stádiu 18 HH nebylo místo vpichu patrné, nelze zcela vyloučit možnost poškození embrya.

Jako kontrolní pokus k aplikaci hybridomových buněk do žaberní oblasti a kontrolu případných vedlejších účinků myších immonoglobulinů jsme požili hybridomové buňky 12cA5. Tyto hybridomové buňky produkují anti-HA-tag protilátku, která nereaguje se strukturami ptačích embryí. Zjistili jsme, že fenotyp těchto embryí byl shodný s normálními neoperovanými jedinci. Sekundární protilátka se navázala na povrch 12cA5 buněk, ale ne na žádné struktury embrya (obr. 11 C–D).

Expresse Shh receptoru *ptc1* v normě a po inhibici anti-Shh protilátkou

Abychom skutečně dokázali blokaci Shh, a nejen to, že se protilátka navázala na všechna místa jeho produkce, analyzovali jsme expresi *ptc1*.

Ptc1 je membránovým receptorem pro Shh a také genem který je Shh signální kaskádou přímo regulován. Při zvýšení Shh signalizace se následně zvýší exprese *ptc1* a tím i množství *Ptc1* receptoru na membráně (Marigo a Tabin, 1996).



Obrázek 11: Inhibice Shh odpovědi pomocí 5E1 (anti-Shh) protilátky produkované hybridomovými buňkami. (A–B) Embryo stádia 18 HH s hybridomovými buňkami aplikovanými ve stádiu 11 HH. Řezy jsou inkubovány jen se sekundární protilátkou. (A) Embryo s aplikovanými kontrolními 12cA5 hybridomovými buňkami. Protilátka se nikde nenavázala, pouze hybridomové buňky jsou značené sekundární protilátkou (šipka). (B) Embryo s aplikovanými 5E1 buňkami, které produkují anti-Shh protilátku. Protilátka se *in vivo* navázala na všechna místa produkce Shh: chordu, spodinovou ploténku nervové trubice a endoderm žaberních oblouků (šipky). Hybridomové buňky jsou také pozitivní (šipky). Řezy jsou dobarveny hematoxilinem, měřítko je 400 μm . (C–D) Expresa *ptc1*, který je cílovým genem Shh signální kaskády. (C) Kontrolní embryo s aplikovanými 12cA5 hybridomovými buňkami má normální distribuci *ptc1* ve ventrální části nervové trubice, v endodermu žaberních oblouků a v okolním mesenchymu (šipky). (D) Embryo s aplikovanými 5E1 hybridomovými buňkami má sníženou hladinu tvorby *ptc1*. Zbytková exprese *ptc1* je pouze ve ventrální části nervové trubice a v několika oblastech v endodermu žaberních oblouků (šipka). Žádná produkce *ptc1* není v mesenchymu. Měřítka je 200 μm . Obrázek je převzatý z publikace Kolesová et al. (2008).

Míru exprese mRNA *ptc1* jsme hodnotili pomocí hybridizace *in situ* na řezech na základě intenzity hybridizačního signálu. *Ptc1* byl produkován v oblastech, které těsně přiléhají nebo jsou shodné s oblastmi produkce Shh. V chordě a ve spodinové ploténce nervové trubice nebyl *ptc1* produkován vůbec, zatímco v jejich těsném okolí jeho exprese byla velmi vysoká. V entodermu přední části střeva byl *ptc1* také exprimován. V řezech bylo možné pozorovat postupný slábnoucí gradient *ptc1* od všech míst produkce Shh, který odrazil míru odpovědi na Shh signalizaci (obr. 11 C).

Embrya s aplikovanými 5E1 hybridomovými buňkami vykazovala zřetelně sníženou expresi *ptc1*. *Ptc1* exprese byla snížena v oblasti nervové trubice a entodermu a gradient *ptc1* v okolním mesenchymu vymizel úplně (obr. 11 D).

Tímto jsme prokázali, že aplikace 5E1 buněk produkujících anti-Shh protilátku účinně inhibuje Shh signalizaci. Zbytková exprese *ptc1* v nervové trubici a entodermu, nemusí nutně znamenat nedokonalou inhibici Shh, neboť signální dráha Shh je shodná se signální dráhou Ihh (Indian hedgehog). Ihh není blokován anti-Shh protilátkou, a jeho signalizace tedy přetrvává (Goodrich et al., 1997; Carpenter et al., 1998).

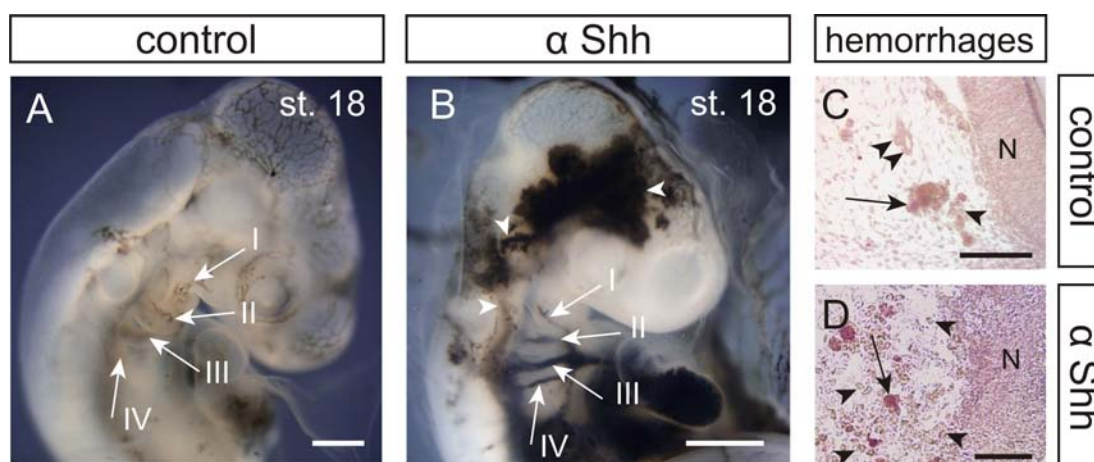
V této souvislosti je třeba uvést, že embrya s aplikovanými 5E1 buňkami se vyvíjela bez makroskopicky patrných malformací, které se vyskytují po inhibici Shh cyclopaminem (cyclopie, open brain syndrome). V řadě případů však byla velikost mozkové části hlavy menší než u kontrolních embryí (obr. 12 A–B). Podobný fenotyp, který naznačuje sníženou proliferační aktivitu buněk, jsme také našli u Shh inhibovaných embryí (Ahlgren a Bronner-Fraser, 1999).

6.2.3 Malformace cév u Shh inhibovaných embryí

Vliv inhibice Shh na vývoj cév hodnocený nástřikem tuší

Vliv inhibice Shh pomocí 5E1 protilátky na vývoj cévního systému jsme hodnotili nejprve makroskopicky po nástřiku cév tuší. Zatímco se u kontrolních embryí stádia 18 HH první a druhý aortální oblouk transformoval do kapilárních pletení, u 5E1 inhibovaných embryí si zachovával první a druhý aortální oblouk stále ještě původní tvar (obr. 12 A–B). Tento nález ukazuje, že inhibice Shh zpomalila přestavbu prvních dvou aortálních oblouků. Třetí a čtvrtý aortální oblouk se u inhibovaných a kontrolních embryí neliší.

Dále jsme po nástřiku cév tuší pozorovali u Shh inhibovaných embryí rozsáhlé výrony mimo cévy, hlavně z *vena cardinalis anterior* v hlavové oblasti. U žádného z kontrolních embryí tento jev pozorován nebyl. Znamená to, že *vena cardinalis anterior* po inhibici Shh hůře odolává tlaku a její stěna je pravděpodobně neúplně vyvinutá (obr. 12 A–D). Je třeba také uvést, že v řezech Shh inhibovaných embryí, kde cévy nebyly nástřikovány tuší, se v mesenchymu okolo *vena cardinalis anterior*



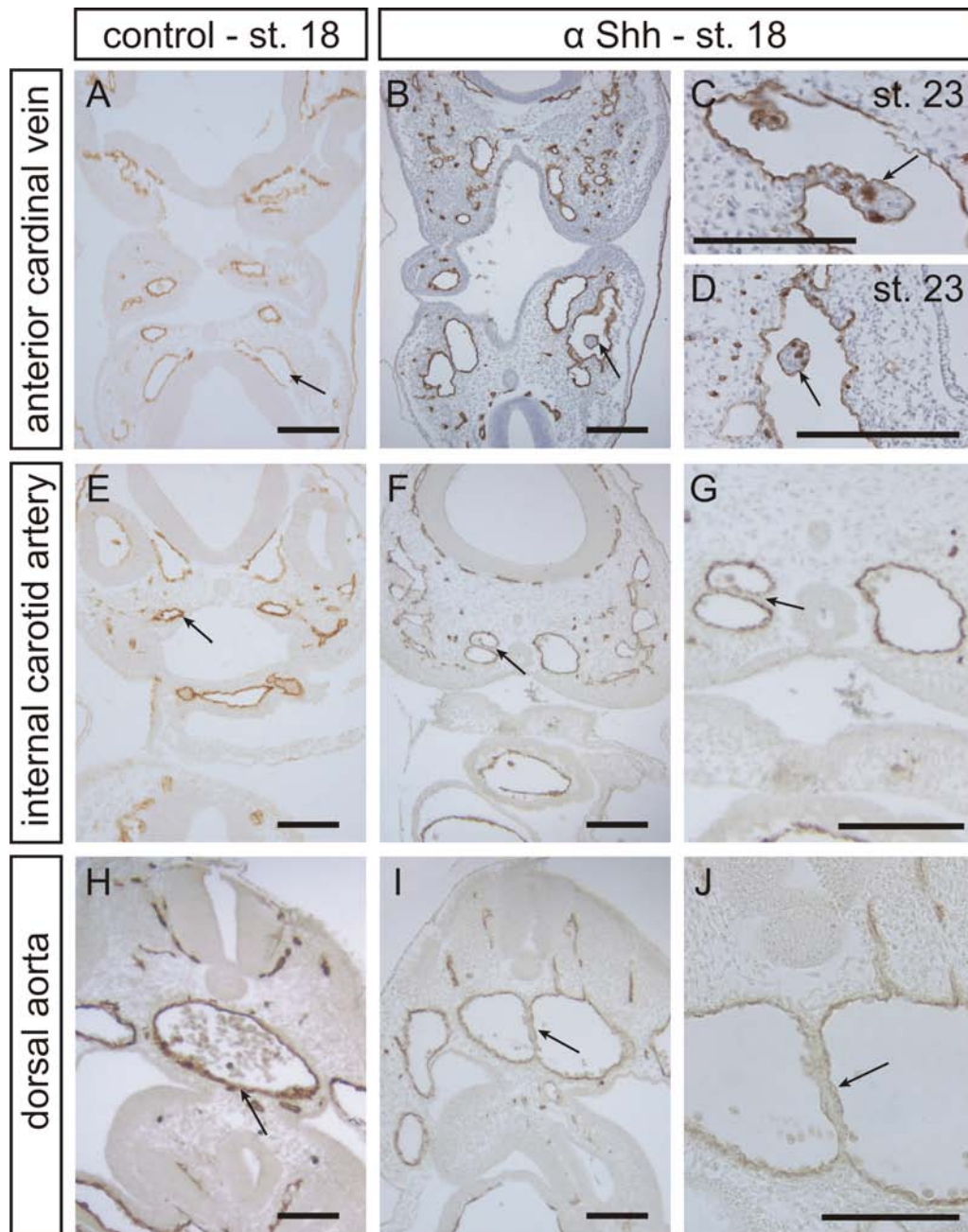
Obrázek 12: Nástřík cévního systému tuší, stádium 18 HH. (A) U kontrolních embryí první a druhý aortální oblouk zanikají do kapilárních pletení (bílé šipky I a II). Hlavní cévou, která vede krev do *aorta dorsalis* je třetí aortální oblouk (bílá šipka III). Čtvrtý aortální oblouk se začíná vyvíjet (bílá šipka IV). Dobře patrné jsou normální kapiláry a cévy, které vedou krev z hlavy do *vena cardinalis anterior*. (B) Embrya s inhibovanou funkcí Shh mají menší hlavu v porovnání s kontrolou. Také vývoj aortálních oblouků je zpomalený. První a druhý aortální oblouk (bílé šipky I a II) jsou stále dobře vytvořeny a tvoří funkční cévy mezi *aorta ventralis et dorsalis*. Třetí a čtvrtý oblouk jsou normálně vytvořeny (bílé šipky III a IV). Velké množství tuše při nástřiku uniká z drobných hlavových žil a z *vena cardinalis anterior* (bílé šipky). Měřítka je 500 μm . (C, D) Parafínové řezy oblastí *vena cardinalis anterior* značené kyselou fosfatázou. N – neuroepitel, (C) Kontrolní embryo. Červené krvinky (šipky) jsou přítomné jen uvnitř cév. Několik macrophage-like cells (šipky). (D) Embryo s inhibovaným Shh. Mnoho krevních buněk je mimo cévy (šipky) a macrophage-like cells (šipky) je více než u kontrolních embryí. Měřítka je 200 μm . Obrázek je převzatý z publikace Kolesová et al. (2008).

nacházely skupinky erytrocytů, jako důsledek vzniklých extravazátů (obr. 12 C–D).

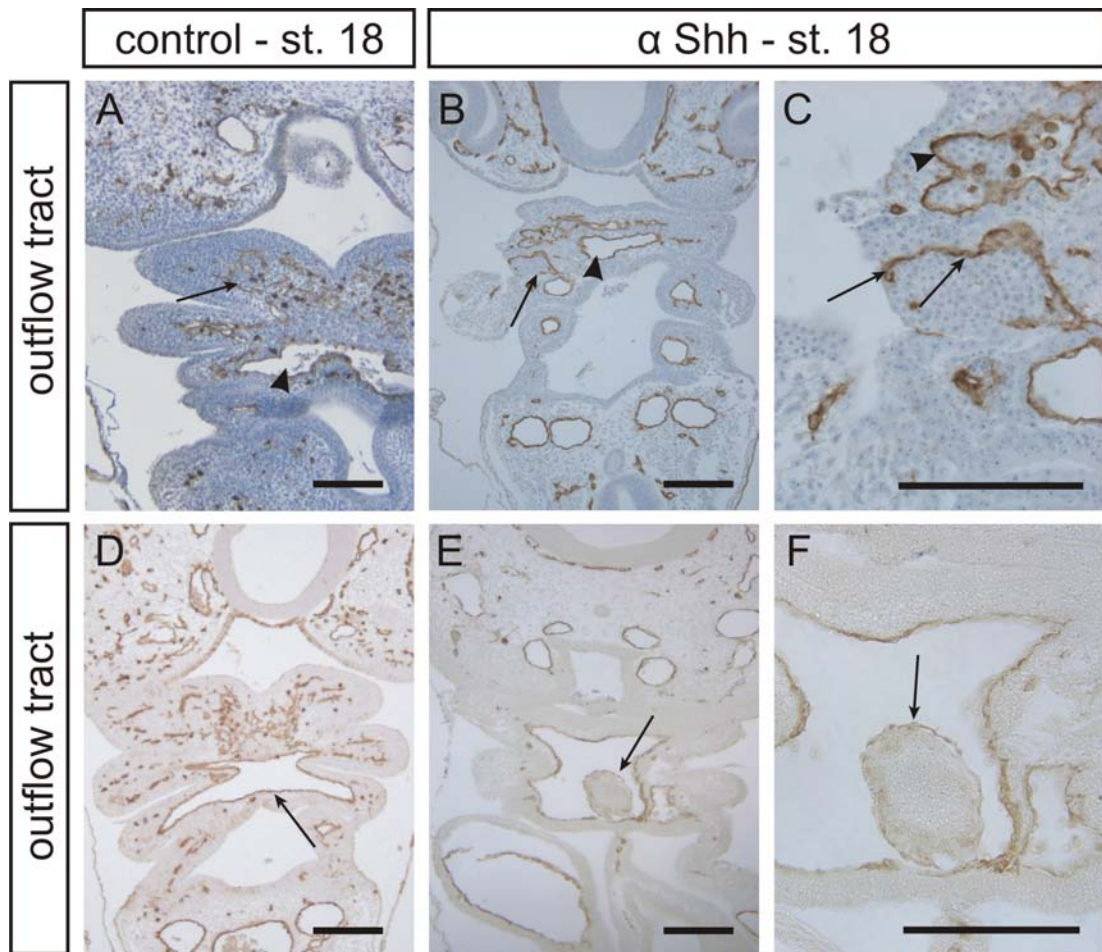
Vliv Shh inhibice na endotel cév značený QH1 protilátkou; snížená stabilita cévní stěny a opožděná přestavba arteriálního řečiště

Stavbu cévního řečiště jsme dále hodnotili v parafínových řezech po znázornění endotelu protilátkou QH1. Na řezech z Shh inhibovaných embryí se ukázalo, že lumen *vena cardinalis anterior* je nepravidelné a s invaginacemi cévní stěny (obr. 13 A–D). Tento nálezn je v souladu se vznikem krevních výronů pozorovaných v oblasti *vena cardinalis anterior* po nástřiku tuší.

Vývojové abnormality byly po aplikaci 5E1 protilátky patrné i v arteriálním řečišti. *Arteria carotis interna*, která je u normálních embryí kulatá, měla po inhibici Shh vytvořené septum v délce přibližně 40 μm . Toto septum tvořily dvě vrstvy endotelu, mezi kterými byl mesenchym. Septum tak rozdělovalo část průběhu *arteria carotis*



Obrázek 13: Malformace endotelu u Shh inhibovaných embryí. Endotel cév je značený QH1 protilátkou. (A–D) Poruchy tvorby cévního lumen u *vena cardinalis anterior*. (A) Kontrolní embryo. (B) *Vena cardinalis anterior* má ve stádiu 18 HH nepravidelný tvar a obsahuje výčlipky endotelové a cévní stěny, které zasahují do lumen cévy (šipka). (C, D) Výčlipky cévní stěny *vena cardinalis anterior* jsou také vytvořeny u embryí stádia 23 HH. (E–G) Malformace *arteria carotis interna* ve stádiu 18 HH. (E) Kontrolní embryo. (F) *Arteria carotis interna* je horizontálním septem rozdělena na dvě cévy (šipka). (G) Detail septa, které je pokryto endotelem z obou svých stran (šipka). (H–J) Malformace *aorta dorsalis* ve stádiu 18 HH. (H) Kontrolní embryo. (I) Neúplná fúze *aortae dorsales* je patrná jako přetrvávající vertikální septum (šipka). (J) Detail přetrvávajícího septa (šipka). Transverzální řezy. B–D dobarveno hematoxilinem. Měřítko je 100 μ m. Obrázek je převzatý z publikace Kolesová et al. (2008).



Obrázek 14: Malformace endotelu u Shh inhibovaných embryí. Endotel cév je značený QH1 protilátkou. (A–C) Malformace výtokového traktu srdečního ve stádiu 18 HH. (A) Kontrolní embryo. (B) Endotelová výstelka výtokového traktu nevytvořila funkční luminozovanou cévu (šipka) a zůstala tak ve formě izolovaných pruhů endotelu s červenými krvinkami na jedné své straně (šipka). (C) Detail porušené endotelové trubice (šipka) a malformovaná céva s nepravidelným lumen (šipka). (D–F) Malformace výtokového traktu ve stádiu 18 HH. (D) Kontrolní embryo. (E) Ve výtokovém traktu se vytvořily výchlípky endotelové stěny vyplněné mesenchymem, které zasahují do jeho vnitřní dutiny (šipka). (F) Detail výchlípky cévní stěny (šipka). Transverzální řezy. A–C dobarveno hematoxilinem. Měřítko je 100 μ m. Obrázek je převzatý z publikace Kolesová et al. (2008).

interna na dvě cévy, které se ovšem rostrálně zase spojovaly. Septum naznačuje rozvětvení *arteria carotis interna* normálních embryí (obr. 13 E–G).

Podobně bylo po inhibici Shh vytvořeno abnormální septum v *aorta dorsalis*. Aortální septum probíhalo v délce přibližně 60 μ m a bylo také pokryto endotelem (obr. 13 H–J) a obsahovalo také hladké svalové buňky (obr. 17 C, D). Předpokládáme, že toto septum je pozůstatkem neúplné fúze dvou *radices aortae* v nepárovou

aorta dorsalis, která probíhá právě ve stádiu 18 HH a u normálních embryí je již dokončena.

Popsaná septa ve dvou různých lokalizacích byla pozorována opakovaně. Shh je tedy nutný pro fyziologický proces remodelace cévního řečiště.

Neúplný vývoj cévní stěny jsme pozorovali také ve výtokovém traktu srdečním. Byly patrné invaginace cévní stěny (obr. 14 D–F) a několik embryí mělo porušenou tvorbu části výtokového traktu, která byla tvořena pouze pruhem endotelu bez uzavřeného lumen. V okolním mesenchymu byl patrný extravazát (obr. 14 A–C).

Vliv Shh na expresi VEGFR2 v endotelových buňkách

V této části studie bylo zjišťováno zda Shh ovlivňuje expresi VEGFR2 receptoru v endotelových buňkách. VEGFR2 je receptorem pro růstový faktor endotelu krevních cév VEGF (Jaffredo et al., 1998). Zjistili jsme, že ve stádiu 18 HH je VEGFR2 exprimován ve všech endotelových buňkách drobných cév a kapilár (obr. 15 A, B). V cévách o větším průřezu, jako jsou aortální oblouky, je protein VEGFR2 prokazatelný pomocí protilátky pouze přibližně v polovině endotelových buněk (obr. 15 C, D). V *aorta dorsalis*, která je nejdříve vytvořenou intraembryonální cévou, je exprese VEGFR2 patrná pouze v místě napojení aortálních oblouků (obr. 15 E, F).

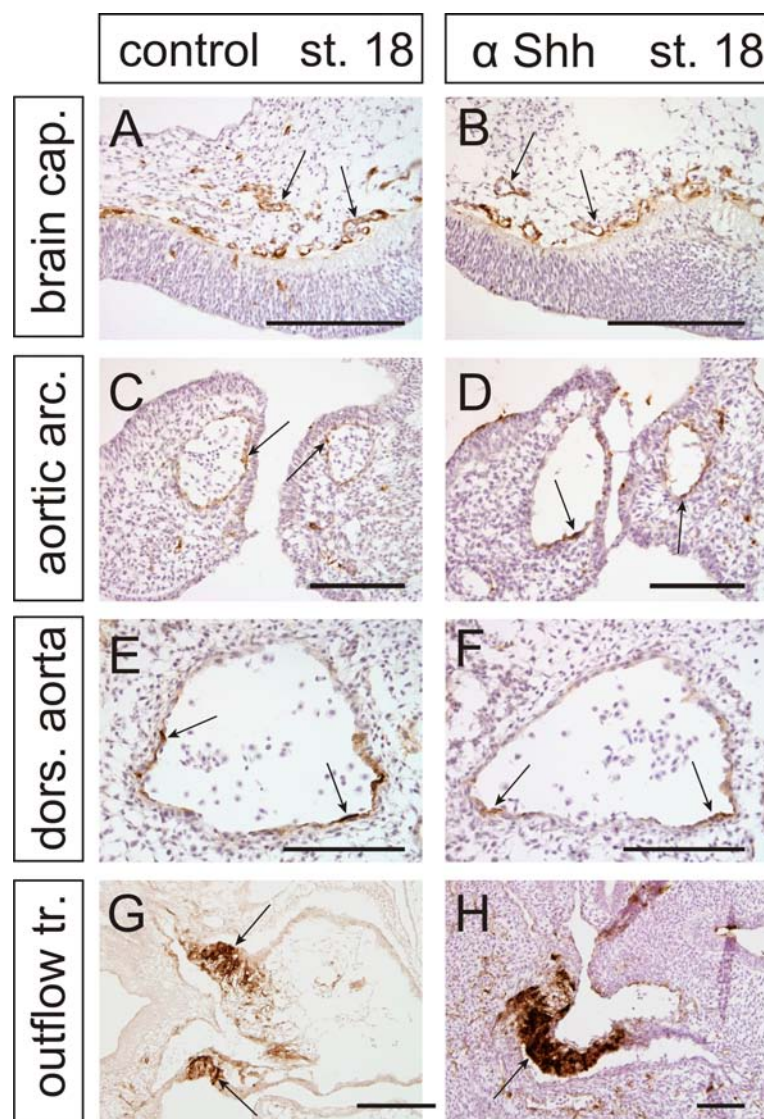
Při porovnání Shh inhibovaných embryí s normálními nebyl zjištěn žádný rozdíl v distribuci VEGFR2 ani rozdíl v intenzitě jeho signálu (obr. 15 A–H). To naznačuje, že signalizace Shh neovlivňuje expresi VEGFR2. Pravděpodobně tedy Shh nepůsobí na endotel prostřednictvím vlivu na signalizaci VEGF–VEGFR2.

Mimo endotelové buňky je VEGFR2 velmi silně exprimován v buňkách myokardu výtokového traktu srdečního, zatímco endotel výtokového traktu obsahuje pouze několik pozitivních buněk. Podle Wilting et al. (1997) tyto buňky myokardu vznikají transformací endotelových buněk (obr. 15 G–H a 16 A–B). VEGFR2 pozitivita je patrná také v chordě, kde ji již dříve zjistil Nimmagadda et al. (2004) aniž by zde byla funkce VEGFR2 zřejmá.

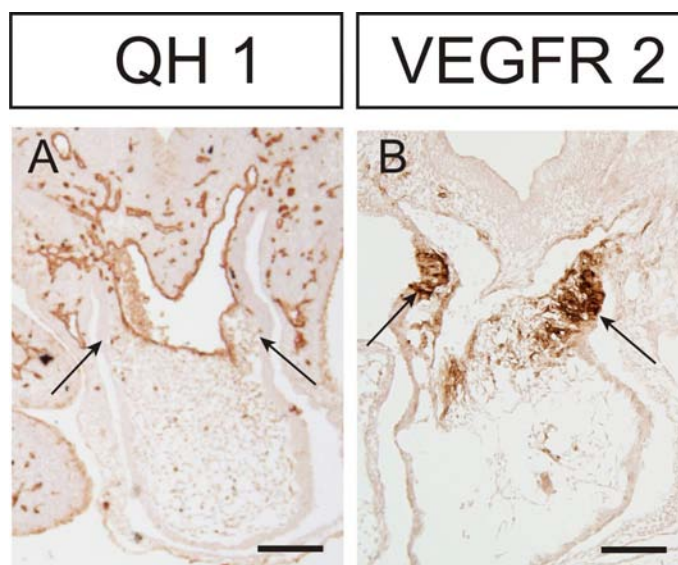
Vliv Shh na vývoj hladké svaloviny cévní stěny

Abychom zjistili, jestli Shh ovlivňuje také tvorbu hladké svaloviny ve stěně cév, studovali jsme dynamiku jejího rozložení pomocí anti-smooth muscle actin (anti-SMA protilátky). Ve stádiu 18 HH hladké svalové buňky kompletně pokrývají celý endotel *aorta dorsalis* a *arteria carotis interna* (obr. 17 A). Aortální oblouky mají hladké svalové buňky pouze na své laterální stěně a podobně i výtokový trakt srdeční je pouze částečně pokrytý hladkou svalovinou. V žilním řečišti není hladká svalovina patrná a to ani ve *vena cardinalis anterior*.

Ve stádiu 23 HH již aortální oblouky a výtokový trakt mají vytvořenou souvislou vrstvu hladké svaloviny (obr. 17 E). Také větve *arteria carotis interna* mají kom-



Obrázek 15: Expresa VEGFR2 u normálních a Shh inhibovaných embryí ve stádiu 18 HH. (A–B) VEGFR2 je produkován všemi endotelovými buňkami (šipky) vznikajících mozkových cév a kapilár. Úroveň exprese VEGFR2 se nemění po aplikaci 5E1 hybridomových buněk. (C–D) Pouze některé endotelové buňky aortálních oblouků produkují VEGFR2 (šipky). Úroveň exprese VEGFR2 se nemění po aplikaci 5E1 hybridomových buněk. (E–F) V *aorta dorsalis* jsou pozitivní buňky pouze v místech napojování aortálních oblouků (šipky). Úroveň exprese VEGFR2 se nemění po aplikaci 5E1 hybridomových buněk. (G–H) Ve výtokovém traktu srdečním je mimo několika málo endotelových buněk pozitivní pro VEGFR2 hlavně myokard výtokového traktu (šipky). Úroveň exprese VEGFR2 se nemění po aplikaci 5E1 hybridomových buněk. Všechny řezy jsou dobarveny hematoxilinem. Měřítko je 200 μ m.



Obrázek 16: Porovnání exprese QH1 a VEGFR2 ve výtokovém traktu srdečním u normálních embryí stádia 18 HH. (A) QH1 je produkováno všemi endotelovými buňkami výtokového traktu a i okolních cév. Myokard výtokového traktu je QH1 negativní (šipky). (B) VEGFR2 je produkováno pouze několika endotelovými buňkami výtokového traktu, ale hlavně je produkováno v jeho myokardu (šipky). řezy jsou dobarveny hematoxilinem. Měřítka je 200 μm .

pletní vrstvu hladkých svalových buněk. Svalová vrstva ve stěně *vena cardinalis anterior* ale stále chybí.

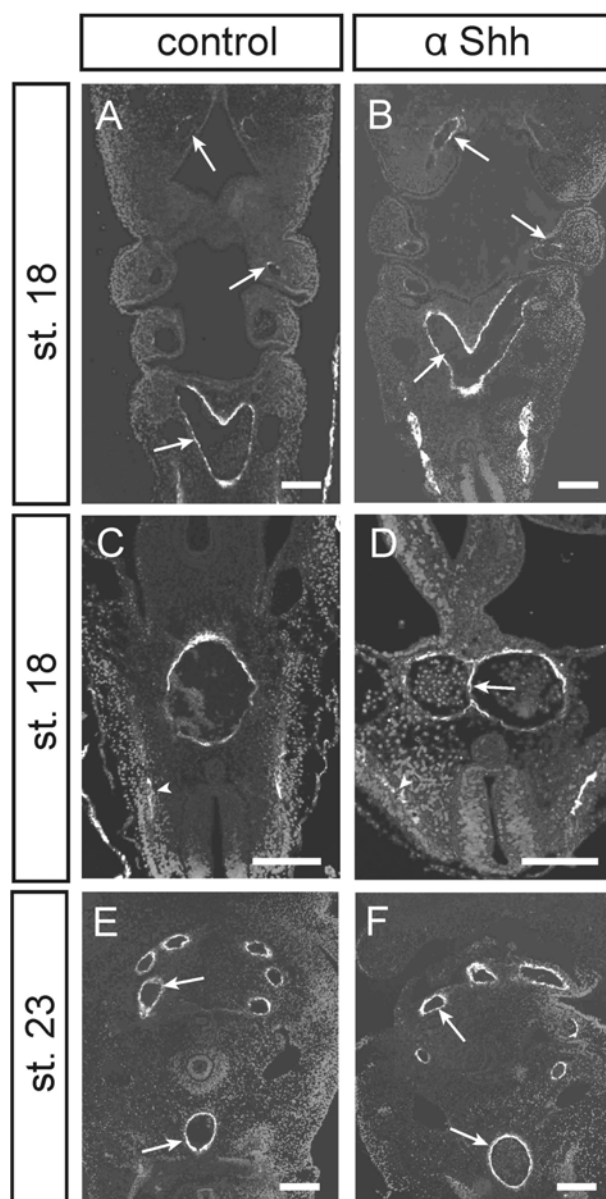
Zjistili jsme, že u Shh inhibovaných embryí je distribuce buněk hladké svaloviny v cévní stěně zcela identická s kontrolními embryi (obr. 17 B, F). Zajímavé je, že hladké svalové buňky jsou obsaženy také v persistujícím aortálním septu (obr. 17 C- D). Toto pozorování ukazuje, že Shh nemá vliv na vývoj svalové stěny cév.

Vedlejším výsledkem této části studie je zjištění, že hladký svalový aktin je také exprimován v myotomu (obr. 17 C), který je považován za zdroj příčně pruhované svaloviny.

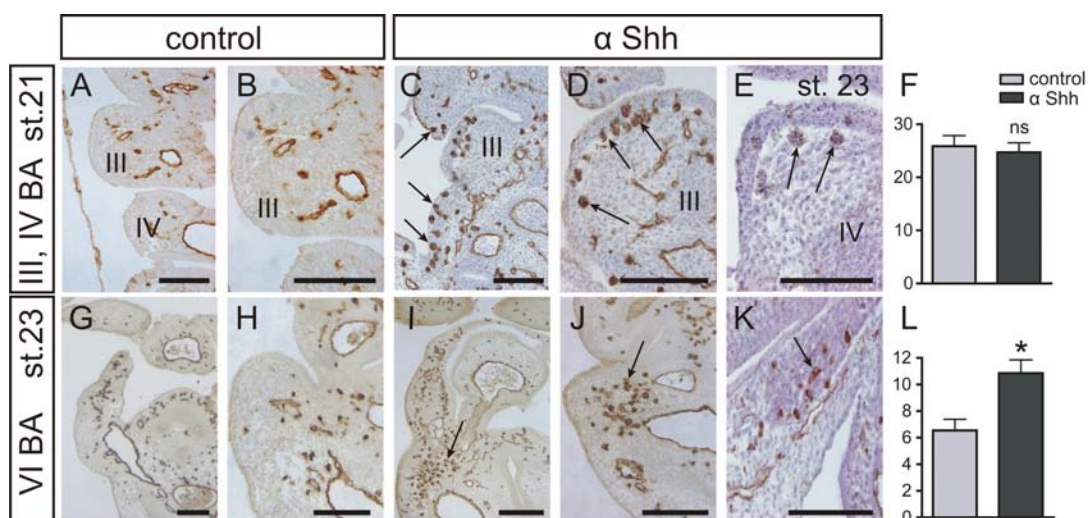
6.2.4 Angiogenní buňky a macrophage-like cells u Shh inhibovaných embryí

Výskyt volných angiogenních buněk po inhibici Shh; snížená tvorba cévních trubíc

Kromě změn pozorovaných ve stádiu 18 HH jsme po inhibici Shh od stádií 13–15 pozorovali ve stádiích 21–23 HH zvýšené množství volných angiogenních buněk identifikovaných na základě jejich QH1 pozitivitu. Tyto volné, kulaté angiogenní buňky nejsou součástí cévní stěny, vyskytují se ve shlucích a jejich odlišení od



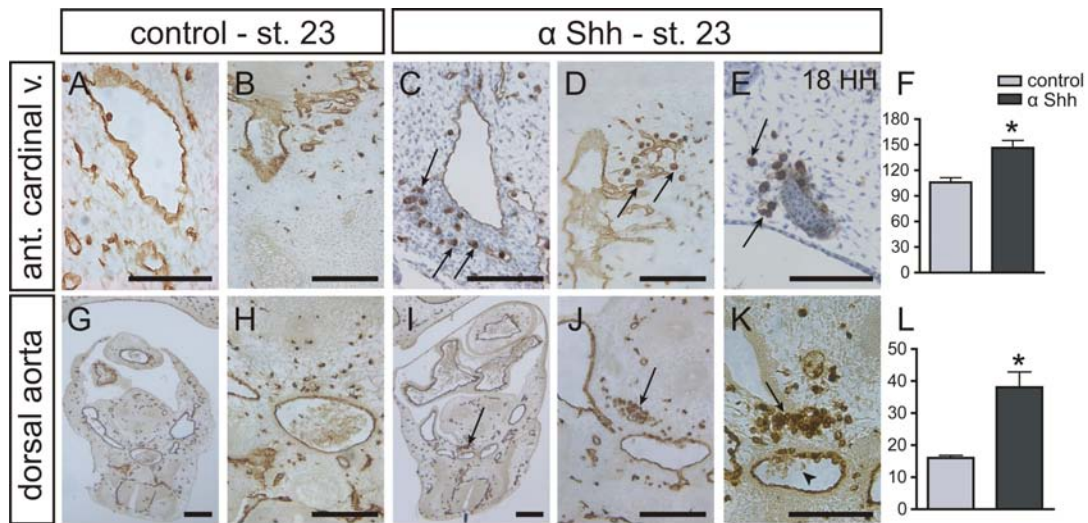
Obrázek 17: Výskyt hladké svaloviny ve stěně cév, značeno anti-smooth muscle actin protilátkou. (A–B) Hladké svalové buňky jsou v embryu stádia 18 HH přítomny ve stěně *aorta dorsalis*, *arteria carotis interna* a v laterální části aortálních oblouků (šipky). Embrya s aplikovanými 5E1 buňkami (B) mají shodnou distribuci hladkého svalového aktinu jako kontroly (A). Měřítko je $100\ \mu\text{m}$. (C–D) Hladké svalové buňky, také pokrývají poruchy endotelu způsobené inhibicí Shh. Embryo stádia 18 HH. (C) Normální situace v *aorta dorsalis*, (D) přetrvávající septum v *aorta dorsalis* je také pokryto hladkými svalovými buňkami. Šipky ukazují expresi hladkého svalového aktinu v myotomu. Měřítko je $100\ \mu\text{m}$. (E–F) Embryo stádia 23 HH. Hladké svalové buňky jsou přítomny v *aorta dorsalis*, *arteria carotis interna*, v celé stěně aortálních oblouků a výtokového traktu srdečního (šipky). Embrya s aplikovanými 5E1 buňkami (F) mají shodnou distribuci hladkého svalového aktinu jako kontroly (E). Měřítko je $200\ \mu\text{m}$. Obrázek je převzatý z publikace Kolesová et al. (2008).



Obrázek 18: Poruchy výskytu QH1-pozitivních buněk v žaberních obloucích embryí stádia 21 HH (A–D, F) a stádia 23 HH (E, G–L); (A–F) Volné QH1-pozitivní buňky v mesenchymu a ektodermu třetího a čtvrtého žaberního oblouku embryí stádia 21 HH (23 HH – E). (A, B) Kontrolní embrya. (C, D) Větší shluky volných QH1-pozitivních buněk (šipka) u embryí s inhibovaným Shh ve stádiu 21 HH, (E) nebo stádiu 23HH. (F) Graf ukazuje, že Shh inhibovaná embrya měla podobné množství volných QH1-pozitivních buněk jako kontroly. Tyto buňky ale byly uspořádány do shluků oproti výskytu izolovaných buněk u kontrol. Osa Y: průměrný počet volných QH1-pozitivních buněk ve třetím a čtvrtém žaberním oblouku. (G–L) Zvýšené množství QH1-pozitivních buněk v šestém žaberním oblouku embryí stádia 23 HH s inhibovaným Shh. (G, H) Kontrolní embrya. (I) Volné shluky QH1-pozitivních buněk (šipky) v distální části šestého žaberního oblouku. (J) detail. (K) zvýšené množství volných QH1-pozitivních buněk v proximální části žaberního oblouku (šipka). (L) Graf ukazuje zvýšené množství volných QH1-pozitivních buněk v šestém žaberním oblouku Shh inhibovaných embryí oproti kontrole. Osa-Y: průměrný počet volných QH1-pozitivních buněk v šestém žaberním oblouku. Transverzální řezy, C–E, K dobarveno hematoxilinem, Měřítka je 200 μ m. Grafy: směrodatná odchylka je znázorněna (*), hladina průkaznosti je 5 % ($p < 0.05$), (ns) není statisticky významný rozdíl. Obrázek je převzatý z publikace Kolesová et al. (2008).

dalších QH1 pozitivních buněk je uvedeno v dále. V časnějších stádiích se tyto buňky skoro nevyskytovaly. Shluky volných angiogenních buněk jsou typické pro oblast v okolí *vena cardinalis anterior*, okolí *aorta dorsalis* a aortální oblouky. Jejich shluky jsme nepozorovali u kontrolních embryí, v nichž jsou jednotlivé volné angiogenní buňky přítomny jen ojediněle.

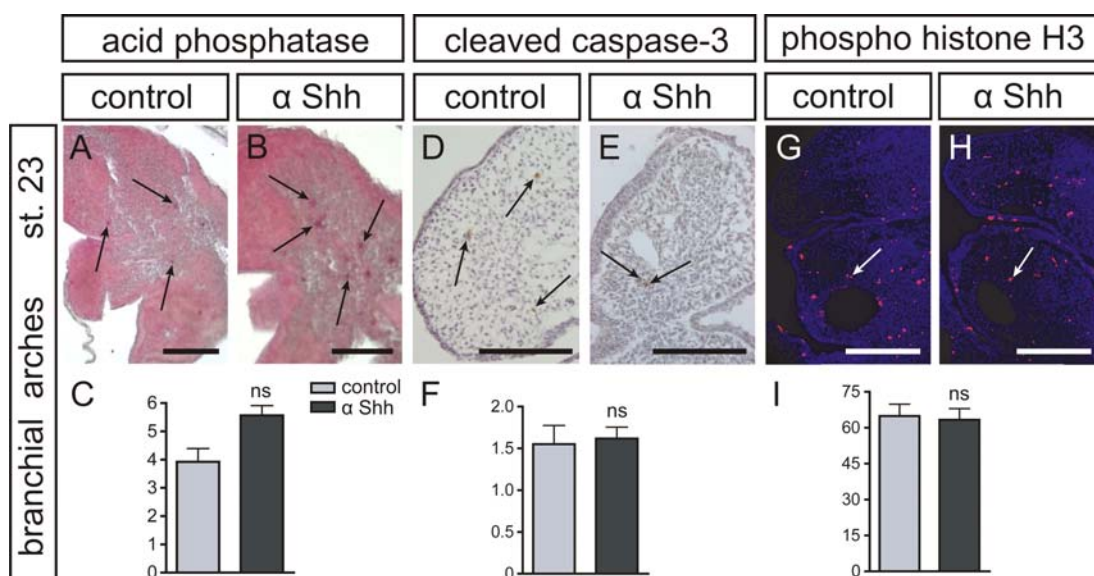
V oblasti I. a II. žaberního oblouku je počet volných angiogenních buněk po inhibici Shh shodný s kontrolními embryi. Ve III. a IV. žaberním oblouku jsou volné angiogenní buňky u Shh inhibovaných embryí přítomny ve shlucích, ale jejich počet je shodný s kontrolou. Tyto shluky byly hlavně vytvořeny v mesenchymu a někdy i v blízkosti ekto- nebo entodermu žaberních oblouků (obr. 18 A–F).



Obrázek 19: Anomálie ve výskytu QH1 pozitivních buněk v okolí *vena cardinalis anterior* a *aorta dorsalis* ve stádiu 23 HH (A–L); (A–F) Zvýšené množství QH1 pozitivních buněk v okolí *vena cardinalis anterior*. (A, B) kontrolní embrya. (C) Zvýšené množství QH1 pozitivních buněk (šípky) v okolí *vena cardinalis anterior* u Shh inhibovaných embryí. (D) Zvýšené množství QH1 pozitivních buněk (šípky) v okolí větví *vena cardinalis anterior*. (E) Volné shluky QH1 pozitivních buněk se v okolí *vena cardinalis anterior* vyskytují již ve stádiu 18 HH (šípky). (F) Graf znázorňuje zvýšené množství shluků QH1 pozitivních buněk v okolí *vena cardinalis anterior* v Shh inhibovaných embryích v porovnání s kontrolou. Osa Y: Průměrné množství QH1 pozitivních buněk v jednom řezu, směrodatná odchylka je naznačena. (G–L) Zvýšené množství shluků volných endotelových buněk v okolí *aorta dorsalis* ve stádiu 23 HH. (G, H) Kontrolní embrya. (I) Shluky volných QH1 pozitivních buněk na ventrální straně *aorta dorsalis* (šípka), (J) detail těchto shluků buněk (šípka). (K) QH1 pozitivní buňky jsou přítomny v mesenchymu (šípka) a hematopoietická oblast v *aorta dorsalis* je neporušena (šípka). (L) Graf ukazuje zvýšené množství shluků volných QH1 pozitivních buněk u Shh inhibovaných embryí v porovnání s kontrolou v oblasti okolo *aorta dorsalis*. Osa Y: průměrné množství shluků volných QH1 pozitivních buněk na jednom řezu, směrodatná odchylka je naznačena. Transverzální řezy; C, E dobarveno hematoxilinem. Měřítko je 200 μm na všech obrázcích. Grafy: Osa Y: průměrné množství pozitivních buněk na jednom řezu. Směrodatná odchylka je naznačena, (*) průkazný rozdíl ($p < 0.05$). Obrázek je převzatý z publikace Kolesová et al. (2008).

Kranio-kaudální gradient ve výskytu shluků volných angiogenních buněk vysvětlujeme tím, že vývoj prvních dvou žaberních oblouků je v tomto stádiu spíše zastaven, nedochází v nich k tvorbě nových cév a naopak jejich cévy zanikají do kapilárních pletení. Třetí a čtvrtý žaberní oblouk se tvoří hned po aplikaci 5E1 buněk a jejich vývoj je tedy ovlivněn jen částečně.

Šestý žaberní oblouk byl nejvíce ovlivněn inhibicí Shh a v jeho mesenchymu se vyskytovalo nejvíce shluků volných angiogenních buněk. Volné prekursorů endotelových buněk byly rovnoměrně rozmístěny v celém šestém žaberním oblouku a vyskytovaly se jak ve shlukách, tak jednotlivě. Také kontrolní embrya obsahovala



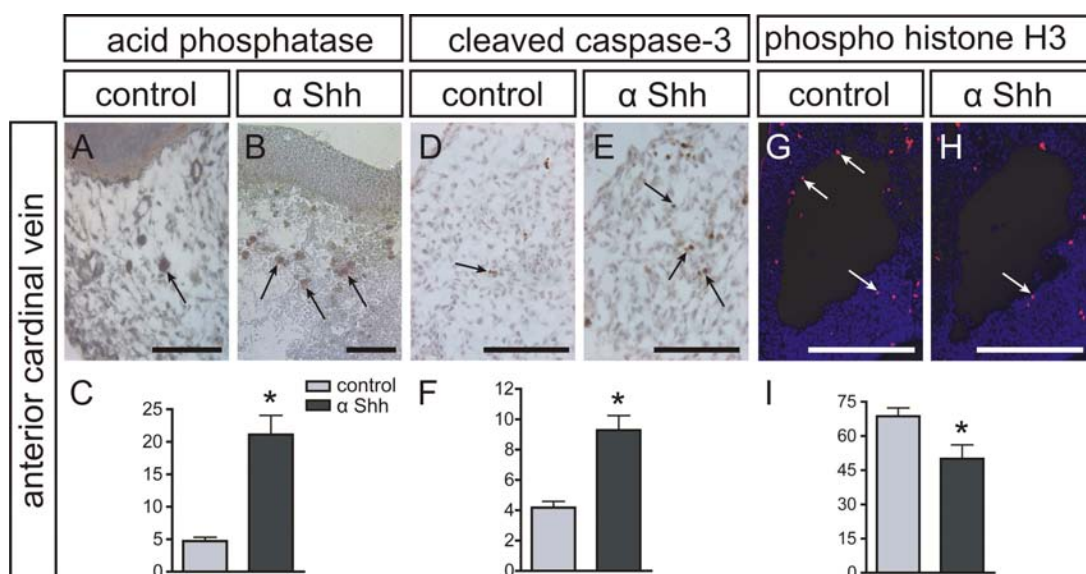
Obrázek 20: Podrobnější studie QH1-pozitivních buněk v žaberních obloucích embryí stádia stádia 23 HH: macrophage-like cells značené kyselou fosfatázou (A–C); apoptotické buňky pozitivní pro cleaved caspase-3 (D–F); proliferující buňky pozitivní pro fosfo-histon H3 (G–I). (A–C) Jen několik málo macrophage-like cells (šípky) se vyskytuje v žaberních obloucích. Inhibice Shh nemá výrazný efekt na jejich výskyt (C), proto jsou QH1-pozitivní buňky většinou volné endotelové buňky, které neutvořili funkční cévu. (D–F) Shh inhibice nemá také v oblasti žaberních oblouků vliv na úroveň apoptózy (šípky). (G–I) Žádný rozdíl v proliferaci v žaberníchobloucích kontrolních a Shh inhibovaných embryí (šípky). Transverzální řezy, D, E dobarveno hematoxilinem, Měřítka je 200 μm . Grafy: hladina průkaznosti je 5 % ($p < 0.05$), (ns) není statisticky významný rozdíl. Obrázek je převzatý z publikace Kolesová et al. (2008).

malé množství volných angiogenních buněk v šestém žaberním oblouku, ale jejich množství se po Shh inhibici výrazně zvýšilo a objevily se shluky těchto buněk (obr. 18 G–L).

Ačkoliv se nám nepodařilo kvantitativně vyjádřit rozdíl v hustotě kapilárního řečiště v žaberních obloucích u inhibovaných a kontrolních embryí, můžeme říci, že v místech normálního výskytu kapilárního řečiště je u Shh inhibovaných embryí zvýšené množství volných angiogenních buněk a méně kapilár.

Největší výskyt shluků volných angiogenních buněk po inhibici 5E1 protilátkou jsme pozorovali na ventrální straně *aorta dorsalis* (obr. 19 G–L). Je možné, že zvýšené množství QH1 pozitivních buněk v této oblasti souvisí s produkcí hemanogenních buněk z ventrálního endotelu *aorta dorsalis* (Jaffredo et al., 1998).

Výrazně zvýšené množství shluků volných angiogenních buněk bylo také v okolí *vena cardinalis anterior* (obr. 19 A–F) a to nejen ve stádiu 23 HH, ale i ve stádiích 18 a 21 HH. Zvýšené množství volných QH1 pozitivních buněk může souviset s vyšším výskytem macrophage-like cells v této oblasti (viz dále).



Obrázek 21: Podrobnější studie QH1 pozitivních buněk v okolí *vena cardinalis anterior* a *aorta dorsalis* ve stádiu 23 HH: macrophage-like cells značené průkazem kyselých fosfatáz (A–C); apoptotické buňky značené protilátkou proti aktivní kaspáze 3 (D–F); proliferující buňky značené protilátkou proti fosfo-histonu H3 (G–I). (A–C) Zvýšené množství macrophage-like cells značených kyselou fosfatázou (šipka) v oblasti okolo *vena cardinalis anterior* u Shh inhibovaných embryí. (C) Graf ukazuje výrazné zvýšené množství macrophage-like cells. (D–F) zvýšené množství apoptotických buněk pozitivních na aktivovanou kaspázu 3 (šipky) v okolí *vena cardinalis anterior* u Shh inhibovaných embryí. (F) Graf ukazuje zvýšené množství apoptotických buněk. (G–I) Snížená úroveň proliferace (šipky) značené protilátkou proti fosfo-histonu H3 v okolí *vena cardinalis anterior* u Shh inhibovaných embryí. (I) Graf ukazuje snížený výskyt proliferujících buněk po Shh inhibici. Transverzální řezy; D, E dobarveno hematoxilinem; A, B dobarveno fast green. Měřítko je 200 μ m na všech obrázcích. Grafy: Osa Y: průměrné množství pozitivních buněk na jednom řezu. Směrodatná odchylka je naznačena, (*) průkazný rozdíl ($p < 0.05$). Obrázek je převzatý z publikace Kolesová et al. (2008).

Výskyt macrophage-like cells

QH1 protilátka mimo endotelových buněk a jejich prekurzorů značí také krevní buňky bílé řady a jejich prekurzory. Protože volné angiogenní QH1 pozitivní buňky byly větší než endotelové buňky zavzaté do cévní stěny a vyskytovaly se ve shlucích, byla zde možnost, že alespoň část z nich jsou fagocytující buňky z bílé krevní řady. Z dalších bílých krvinek by v těchto raných embryonálních stádiích mohly být ještě přítomné lymfocyty a jejich prekurzory, ty jsou ale daleko menší a nevyskytovaly by se ve shlucích. Fagocytující buňky v rané embryogenezi jsou označovány jako macrophage-like cells, k odlišení od makrofágů jak jsou definovány v dospělosti (Cuadros et al., 1992). Abychom rozlišili endotelové buňky a jejich prekurzory od macrophage-like cells studovali jsme řezy z Shh inhibovaných embryí pomocí průkazu kyselých fosfatáz rezistentní ke kyselině vinné. Její pozitivita

je charakteristická pro fagocytující buňky (Cuadros et al., 1992). Touto metodou jsme prokázali, že část QH1 pozitivních buněk v okolí *vena cardinalis anterior* jsou macrophage-like cells (obr. 21 A–C). V žaberních obloucích, ve výtokovém traktu a ani v okolí *aorta dorsalis* se nevyskytovalo zvýšené množství macrophage-like cells u Shh inhibovaných embryí oproti kontrole (obr. 20 A–C). Zvýšené množství QH1 pozitivních buněk v těchto oblastech tedy dokládá, že po Shh inhibici se objevuje zvýšené množství volných angiogenních buněk, které neutvořily cévní stěnu a zůstávají v mesenchymu jen ve formě shluků.

Apoptóza a proliferace u Shh inhibovaných embryí

Při analýze vlivu aplikace 5E1 protilátky jsme také studovali vliv inhibice Shh na frekvenci výskytu apoptózy a na proliferační aktivitu v oblasti žaberních oblouků. Je totiž známo, že při ztrátě Shh signalizace se zvyšuje frekvence výskytu buněk v apoptóze a snižuje se úroveň proliferace (Jeong et al., 2004; Brito et al., 2006). Ve stádiu 23 HH jsme po Shh inhibici pozorovali zvýšený výskyt mesenchymových apoptotických buněk, identifikovaných na základě pozitivivity pro aktivovanou kaspázu 3, pouze v okolí *vena cardinalis anterior* (obr. 21 D–F). Ve srovnání s kontrolou byl počet apoptotických buněk více než dvojnásobný, což je v souladu se zvýšeným množstvím macrophage-like cells v této oblasti. Naproti tomu v dalších lokalizacích nebyla frekvence apoptózy zvýšena (obr. 20 D–I).

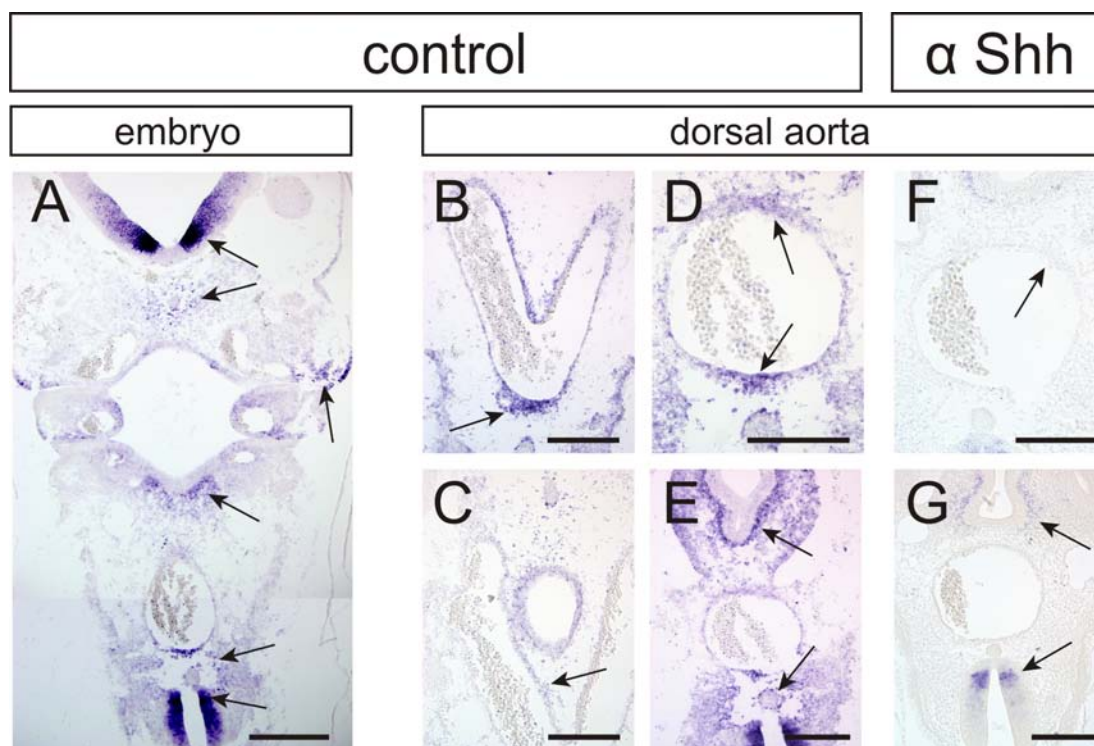
V mesenchymu okolo *vena cardinalis anterior* se také přibližně o třetinu snížila úroveň proliferace stanovená průkazem pozitivivity pro fosfo-histon 3 (obr. 21 G–I). V žaberních obloucích, v oblasti výtokového traktu srdečního a ani v okolí *aorta dorsalis* neovlivnila aplikace 5E1 buněk úroveň proliferace (obr. 20 G–I).

Z toho vyplývá, že v oblasti *vena cardinalis anterior* Shh ovlivňuje přežívání a proliferaci mesenchymu. Je ovšem také možné, že extravazáty okolo *vena cardinalis anterior* po Shh inhibici vyvolávají nahromadění macrophage-like cells a zvýšenou frekvenci apoptózy. Jednalo by se tedy o sekundární efekt Shh inhibice, neboť fragilita cévní stěny je defektem podmíněným ztrátou Shh signalizace. Proti této interpretaci však hovoří nález snížené proliferace, kterou nelze extravazáty vysvětlit.

Při detekci apoptózy a proliferace jsme nepozorovali značené buňky v endotelu cév a ani v ektodermu a v entodermu. Shh tedy nepůsobí na vývoj cév ovlivněním apoptózy a proliferace endotelu. Shh neovlivňuje v tomto směru ani buňky mesenchymu v okolí cév, kde lze předpokládat prekurzory hladkých svalových buněk a fibroblastů cévní stěny.

6.2.5 Mechanismus působení Shh na endotelové buňky cévní stěny

Signální kaskáda Shh zahrnuje receptor Patched (Ptc1) a transmembránový protein Smo, který aktivuje transkripční faktory Gli 1–3, které řídí transkripci cílových genů. Jedním z cílových genů je i gen, který kóduje receptor *ptc1*. Buňka, která

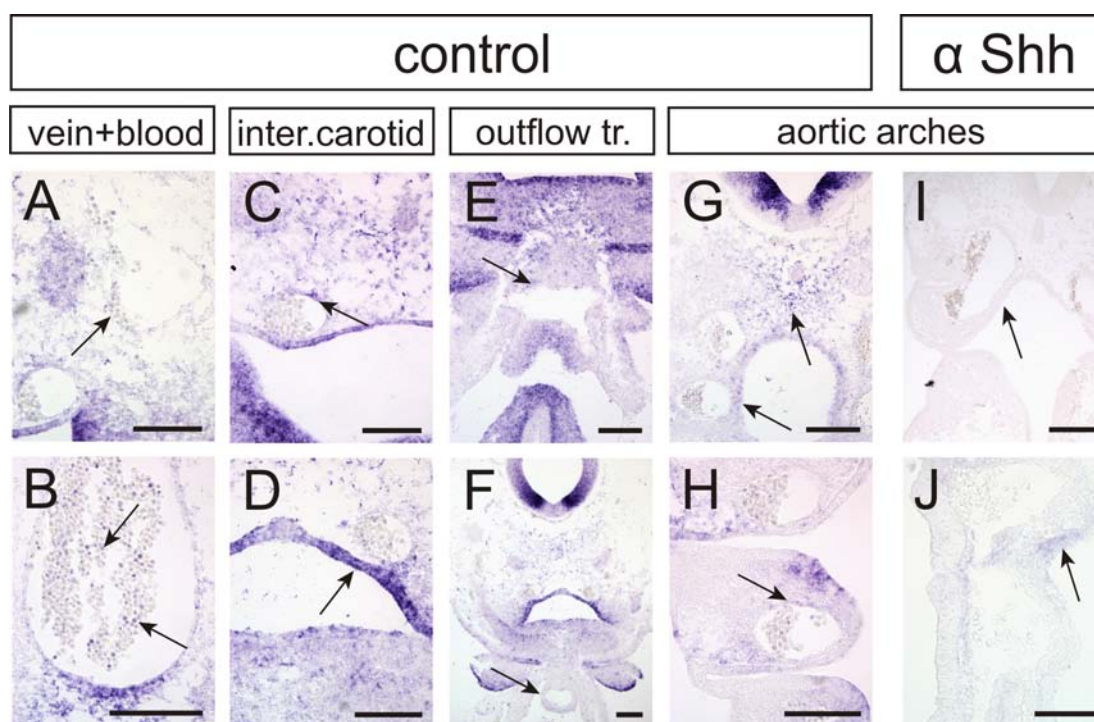


Obrázek 22: Expres *ptc1* (receptoru pro Shh) v embryu a cévách embrya stádia 18 HH. (A–E) normální exprese *ptc1*; (F–G) exprese *ptc1* po Shh inhibici. (A) Celková exprese *ptc1* v embryu. *Ptc1* tvoří gradient v nervové trubici od floor plate (šipky), okolo chordy (šipky), v posteriorní části prvního a druhého žaberního oblouky (šipka) a ve stropu žaberní dutiny (šipka). Měřítko je 200 μm . (B–E) *Ptc1* je v *aorta dorsalis* exprimován ve všech endotelových buňkách, jen s různou intenzitou. (B) Kraniálně je nejvíce pozitivní endotel v oblasti sousedící s chordou (šipka). (C) V místě napojování aortálních oblouků je *ptc1* exprimován také v oblasti přiléhající k žaberní dutině (šipka). (D–E) V nepárové *aorta dorsalis* je nejvíce pozitivního endotelu pro *ptc1* na její ventrální straně, která je přikloněná k endodermu přední části střeva (šipky) a na dorsální straně, která zasahuje do *ptc1* gradientu chordy (šipky). (F–G) Expres *ptc1* v Shh inhibovaných embryích. (F) vymizení exprese *ptc1* v endotelu *aorta dorsalis* (šipka). (G) Zbytková exprese *ptc1* v přední části střeva a v blízkosti spodinové ploténky (šipky), ostatní tkáně embrya jsou *ptc1* negativní. Transversální řezy, u B–G je měřítko 100 μm .

exprimuje *ptc1* je tedy cílovou strukturou Shh signalizace a míra jeho exprese odpovídá míře intenzity resp. inhibice Shh signalizace (Marigo a Tabin, 1996), zaměřili jsme se proto na průkaz tohoto receptoru. V tomto pozorování jsou uvedeny pilotní nálezy *ptc1* exprese hodnocené hybridizací *in situ* v parafínových řezech.

Expres *ptc1* v žaberní oblasti

Expresi *ptc1* jsme studovali technikou *in situ* hybridizace (ISH) mRNA na parafínových řezech, které umožňují přesnější lokalizaci signálu než ISH na celých embryích. Sonda, kterou jsme používali byla připravena pro tkáň bílé leghornky



Obrázek 23: Expresa *ptc1* (receptoru pro Shh) v embryu a cévách embrya stádia 18 HH. (A–H) normální exprese *ptc1*; (I–J) exprese *ptc1* po Shh inhibici. (A) Málo *ptc1* pozitivní endotel *vena cardinalis anterior* (šipka). (B) Velké množství krevních buněk je také pozitivních pro *ptc1* (šipky). (C–D) Pozitivní endotel pro *ptc1* v *arteria carotis interna*. (C) Část endotelu *arteria carotis interna* je v gradientu *ptc1* z chordy (šipka). (D) více než polovina *arteria carotis interna* těsně sousedí s endodermem žaberní dutiny a proto je velmi silně pozitivní na *Ptc1* (šipka). (E–F) Slabá *ptc1* pozitivita ve výtokovém traktu srdečním. (E) *Ptc1* je jen velmi slabě exprimován v endotelu výtokového traktu (šipka). (F) Distálnější úsek výtokového traktu také se slabým *ptc1* signálem v endotelu (šipka). (G–H) Aortální oblouky mají jen část endotelu pozitivní pro *ptc1*. (G) Gradient okolo chordy a endodermu žaberní dutiny (šipky) zasahuje i příkloněný endotel aortálních oblouků. (H) Expresa z laterální a posteriorní strany žaberního oblouku zasahuje i část endotelu aortálního oblouku (šipka). (I–J) Snížená exprese *ptc1* po Shh inhibici. (I) Žádná zbytková exprese *ptc1* v endodermu žaberních oblouků (šipka) ani v endotelu aortálních oblouků a *arteria carotis interna*. (J) Zbytková exprese *ptc1* v posteriorní oblasti druhého žaberního oblouku (šipka), v ostatních částech žaberních oblouků exprese *ptc1* vymizela. Transversální řezy, měřítko je 100 μ m.

a v této části pokusu jsme tedy používali embrya bílé leghornky, i když jsme ověřili, že sonda většinou reaguje i s tkáněmi japonské křepelky.

Ptc1 je u normálních embryí lokalizován v bezprostřední blízkosti produkce Shh. V nervové trubici jsou to oblasti, které přímo přiléhají ke spodinové ploténce. Nejvíce *ptc1* je tedy exprimováno v buňkách v těsné blízkosti spodinové ploténky a s narůstající vzdáleností intenzita signálu *ptc1* postupně klesá (obr. 22 A). Další buňky silně *ptc1* pozitivní jsou v oblasti *sulcus limitans* v mezimozku, která také produkuje Shh.

Rovněž mesenchym v okolí *chorda dorsalis*, která také produkuje Shh, je vysoce *ptc1* pozitivní, s gradientem klesajícím směrem do periferie (obr. 22 A, E a obr. 23 G).

Další strukturou, která v oblasti žaberních oblouků ostrůvkovitě produkuje Shh, je entoderm přední části střeva. Expresi *ptc1* jsme pozorovali v entodermu žaberních oblouků, jak v blízkosti produkce Shh, jak je tomu ve stropu žaberní dutiny, tak přímo v jednotlivých ostrůvcích Shh produkce v entodermu (obr. 22 A, obr. 23 C–H). Na místa exprese *ptc1* receptoru v entodermu navazuje slábnoucí gradient v buňkách mesenchymu žaberních oblouků a dokonce v části endotelové výstelky arterií (obr. 22 A, obr. 23 G–H).

Expresa *ptc1* v cévách žaberní oblasti

Nejvíce *ptc1* pozitivních endotelových buněk se nachází vždy ve směru k nejbližšímu zdroji Shh. V *arteria carotis interna* a v párových *radices aortae* jsou to vždy části endotelové trubice přivrácené k entodermu žaberní dutiny (obr. 22 A–C, obr. 23 C–D). Distálněji uložená nepárová *aorta dorsalis* obsahuje sice také *ptc1* pozitivní buňky na straně přivrácené k entodermu, ale daleko více je *ptc1* pozitivních buněk v její dorsální části přímo sousedící s chordou (obr. 22 A, D–E). Také endotel aortálních oblouků je pozitivní pro *ptc1* v oblasti přiléhající k entodermu. V posteriorních částech I. a II. žaberního oblouku je endotel aortálních oblouků také pozitivní pro *ptc1*; nejbližší této pozitivitě je produkce Shh ektodermem v kaudálních částech těchto žaberních oblouků (obr. 22 A, obr. 23 C–H). Pozitivitu signálu pro *ptc1* jsme pozorovali také v některých krevních buňkách zachycených v cévách (obr. 23 B) a tento nález vyžaduje další ověření. Endotelová výstelka *vena cardinalis anterior* (obr. 23 A) a endotel výtokového traktu srdečního nevykazují *ptc1* signál (obr. 23 E–F).

Expresa *ptc1* v Shh inhibovaných embryích

Při inhibici signální kaskády Shh pomocí 5E1 protilátky, se exprese *ptc1* ve všech lokalizacích úplně vytratila nebo výrazně zeslabila. Je třeba uvést, že reakce byla prováděna současně s řezy normálních embryí a posuzování intenzity zbarvení je tedy zcela relevantní. Zeslabená aktivita *ptc1* zůstala zachována pouze v oblasti spodinové ploténky a několika okrsků entodermu. Je možné, že existuje určitá bazální exprese *ptc1*, která byla v uvedených lokalizacích zachycena. V okolních tkáních a tedy i v endotelu cév mizí *ptc1* pozitivita po aplikaci 5E1 protilátky úplně (obr. 11 C–D, obr. 22 F–G a obr. 23 I–J).

V současné době se soudí, že Shh ovlivňuje endotel nepřímo prostřednictvím VEGF (Nimmagadda et al., 2005). Z našich uvedených pozorování vyplývá možnost, že Shh signalizuje endotelové buňce přímo prostřednictvím Ptc1 receptoru, jehož expresi v endotelových buňkách jsme pozorovali. V případě nepřímého vlivu Shh na endotel prostřednictvím VEGF, by bylo možné očekávat snížení exprese VEGFR2

u embryí s inhibovanou Shh signální kaskádou. Tento efekt jsme však nezaznamenali.

6.2.6 Malformace cév žaberní oblasti po aplikaci cyclopaminu

Studovali jsme i alternativní možnost inhibice Shh signalizace podáním cyclopaminu, který specificky inhibuje Smo a tím i Shh signální kaskádu. Cyclopamin (5 ng) jsme aplikovali *in vivo* v komplexu s cyclodextrinem, který umožní jeho pomalé uvolňování do embrya. Obdobně jako při aplikaci hybridomových buněk, jsme cyclopamin aplikovali pod vitelinní membránu embrya do oblasti žaberních oblouků ve stádiích 12–15 HH. Embrya jsme analyzovali ve stádiích 21 a 23 HH. Úspěšnost inhibice cyclopaminem nelze ověřit pomocí anti-Shh (5E1) protilátky, protože Shh hladina se inhibicí nemění. Efekt inhibice jsme tedy hodnotili na základě pozorovaných malformací embrya a cév.

Malformace embryí po aplikaci cyclopaminu

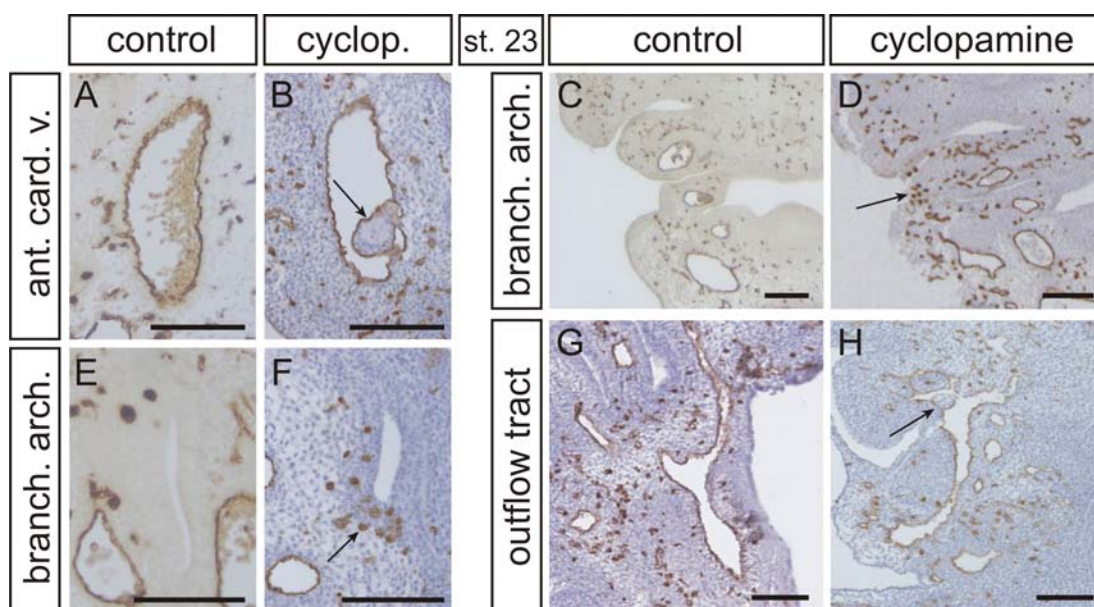
Embrya po aplikaci cyclopaminu vykazovala velkou variabilitu hlavových malformací, které byly obecně daleko závažnější než po aplikaci 5E1 hybridomových buněk. Tato heterogenita je pravděpodobně způsobena různou dávkou cyclopaminu, která zasáhla embrya. Cyclopamin je totiž velmi obtížné *in vivo* optimálně dávkovat, protože se jedná o silný inhibitor, který je při vyšších koncentracích letální. Cyclopamin je také lipofilní a ochotně se váže na žloutek a tím ovlivňuje koncentraci, která zasáhne vlastní embrya (Incardona et al., 2000).

Naše výsledky odrážely výše zmíněné vlastnosti cyclopaminu. Přibližně třetina embryí nepřežila aplikaci cyclopaminu, třetina embryí měla malformovaný mozek typickým způsobem pro Hedgehog inhibici a třetina embryí nebyla cyclopaminem zasažena vůbec. Analyzovali jsme pouze embrya s malformacemi typickými pro Hedgehog inhibici jako je například open brain syndrome a tendence k cyklopii.

Malformace endotelu cév po aplikaci cyclopaminu

Vliv cyclopaminu na endotel krevních cév jsme analyzovali v parafínových řezech znázorněním protilátkou QH1. Inhibovaná embrya měla podobné malformace cév jako embrya s aplikovanými 5E1 buňkami. *Vena cardinalis anterior* měla nepravidelnou cévní stěnu s četnými invaginacemi (obr. 24 A, B). Lumen výtokového traktu srdečního bylo také nepravidelné a s invaginacemi endotelu. V jeho okolí nacházelo zvýšené množství volných endotelových buněk (obr. 24 G, H). Zvýšené množství shluků volných endotelových buněk jsme také pozorovali v mesenchymu posteriorních žaberní oblouků (obr. 24 C–F).

V této souvislosti je třeba zdůraznit, že inhibice signální kaskády Shh cyclopaminem je současně také inhibicí Indian hedgehog (Ihh), který anti-Shh protilátkou inhibován nebyl. Protože obraz malformace cév navozený cyclopaminem je velmi



Obrázek 24: Inhibice Shh funkce pomocí cyclopaminu. Endotel cév je značený QH1 ve stádiu 23 HH. (A–B) Shh inhibovaná embrya mají oproti kontrolním nepravidelné lumen *vena cardinalis anterior* s výchlípkami cévní stěny (šipka). Výchlípka je kompletně pokryta cévním endotelem. (C–D) Shluky volných endotelových buněk (šipka) v ektodermu třetího žaberního oblouku u cyclopaminem inhibovaných embryí. (E–F) Detail shluků volných endotelových buněk v endodermu třetího a čtvrtého žaberního oblouku u cyclopaminem inhibovaných embryí. (G–H) Malformovaná endotelová výstelka výtokového traktu u cyclopaminem inhibovaných embryí. Šipka ukazuje nepravidelnosti cévního lumen. Transverzální řezy, B, D, F–H dobarveno hematoxilinem. Měřítka je 200 μm .

podobný, ne-li identický s nálezem po aplikaci anti-Shh protilátky, je zřejmé že signalizace Ihh je v této oblasti a ve sledovaných stádiích málo významná.

Závěrem lze shrnout, že Shh je v žaberní oblasti nutný pro tvorbu nových cév, pro jejich stabilizaci a následnou přestavbu. Krátkodobá inhibice Shh zásadně neovlivňuje úroveň apoptózy a proliferace mesenchymových buněk žaberních oblouků. Na základě exprese *ptc1*, VEGFR2 a distribuce hladkých svalových buněk se domníváme, že Shh signalizuje přímo endotelu krevních cév.

7 Diskuse

Proces přestavby aortálních a žaberních oblouků nabízí možnost studovat celou řadu základních morfogenetických mechanismů. Studium této oblasti přináší poznatky nejen o vývoji orgánů hlavy a krku, ale i o adaptacích obratlovců při přechodu na souš. Studium vývoje cév v žaberní oblasti tedy pomáhá osvětlit změny v dýchání obratlovců, ale i základní mechanismy vývoje a přestavby cévního řečiště jak v ontogenezi tak ve fylogenezi.

7.1 Vývoj aortálních oblouků u *Pelobates fuscus*

Pro studium přestavby aortálních oblouků u pulců blatnice jsme použili poměrně novou metodu korozivního nástřiku cévního systému, který je možné pozorovat elektronovým rastrovacím mikroskopem. Tato metoda nám umožnila prohloubit znalosti přestavby aortálních oblouků a také je lépe studovat pomocí elektronové rastrovací mikroskopie. Bylo možné pozorovat detailní struktury i na úrovni jednotlivých kapilár a tím přinést poznatky nejen o přestavbě aortálních oblouků, ale i o změně žaberního a plicního cévního zásobení. Také bylo zajímavé porovnat vývoj cévního zásobení dýchacích orgánů blatnice s vývojem u *Xenopus* a *Hyla*, které byly rovněž studovány touto metodikou (Bartel a Lametschwandtner, 2000; McIndoe a Smith, 1984a,b).

7.1.1 Larvální vývoj

U larev *Pelobates* jsme pozorovali čtyři páry aortálních oblouků, které jsou homologické s III. – VI. aortálním obloukem čelistnatců. V námi studovaných stádiích již nejsou vytvořeny I. a II. aortální oblouk, které se vyvíjejí dříve a jen na přechodnou dobu, a stávají se součástí dalších cév (pravděpodobně *arteriae palatinae*). Podobný vývoj je znám u *Xenopus laevis* (Millard, 1945; Nieuwkoop & Faber, 1967; Delsol & Flatin, 1972), *Rana esculenta* a *R. temporaria* (Schmalhausen, 1953).

Na III. aortálním oblouku jsme již od larválních stádií pozorovali vývoj *glomus caroticum*. *Glomus caroticum* dělí již u larválních stádií krev na dva proudy, první z III. aortálního oblouku do *ramus posterior* a druhý proud mezi *arteria carotis externa* a *ramus anterior* aortálního oblouku. Přestože je *glomus caroticum* patrný už u larválních stádií, svoji funkci chemoreceptoru a baroreceptoru plní ale až po metamorfóze (Kusakabe, 1992; Orlando a Pinder, 1995).

U larev *Pelobates* jsme zjistili, že III. aortální oblouk je podobně jako IV. a V. rozdělen na *ramus anterior et posterior* do žaber. Z *ramus posterior* se oddělují *arteriae afferentes* a okysličená krev z žaber je odváděna cestou *arteriae efferentes* do *ramus anterior* žaberního oblouku. Systém větvení kapilár do žaber je pro každý druh unikátní, protože u *Litoria* se žaberní kapiláry větví daleko méně (McIn-

doe et Smith, 1984a) a u *Xenopus* dokonce nejsou žábry skoro vytvořeny a jejich funkci přebírá silně vytvořený filtrační aparát (Bartel a Lametschwandtner, 2000). Podobná druhová specificita jako je v cévním zásobení žaber je také v cévním zásobení filtračního aparátu. Filtrační aparát je u *Pelobates* zásoben z cév IV. a V. aortálního oblouku, zatímco např. u *Litoria* je filtrační aparát zásoben také z III. aortálního oblouku (McIndoe a Smith, 1984). Jak bylo zmíněno, filtrační aparát u *Xenopus* je velmi silně vyvinutý, je zásobovaný ze všech aortálních oblouků a má také dýchací funkci (Bartel a Lametschwandtner, 2000).

Zjistili jsme, že u *Pelobates* je v souladu s průtokem krve žábry *ramus posterior* na začátku silnější než *ramus anterior* a po průchodu žábry je tomu naopak. Pak se obě větve spojí a aortální oblouk se napojí na *aorta dorsalis lateralis*. III. aortální oblouk je největším obloukem u larev, vede většinu okysličené krve do těla, a proto je někdy nazýván larvální aorta (Millard, 1945).

U *Pelobates* jsme zjistili, že V. a VI. aortální oblouk vznikají ze společného kmene z *truncus arteriosus* a po průchodu žábry se zase spojují s společně vstupují do *aorta dorsalis lateralis*. V. aortální oblouk je u larev *Pelobates* velmi dobře vytvořen a také se větví do žaber. Struktura V. a VI. aortálního oblouku není shodná u všech žab a např. u *Rana temporaria* se V. aortální oblouk do žaber vůbec nevětví (Lanot, 1962). Ve vývoji V. aortálního oblouku existuje velká variabilita a např. u některých ocasatých obojživelníků přetrvává V. aortální oblouk do dospělosti (*Ambystoma*, *Plethodon*), u jiných ocasatých V. aortální oblouk přetrvává a místo něj se redukuje VI. aortální oblouk (*Necturus*) (Darnell, 1949).

Z našeho pozorování je vidět, že VI. aortální oblouk je u larev *Pelobates* drobný a do žaber se větví jen omezeně. Těsně před jeho napojením na *aorta dorsalis lateralis* z něho vzniká *arteria pulmonalis* a *arteria cutanea*. Tyto dvě arterie jsou již u pulců velmi dobře vytvořeny, i když plicní ani kožní dýchání není plně rozvinuto. Plíce jsou ale u *Pelobates* vytvořeny již v larválních stádiích, jsou dobře vaskularizované, i když ještě plicní váčky nejsou naplněny vzduchem a neslouží k dýchání. Oproti *Pelobates* se *arteria pulmonalis* u *Rana* tvoří až těsně před koncem metamorfózy (Delsol et Flatin, 1972).

Stejně jako u ostatních obojživelníků, také u *Pelobates* je *arteria carotis interna* kraniálním pokračováním *aorta dorsalis lateralis* a začíná v místě napojení III. aortálního oblouku. Také její větve jsou podobné u *Pelobates*, *Xenopus* (Millard, 1941), *Rana* (Delsol et Flatin, 1972) i ocasatých obojživelníků (Fox, 1959). Jedná se nejdříve o *arteria palatina posterior* pro zadní část stropu žaberního dutiny, *arteria palatina anterior* pro strop dutiny ústní, *arteria ophtalmica* pro oční kouli a *arteria cerebralis* pro cévní zásobení mozku. Tento systém větvení je podobný u larev i metamorfovaných jedinců.

Mezi cévy vznikající u žab z *aorta dorsalis lateralis* jsme nově popsali *arteria palato-nasalis*, která byla doposud známá jen u ocasatých obojživelníků, u nich je ale větví *arteria occipito-vertebralis*. Je možné, že smyčka, kterou *arteria palato-nasalis* opíše po svém odstupu z aorty, je pozůstatkem po *arteria spinalis*.

Další zajímavou větví, kterou jsme u *Pelobates* pozorovali je *arteria occipito-vertebralis*. Poprvé jsme u žab pozorovali, že její větev – *arteria spinalis*, která zásobuje míchu, se pod mozkem spojuje s *arteriae cerebrales* a vzniká tak vzniká obdoba Willisova okruhu známého až u amniot. Tato situace se např. u *Leiopelma* nevyskytuje, protože *Leiopelma* nemá *arteria spinalis* vůbec vytvořenu a míchu zásobuje jen několik drobných větví (Elsie a Stephenson, 1947). Dále jsme u *Pelobates* pozorovali velmi dobře vytvořenou *arteria subclavia*, která je vytvořená i u stádií bez znatelných předních končetin. U *Xenopus* je tato céva větví *arteria occipito-vertebralis* (Nieuwkoop a Faber, 1956)

7.1.2 Metamorfóza

U *Pelobates* jsme zjistili přesný mechanismus redukce žaberních kapilár a mechanismus zániku a přestavby jednotlivých aortálních oblouků v průběhu metamorfózy. Po začátku metamorfózy zanikají v žábřích terminální kapilární pletěň a aortální oblouky se začínají pomalu redukovat. Na III. aortálním oblouku se zvětšuje *glomus caroticum* a vytváří se okolo něj kapilární pletěň. Ve stádiu 62 NF se žaberní cévy dále redukují a celé aortální oblouky se zkracují. Hlavní změny v metamorfóze ale nastávají ve stádiu 63 NF, kdy se úplně vytratí všechny cévy žaber. Aortální oblouky se výrazně zkrátí a z úseku, který procházel žábřami, zůstane jen krátká esovitá klička. Oproti *Pelobates* je mechanismus redukce žaber úplně jiný u *Rana*, kde aortální oblouky zanikají postupně tím, že se zvětšují anastomózy mezi *ramus anterior et posterior*. Obě větve nakonec splynou a obejdou tak cévy do žaber (Delson et Flatin, 1972).

Ve stádiu 63 NF dochází u *Pelobates* v souvislosti s redukcí žaber k dalším rozsáhlým změnám. Náhle se uzavírá *ductus caroticus* a III. aortální oblouk tak ztrácí napojení na *aorta dorsalis lateralis*. V místě napojení zůstává jen drobná jizva a *arteria carotis interna* se stává přímým pokračováním III. aortálního oblouku. IV. aortální oblouk jako jediný neztrácí napojení na *aorta dorsalis lateralis*, která je nyní jeho přímým pokračováním. IV. aortální oblouk se nazývá systémový a je hlavním kmenem pro přívod krve do těla dospělce. Stejná situace je také u *Alytes* (Magnin, 1959). V. aortální oblouk se také odpojil od *aorta dorsalis lateralis* a redukuje se od svého distálního konce pod vlivem růstu dýchacího svalu dospělce (Lanot, 1962) *m. petrohyoideus posterior*. Jako příčinu redukce V. aortálního oblouku uvádí Lanot (1962) u *Rana* jeho stlačení *n. laryngeus brevis* a Delsol a Flatin (1972) zvýšený průtok krve do plic, ani jeden tento důvod nemůžeme na korozivním preparátu posoudit.

Také jsme pozorovali jak VI. aortální oblouk ztratil napojení na *aorta dorsalis lateralis*, protože se uzavřel *ductus Botalli*. VI. aortální oblouk tak přímo pokračuje do plic přes *arteria pulmonalis* a do kůže přes *arteria cutanea*. U *Pipa pipa* nevzniká *arteria cutanea* z VI. aortálního oblouku jako u *Pelobates* a *Xenopus laevis* (Grobbelaar, 1924a; Millard, 1941), ale z IV. aortálního oblouku (Klinckowström, 1894), kůže *Pipa* tedy pravděpodobně neplní dýchací funkci.

Až do konce metamorfózy jsme u *Pelobates* pozorovali dokončování procesů ze stádia 63 NF. Dále se zkracují aortální oblouky a tím se na III. aortálním oblouku navzájem přiblíží základy *arteriae carotis*. *Arteriae carotis* u *Pelobates* ale ještě nesplývají, na rozdíl od *Rana*, kde již během metamorfózy vytvoří společný kmen *arteria carotis communis* (Gaup, 1899). Postupuje i redukce V. aortálního oblouku, který nakonec úplně zanikne.

7.1.3 Fylogenetický vývoj aortálních oblouků

Výše popsaným mechanismem se cévy, které u larev přiváděly krev k okysličení do žaber, přestavely na cévy přivádějící krev k novým dýchacím orgánům, jimiž jsou plíce a kůže. Tyto změny se také odehrály při přechodu obratlovců na souš a jsou tedy primární adaptací žab a všech amniot na dýchání vzdušného kyslíku. V evoluci se tyto kroky přestavby cévního systému, ale odehrály pomaleji. U prvních tetrapodů *Ichthyostega* a *Acanthostega* cévní systém pravděpodobně spíše připomínal situaci rybích předků. Ze současných živočichů nejlépe odráží situaci devonských obojživelníků ganoidní ryba *Amia calva*. Její larvální stádia mají vytvořeno pět párů aortálních oblouků, které se všechny větví do žaber. První z nich odpovídá II. aortálnímu oblouku a je výrazně menší než ostatní (Bjerring, 1967, 1973, 1977; Jarvik, 1980). Pět párů žaberních oblouků, které se všechny větví do žaber, má také devonská ryba *Eusthenopteron* (Jarvik, 1980). Další devonské ryby *Eusthenopteron*, *Panderichthys* a *Tiktaalik* (Jarvik, 1980; Vorobyeva, 1995; Daeschler et al., 2006), které představují rybí předchůdce tetrapodů a které žily hlavně ve vodě, uměly pravděpodobně málo a neefektivně dýchat vzdušný kyslík plicemi a kůží. Devonské ryby tedy pravděpodobně přežily ve vlhkém prostředí pomocí plicního a kožního dýchání. Jejich cévní systém měl již některé předpoklady pro úplný přechod na souš (Romer, 1937). Tuto situaci podle nás odráží larvální vývoj *Pelobates*, kde přetrvávají aortální oblouky, *ductus caroticus* a *ductus Botalli* a současně jsou již dobře vytvořené plíce a kožní cévní pleteně. Podobná je situace u některých ocasatých obojživelníků (*Triturus* – Boas (1882) a *Hynobius* – Kato a Kurihara (1989)). Proces přechodu obratlovců na souš z rybího předka k současným obojživelníkům trval několik milionů let (Carroll, 1995) a mohl do určité míry odrážet způsob metamorfózy u *Pelobates*. Je pravděpodobné, že přechodu obratlovců na souš předcházela postupná příprava, která je v metamorfóze *Pelobates* reprezentovaná postupnou redukcí žaberních kapilár a vytvořením plic. Vlastní přechod na plicní dýchání, redukce *ductus caroticus* a *ductus Botalli* pak mohl být rychlý, stejně jako v průběhu metamorfózy *Pelobates*.

7.2 Vývoj cév žaberní oblasti u ptačích embryí

Mechanismy vývoje cév žaberní oblasti jsme studovali na ptačích embryích, která narozdíl od savčích embryí umožňují manipulaci s ranými embryonálními stádii. Studium vlivu Shh na žaberní oblast, případně na vývoj cév se již zabývalo ně-

kolik prací. Z prací o *shh* nulové mutanty myši je známo, že Shh je nutný pro normální vývoj žaberní oblasti (Jeong et al., 2004; Yamagishi et al., 2006). Nevýhodou myších embryí jako modelového objektu je, že úplná blokace funkce Shh je letální, a proto není možné studovat jeho vliv na pozdější stádia vývoje žaberních oblouků a jejich cév (Washington Smoak et al., 2005). Proto jsme vyvinuli metodu krátkodobé inhibice Shh u ptačích embryí pomocí aplikace hybridomových buněk produkujících anti-Shh protilátku a Shh jsme inhibovali také pomocí cyclopaminu. Velké cévy embrya jako *aorta dorsalis*, *vena cardinalis anterior* a aortální oblouky jsou v těsném sousedství Shh produkujících struktur, jimiž jsou chorda, spodinová ploténka nervové trubice a entoderm. Proto jsme také předpokládali vliv Shh nejen na vývoj žaberních oblouků, ale i jejich cév. Podařilo se nám prokázat vliv Shh nejen na formování nově vznikajících cév, ale i pro stabilitu jejich stěny a následnou remodelaci v průběhu vývoje žaberní oblasti.

7.2.1 Vliv Shh na nově vznikající cévy

Protože se žaberní oblouky vyvíjí postupně, mohli jsme na jednom vývojovém stádiu studovat význam Shh na jednotlivé fáze vzniku žaberních oblouků. U embryí s inhibovaným Shh jsme pozorovali v kaudálních žaberních obloucích shluky volných angiogenních buněk, kterým nejsou zavzaty do luminizovaných cév. Tyto shluky endotelových buněk přetrvávaly a nepodléhaly bezprostředně apoptóze, ale nebyly propojeny do cévního systému. Přítomnost shluků endotelových buněk, které nevytvářejí cévy, dokazuje důležitou funkci Shh při raném vývoji cév. Podobný efekt vlivu Shh na raná stádia vasculogeneze při vývoji *aorta dorsalis* pozorovali u myši (Vokes et al., 2004). Oproti této práci jsme tedy zjistili, že Shh je nutný k formování nově vznikajících cév a to i v pozdějších embryonálních stádiích.

7.2.2 Vliv Shh na stabilizaci a přestavbu cév

Dále jsme zjistili, že Shh je nutný k udržení stability a soudržnosti endotelové výstelky cév, protože jsme pozorovali krevní výrony do mesenchymu v okolí *vena cardinalis anterior*. Podobný fenotyp způsobený pravděpodobně narušenou Shh signalizací byl pozorován u mutantní zebřičky (Childs S. J., osobní sdělení). Z publikovaných prací není vliv Shh na stabilizaci cévní stěny zatím znám. Předpokládáme, že jde o vliv Shh na diferenciaci endotelové výstelky, protože v tomto stádiu vývoje je stěna této žíly tvořena pouze endotelem bez vrstvy hladké svaloviny. Objasnění příčin tohoto defektu by mohlo přinést studium molekul, které zajišťují mezibuněčnou adhezi a molekul, které tvoří bazální laminu.

Pozorovali jsme také, že Shh je důležitý i pro další vývoj už vytvořených cév. Zjistili jsme vliv Shh na remodelaci cév, konkrétně na fúzi a na větvení cév. Po inhibici Shh byly nejvíce ovlivněny cévy, které v daném stádiu prochází aktivní remodelací, jako např. fúze pravé a levé *aorta dorsalis*, remodelace výtokového traktu srdečního a větvení *arteria carotis interna*. V případě aorty šlo již o cévu, která již měla

vytvořenou vrstvou hladké svaloviny. *Arteria carotis interna* a výtokový trakt byly tvořeny pouze endotelem. Jedinou prací ve které nacházíme určitou obdobu pozorovaných defektů je studie Nagase et al. (2006), kteří pozorovali narušení fúze *aorta dorsalis* po aplikaci cyclopaminu. Spektrum našich nálezů je širší, zahrnuje celou řadu cév a týká se nejen fúze, ale také větvení. Umožňuje tedy určité zobecnění vlivu Shh na morfogenezi cév.

7.2.3 Vliv Shh na apoptózu a proliferaci v oblasti žaberních oblouků

Předpokládali jsme, že po inhibici Shh zjistíme zvýšené množství apoptózy a sníženou proliferační aktivitu v oblasti žaberních oblouků, jak bylo pozorováno po několikadenní inhibici Shh u ptáků (Ahlgren a Bronner-Fraser, 1999) a u myši (Jeong et al., 2004; Washington Smoak et al., 2005). Překvapivě jsme ale zvýšenou apoptózu a sníženou úroveň proliferace obecně nepozorovali. Jediná oblast se zvýšenou apoptózou a sníženou úrovní proliferace bylo okolí *vena cardinalis anterior* ve stádiu 23 HH. V ostatních oblastech byla úroveň apoptózy a proliferace srovnatelná s kontrolou. Proto lze uzavřít, že Shh ovlivňuje apoptózu a proliferaci hlavně v dlouhodobém hledisku, které se neprojevovalo při naší metodě krátkodobé inhibice.

7.2.4 Mechanismus Shh působení na cévy

Je zajímavé, že zdroje Shh nejsou často v přímém kontaktu s vyvíjející se cévou, a i když je Shh známý a studovaný morfogen, přesný mechanismus jeho transportu z míst produkce k endotelu cév není zatím přesně znám. Možných zdrojů je často několik a jsou různě vzdáleny, např. v okolí *vena cardinalis anterior* je Shh produkován v okolí *sulcus limitans* v mezimozku, ve spodinové ploténce středního mozku a mozkovém kmeni, v chordě a v prechordové ploténce.

Pomocí naší metodiky jsme nebyli schopni určit z jakého zdroje Shh danou cévu nejvíce ovlivňuje. Je známo, že spodinová ploténka nervové trubice ovlivňuje vývoj a fúzi *aorta dorsalis* (Nagase et al., 2006). Mechanismus vzdáleného působení Shh na cévy ale zatím není přesně znám. Jednou z možností by bylo, že Shh indukuje v okolním mesenchymu expresi dalších signálních molekul a růstových faktorů jako jsou Angiopoietin-1, VEGF (Pola et al., 2001), Fox1 a BMP4 (Jeong et al., 2004; Astorga a Carlsson, 2007). Je ale také možné, že Shh signalizace je přímo cílená endotelové buňce. Tuto představu podporují i naše pozorování. Zjistili jsme expresi Shh receptoru *ptc1* nejen v buňkách mesenchymu žaberních oblouků, ale i přímo v endotelových buňkách. Vzhledem k tomu, že exprese *ptc1* po inhibici Shh poklesla, je zřejmé, že je v aktuálním vztahu k Shh signalizaci. Tato argumentace je založená na ISH v parafínových řezech a kontrolní řezy potvrzují, že jde skutečně o specifickou reakci. Považujeme však za nutné ověřit tento nález i jinými metodickými přístupy, např. DNA microarray nebo quantitative real-time

PCR z buněčné kultury endotelových trubic nebo endotelových buněk izolovaných z embrya.

Také nezměněná exprese VEGFR2 po Shh inhibici ukazuje, že VEGF není klíčový faktor v Shh signalizaci cévám.

Ve studiu mechanismů přímé a nepřímé signalizace Shh endotelu cévní stěny budeme dále pokračovat. Budeme sledovat expresi dalších genů, které by mohly být aktivovány Shh signalizací, jako jsou Angiopoietiny 1 a 2, VEGF, VE-cadherin. Dále také molekul, o kterých je známo z jiných lokalizací, že interagují se signální kaskádou Shh, jako jsou např. Gli1, BMP4 a FGF8.

8 Závěry

8.1 Vývoj aortálních oblouků u *Pelobates fuscus*

- Pro studium vývoje aortálních oblouků u žab (*Pelobates fuscus*) jsme nově použili metodu korozivního nástřiku a elektronové rastrovací mikroskopie.
- *Pelobates fuscus* patří do evolučně starobylé skupiny žab, a proto i v larválním vývoji jejího cévního systému nacházíme jak starobylé, tak moderní struktury. Stejně jako ocasatí obojživelníci má vytvořenu *arteria palato-nasalis*, a na druhou stranu je u ní vytvořen např. Willisův okruh, který je znám až od amniot.
- Larvální vývoj aortálních oblouků rekapituluje fylogenetický vývoj při přechodu obratlovců na souš. Postupná redukce cévního zásobení žaber je dokončena velmi rychlým krokem, kterým je náhlé uzavření cévního oběhu do žaber. Podobně rychlé je i přerušení *ductus caroticus* a *ductus Botalli* a tím i ztráta napojení aortálních oblouků na *aorta dorsalis lateralis*. Změna dýchání je tedy pozvolná, ale v koncové části velmi rychlá a téměř okamžitě dochází k radikální změně jak v dýchání, tak v přestavbě cév.
- Pátý aortální oblouk se redukuje, neboť jeho spojení s *aorta dorsalis* je přerušeno růstem *m. petrohyoideus posterior*, který je dýchacím svalem po metamorfóze. V. aortální oblouk se tedy redukuje v souvislosti s přechodem na plicní dýchání.
- Nově jsme u žab popsali *arteria palato-nasalis*.

8.2 Vliv Shh na vývoj cév žaberní oblasti

- Metodickým předpokladem této práce bylo vyvinutí metody krátkodobé inhibice Shh *in vivo* pomocí aplikace hybridomových buněk, které produkují anti-Shh protilátku.
- Krátkodobá inhibice Shh ve stádiích 10–23 HH nemá vliv na úroveň proliferace a frekvenci apoptózy v mesenchymu žaberních oblouků.

-
- Inhibice Shh omezuje angiogenní potenciál ve studované oblasti, která obsahuje shluky angioblastů neinkorporovaných do cévní stěny.
 - Shh je nutný pro udržení stability cévní stěny.
 - Shh je nutný pro angiogenezi – přestavbu a další vývoj cév, jako je např. větvení a fúze. Jeho inhibice vede k narušení přestavby cév.
 - Na signál Shh pravděpodobně odpovídají přímo endotelové buňky krevních cév, které exprimují Shh receptor *ptc1* a jeho exprese při Shh inhibici klesá.
 - Shh nemá ve studovaných stádiích vliv na úroveň exprese VEGFR2 v endotelových buňkách a na distribuci hladkých svalových buněk cévní stěny.

9 Přílohy

9.1 Seznam zkratk

5E1 – monoklonální anti-Shh protilátka (Hybridoma bank)

Ab – protilátka (antibody)

BSA – bovine serum albumin, albumin z hovězího séra

DAB – diaminobenzidin (viz laboratorní protokoly), substrát pro peroxidázu

Dhh – Desert hedgehog

HH – určování vývojových stádií ptačích embryí podle Hamburger a Hamilton (1951).

Hh – Hedgehog, společný název pro celou rodinu Hedgehog proteinů: Ihh, Dhh a Shh.

Gli 1-3 – transkripční faktory Shh signální kaskády

Ihh – indian hedgehog

NGS – normal goat serum, kozí sérum

NF – určování vývojových stádií pulců žab podle Nieukoop a Faber (1967).

NTMF – alkalický pufr (viz laboratorní protokoly)

ON – inkubace přes noc (over night)

PBS – phosphate buffer solution (viz laboratorní protokoly), běžně používaný pufr

PFA – paraformaldehyd, běžně používané fixativum

Ptc1 – Patched (Ptc), receptor Shh

QH1 – protilátka, která selektivně značí endotelové buňky a jejich prekurzory u křepelčích embryí. QH1 také značí buňky bílé krevní řady

RT – inkubace při pokojové teplotě (room temperature)

Shh – Sonic hedgehog

SMA – smooth muscle actin, hladký svalový aktin

Smo – Smoothened, transmembránový protein Hedgehog signální kaskády

TSA – tyramid amplification signal (Dako), metoda zesilování signálu při imunohistochemii

VEGF – vascular endothelial growth factor

VEGFR2 – receptor 2 pro vascular endothelial growth factor (VEGF)

9.2 Laboratorní protokoly

9.2.1 Immunohistochemie a katalytická histochemie

Monoclonal antibody QH1 – značení endotelu

Hybridoma Bank (Pardanaud et al., 1987)

- Odparafínování, rehydratace
- H₂O (5 min)
- Praní PBS (10 min)
- Blokace endogenní peroxidázy (30 min)
metanol/H₂O₂; c (peroxidu vodíku) = 0,3% (500 µl/50 ml metanolu)
- Praní H₂O (10 min)
- PBS-Tween 0,01% (5 min)
- PBS (3 × 5 min)
- Předinkubace
NGS 1:10 + 1%BSA RT (20–30 min)
- Aplikace 1. Ab QH1, 1: 1000, RT (90 min)
ředíme v 1% BSA/NGS 1:20
- Praní
- PBS (3 × 5 min)
- Aplikace 2. Ab goat anti mouse peroxidase 1:150
- ředíme v 1% BSA/NGS 1:20 RT (90 min)
- Praní PBS (3 × 5 min)
- DAB v temnu RT (10 min)
- Praní H₂O, dobarvení hematoxylinem, diferenciací
- Odvodnění, montáž

Monoclonal anti-Sonic hedgehog (5E1) antibody

Hybridoma Bank (Roelink et al., 1995)

- Kryo řezy, fixace 4%PFA v PBS (4 °C, ON)
- řezy na stole (30 min)
- H₂O (5 min)
- PBS (5 min)
- PBS - TWEEN (0,05%) (10 min)
- PBS (5 min)

- Blokace endogenní peroxidázy (20 min)
metanol – 0,6 % peroxid vodíku, 200 ml + 2 ml H₂O₂
- H₂O (10 min)
- PBS (3 × 5 min)
- Předinkubace avidin (30 min)
4 kapky na 1 ml , 2% BSA + 1:20 NGS
- PBS (3 × 5 min)
- Předinkubace biotin (30 min)
4 kapky na 1 ml, 2% BSA + 1:20 NGS
- Aplikace 1. Ab, 5E1, 1:500, 4 °C, ON (RT, 90 minut)
ředíme v 1% BSA + 1:10 NGS
- PBS (3 × 10 min)
- Aplikace 2. Ab, Goat anti-mouse Biotin, 1:150, RT (60 min)
- PBS (3 × 5 min)
- Extravidin Px, 1:100 (30 min)
- PBS (3 × 5 min)
- Vybarvení – DAB, v temnu, RT (10 min)
22 ml 0,05 M Tris pH 7,6–7,8
17 mg Imidazol
10 mg DAB
třepeme, filtrujeme, poté přidáme 5 μl H₂O₂, vše v temnu, ihned na skla
- H₂O, dobarvení jader, dehydratace a montáž

Monoclonal anti-Sonic hedgehog (5E1) antibody

Hybridoma Bank (Roelink et al.,1995)

Kontrola inhibice in vivo

- Kryo řezy, fixace 4% PFA v PBS (4 °C ON)
- řezy na stole (30 min)
- H₂O (5 min)
- PBS (5 min)
- PBS – TWEEN (0,05%) (10 min)
- PBS (5 min)
- Blokace endogenní peroxidázy (20 min)
metanol – 0,6 % peroxid vodíku, 200 ml + 2 ml H₂O₂
- H₂O (10 min)
- PBS (3 × 5 min)

- Předinkubace avidin (30 min)
4 kapky na 1 ml, 2% BSA + 1:20 NGS
- PBS (3 × 5 min)
- Předinkubace biotin (30 min)
4 kapky na 1 ml, 2% BSA + 1:20 NGS
- Není aplikace primární protilátky, je již z operace v embryích
- PBS (3 × 10 min)
- Aplikace 2. Ab, Goat anti-mouse Biotin, 1:150, RT (60 min)
- PBS (3 × 5 min)
- Extravidin Px, 1:100 (30 min)
- PBS (3 × 5 min)
- Vybarvení – DAB, v temnu, RT 10 minut
22 ml 0,05 M Tris pH 7,6–7,8
17 mg Imidazol
10 mg DAB
třepeme, filtrujeme, poté přidáme 5 μ l H₂O₂, vše v temnu, ihned na skla
- H₂O, dobarvení jader, dehydratace a montáž

Monoclonal anti-VEGFR-2 antibody

od Dr. Eichmann (Eichman et al., 1997)

- řezy nechat na stole (30 min)
- PBS (5 min)
- Blokace endogenní peroxidázy (30 min)
(150 μ l H₂O₂/ 50 ml metanolu)
- H₂O (10 min)
- PBS (3 × 5 min)
- Předinkubace NRS 1:10, 1% BSA / PBS (30 min)
- PBS (3 × 5 min)
- Předinkubace TNB (blokovací medium z kitu TSA), RT (30 min)
- Streptavidin / PBS
(Kit Vector 4 kapky na 1 ml PBS) (15 min)
- PBS (3 × 5 min)
- Biotin / PBS (15 min)
(Kit Vector 4 kapky na 1 ml PBS)
- Praní TNT (3 × 5 min)
- Aplikace 1. Ab, mouse anti quail VEGF-R2, IgG1, používáme neředěnou ON

- TNT (3 × 10 min)
- Inkubace v Rabbit anti Mouse – Biotin (60 min)
ředíme v TNB (1:150)
- Praní TNT (3 × 5 min)
- Inkubace v Streptavidin Px TSA kitu 1:100 v TBS (30 min)
- TNT (3 × 5 min)
- Biotin-Tyramid, 1:50 v 1 × Amplification Diluent 3– (10 min)
- TNT (3 × 5 min)
- TNT Streptavidin Px 1:100 v TBS (30 min)
- TNT (3 × 5 min)
- DAB (10 min)
- praní ve vodě, montáž

Monoclonal anti-actin α -smooth muscle antibody (Sigma)

- Fixace serra ON, zalití do parafínu.
- odparafinování
- H₂O (5 min)
- PBS (3 × 5 min)
- Blokace, 1:10 NGS v 2% BSA v PBS + 0,1% Triton (30 min)
- Aplikace 1. Ab, anti-SMA, 1:500, RT ON
ředíme v 1:10 NGS v 2% BSA v PBS + 0,1% Triton
- PBS (3 × 5 min)
- Aplikace 2. Ab, Goat anti-mouse TRITC (Rhod) IgG, 1:100
1:10 NGS v 2% BSA v PBS, RT (30 min)
- PBS (3 × 5 min)
- H₂O, dobarvení jader, dehydratace, montáž

Monoclonal anti-cleaved caspase-3 antibody – detekce apoptózy (BD Pharmingen)

- Kryo řezy, fixace 4%PFA v PBS (4°C ON)
- řezy na stole (30 min)
- H₂O (5 min)
- PBS (5 min)
- PBS – TWEEN (0,05%) (10 min)
- PBS (5 min)
- Blokace endogenní peroxidázy (20 min)
metanol – 0,6 % peroxid vodíku, 200 ml + 2 ml H₂O₂
- H₂O (10 min)

- PBS (3 × 5 min)
- Předinkubace avidin (30 min)
4 kapky na 1 ml, 2% BSA + 1:20 NGS
- PBS (3 × 5 min)
- Předinkubace biotin (30 min)
4 kapky na 1 ml, 2% BSA + 1:20 NGS
- Aplikace 1. Ab, Cleaved caspase-3, 1:500, RT (90 min)
ředíme v 1:20 NGS v PBS
- PBS (3 × 10 min)
- Aplikace 2. Ab, Goat anti-rabbit Biotin, 1:150 (30 min)
ředíme v 1:10 NGS v PBS, RT
- PBS (3 × 5 min)
- Extravidin Px, 1:100 (30 min)
- PBS (3 × 5 min)
- Vybarvení – DAB, v temnu, RT 10 minut
22 ml 0,05 M Tris pH 7,6–7,8
17 mg Imidazol
10 mg DAB
třepeme, filtrujeme, poté přidáme 5 μ l H₂O₂, vše v temnu, ihned na skla
- H₂O, dobarvení jader, dehydratace a montáž

Polyclonal anti-fosfo-histon H3 antibody – detekce proliferace (Upstate)

- Kryo řezy, fixace 4%PFA v PBS (4 °C, ON)
- řezy na stole (30 min)
- PBS (3 × 5 min)
- Předinkubace, 1:10 NGS v 2% BSA v PBS (30 min)
- PBS (3 × 5 min)
- Aplikace 1. Ab, fosfo-histon 3, 1:100, RT (90 min)
ředíme v 1% BSA + 1:10 NGS
- PBS (3 × 10 min)
- Aplikace 2. Ab, Goat anti-rabbit rhodamine, 1:500, RT (90 min)
- DAPI (10 min)
- H₂O a montáž

Kyselá fosfatáza – podle Burstona

- Odparafínování
- metyl-butyl éter ($3 \times 4 \text{ min}$)
- aceton ($2 \times 4 \text{ min}$)
- aceton + voda (1:1) (2 min)
- H₂O (1 min)
- Inkubace, RT ON

10 mg naftolu rozpustíme v 0,5 ml N,N-dimetylformamidu
přidáme 25 ml H₂O a 25 ml 0,2M acetátového pufru, pH 5,2
přidáme 20 mg Fast red violet a 140 mg kyseliny vinné
H₂O a montáž do vodního média

9.2.2 Roztoky pro imunohistochemii**4% paraformaldehyd v PBS pro další zpracování v parafínu**

- 4 g paraformaldehyd
- 5 ml 20 × PBS
- 80 ml H₂O
- doplnit do 100 ml

Fixativum dle Serry pro další zpracování v parafínu (Serra, 1946)

- 300 ml absolutního etanolu
- 150 ml formaldehydu (40%)
- 50 ml ledová kyselina octová

20 × PBS (phosphate buffer solution)

- 160 g NaCl
- 4 g KCl
- 28,8 g Na₂HPO₄ bezvodý
- 4,8 g KH₂PO₄ bezvodý
- rozpustíme a doplníme do 1000 ml destilovanou vodou
- autokládujeme při 121 °C (20 min)

0,05M Tris – HCl pH 7,6

- 6,1 g Tris rozpustíme v 50 ml
- titrujeme 1M HCl (cca 37 ml) do pH 7,6
- doplníme do 1000 ml destilovanou vodou

TBS

- 6,05 g Trizma – Base
- 8,71 g NaCl
- úprava pH 1M HCl na 7,6
- doplníme destilovanou vodou 1000 ml

TNB blokovací pufr

- 0,1 M Tris HCl 7,5 pH
- 0,15 NaCl
- 0,5% Blocking reagent TSA kit

TNT - promývací pufr

- 0,1 M Tris HCl 7,5 pH
- 0,15 NaCl
- 0,05% Tween 20

Vyvolávací roztok pro barvení s diaminobenzidinem (DAB)

- 1 tableta DAB obsahuje 10 mg účinné látky, uchovávat ve tmě
- 1 tabletu DAB vhodíme do 22 ml Tris – HCl, filtrujeme, přidáme 5 μ l peroxidu vodíku 30 % a aplikujeme na řezy, vybarvujeme 10–15 minut.

Příprava sond a mRNA hybridizace *in situ*

Tento postup je modifikací protokolu dle Nieto et al. (1996).

Příprava a namnožení plasmidu v bakteriích Část papírku, kde je nanesený plasmid - DNA dáme do Eppendorf zkumavky (Epp), přidáme 300 μ l deionizované vody RT, 30–60 minut

Transformace bakterií tepelným šokem Kompetentní bakterie rozmrazíme, 100 μ l (uchovávány při -80°C), pak přidáme 10–20 μ l DNA a necháme odstát 15 minut, potom vložíme do vodní lázně na tepelný šok 42°C , 90 sekund, pak přidáme 200 μ l LB média a necháme inkubovat 1 hodinu při 37°C , potom lehce stočíme a přibližně 200 μ l rozetřeme po Petriho misce na agar s ampicilinem, inkubujeme přes noc při 37°C .

Prekultura Vybereme pipetovací špičkou jednu samostatnou kolonii a přeneseme ji do 5 ml tekutého LB média. Inkubujeme přes den v třepačce při 37 °C, večer zakalenou zkumavku s bakteriemi přelijeme do Erlenmayerovy baňky a přidáme 90 ml LB média a ampicilin v koncentraci 1:1000. Inkubujeme ve třepačce při 37 °C přes noc.

Získání plazmidu z kultury bakterií (Lýze bakterií, DNA separace, separace plazmidu)

50 ml kultury nalijeme do Falcon zkumavky a centrifugujeme 3500 rpm 4 °C, 10 minut, dále slijeme supernatant a přidáme dalších 50 ml kultury, postup opakujeme s celým objemem bakterií. Výslednou peletu bakterií lze uchovávat při –20 °C. Pomocí Qiagen Plasmid MIDI kit (cat No. 12143) izolujeme z bakterií DNA. Pracujeme dle návodu v kitu.

Peletu bakterií resuspendujeme v 4 ml pufru P1, ve kterém je RNAsa A. Přidáme 4 ml pufru P2, a necháme inkubovat 5 minut, poté přidáme 4 ml vychlazeného pufru P3, protřepeme a inkubujeme na ledu 15 minut. Poté zkumavky zcentrifugujeme 5 minut na 4000 rpm při 4 °C. Mezitím připravíme kolonku, přes kterou promyjeme supernatant, který obsahuje rozpuštěnou DNA. DNA se váže na kolonku, kterou pak dále promýváme 2 × 10 ml pufru QC. DNA z kolonky uvolníme pomocí pufru QF.

Linearizace plazmidu

- Celkový objem 20 μ l
- H₂O 11 μ l
- BSA 1 μ l
- 10 × pufr (podle rest. endon.) 2 μ l
- RNAasa A 0,5 μ l
- DNA 5 μ l
- restriční endonukleáza 1 μ l
- vortexujeme a inkubujeme 2 hodiny při 37 °C. Provedeme kontrolní elektroforézu linearizace.

DNA přečištění fenol-chloroformovou extrakcí a etanolovou precipitací
Pracovat v RNase free podmínkách. K DNA přidáme stejný objem fenol-chloroformu (1:1), vortexujeme a centrifugujeme 5 minut na 12 000 rpm. Pipetou odsajeme svrchní vodní fázi a přeneseme ji do nové zkumavky. Do zkumavky přidáme 1/10 objemu 3M acetátu sodného o pH 4,8 a poté dvojnásobný objem 100% etanolu. Poté necháme vzorek precipitovat přes noc při –20 °C. Poté centrifugujeme 12 000 rpm 30 minut při 4 °C. Odsajeme supernatant a peletu s DNA necháme v otevřené zkumavce uschnout. Peletu rozpustíme v 400 μ l deionizované H₂O a skladujeme v –20 °C.

Příprava sondy: *in vitro* transkripce

- 5 × Buffer 4 μ l
- DTT 2 μ l
- nukleotidy značené digoxigeninem 2 μ l
- DNA 1 μ g
- inhibitor RNáz 0.5 μ l
- DEPC H₂O doplnit do 20 μ l
- Polymeráza 2 μ l

Inkubujeme přes noc při 37 °C. Provedeme kontrolní RNA elektroforézu při RNase free podmínkách. Sondy přečistíme na připraveném Mini Quick spin column. 20 μ l sondy doředíme DEPC vodou do 75 μ l. Centrifugujeme přes kolonku 1000 rpm 4 minuty. Provedeme kontrolní RNA elektroforézu a sondu uložíme při –80 °C.

***In situ* hybridizace v parafinových řezech** Po celou dobu pracujeme při RNase free podmínkách. Parafinové řezy 16 μ m, krájíme na skla potažená silanem.

1. den

- odparafinování a dehydratace
- xylen (2 × 10 min)
- 100% etanol (2 × 5 min)
- praní v PBS (5 min)
- Prefixace, 4% PFA v PBS (30 min)
- Natrávení, proteináza K v PBS (0–7 min)

Zásobní koncentrace 20 mg/ml

250 μ l zásobního roztoku do 200 ml

- Postfixace, 4% PFA v PBS (15 min)
- PBS (2 × 5 min)
- 2 × SSC (2 × 5 min)
- 1 × Tris-Glycin pufr (30 min)

Hybridizační směs

- 40% formamid
- 5 × SSC
- 1 × Denhardtův roztok
- 100 μ g/ml DNA
- 100 μ g/ml tRNA
- 250 ng značené proby

- doplníme DEPC H₂O do 1 ml
- Hybridizační směs denaturujeme 4 minuty při 95 °C, chladíme na ledu a naneseme na skla 60–100 μ l, skla přikryjeme folií a uložíme do krabiček a ty pak do vlhké komůrky. Hybridizujeme při 65 °C ve vodní lázni přes noc (až 24 hodin).

2. den

Není již potřeba dodržovat RNase free podmínky.

- Posthybridizační praní, 5 \times SSC, vodní lázeň 60 °C (3 \times 15 min)
- 20% formamid + 0,5 \times SSC, vodní lázeň 60 °C (15 min)
- 2 \times SSC, pokojová teplota (15 min)
- Odštěpení nenahybridizované RNA (15 min)
250 μ l RNAsa c=10 mg/ml do 200 ml 2 \times SSC
t = 37 °C vodní lázeň
- Praní, 2 \times SSC, RT (15 min)
- 20% formamid + 0,5 \times SSC, třepací vodní lázeň, 60 °C (20 min)
- Praní, 2 \times SSC, RT (2 \times 15 min)
- Aplikace protilátky proti digoxigeninu značené AP přes noc
500 μ l na sklo, ředění 1:4000
1000 μ l 10% blokovacího media
4 μ l protilátky
9000 μ l 0,1M maleátového pufru, pH 7,5
skla do krabičky a vlhké komůrky (50 ml 2 \times SSC), 4 °C

3. den

- TBS pufr, RT, třepačka (3 \times 10 min)
- TBS, RT, třepačka (3 \times 30 min)
- TBS, RT, třepačka (2 \times 60 min)
- NTMT pufr, RT třepačka (3 \times 10 min)
- Vybarvení AP, inkubace NBT + BCIP
2 ml na sklo, vybarvování několik hodin až dní
- Zastavení reakce, 600 ml PBS + 1,20 ml EDTA, pH 8,00 (3 \times 10 min)
- Odvodnění, montáž.

9.2.3 Roztoky a chemikálie pro přípravu sond a ISH

všechny pracovní roztoky ředíme v DEPC vodě.

AP barvicí roztok

- K vybarvení signálu ISH reakcí používáme protilátku proti digoxigeninu značenou AP.
- 10% roztok dimethylformamidu v NTMT.
- 1 ml NTMT
- 4,5 μ l NBT
- 3,5 μ l BCIP

10% blokovací roztok

- Z BM detekčního kitu blokovací prášek
- 5 g do 50 ml maleátového pufru, třepeme, ohříváme a autokládujeme. Skladujeme při -20°C

100 \times Denhardtův roztok

- 10 g Ficoll Pharmacia, Typ 400
- 10 g polyvinylpyrrolidin PVP40
- 10 g BSA frakce V
- doplnit do 500 ml DEPC H₂O
- špatně se rozpouští, trvá cca 2 dny na míchačce, RT, sterilně filtrujeme, uchováváme při -20°C

LB médium

- 500 ml destilovaná voda
- 12,5 g LB broth (Sigma)
- autokládujeme
- (antibiotika 1:1000, přidáváme před použitím)

LB agar

- 500 ml destilovaná voda
- 12,5 g LB broth (Sigma)
- 7,5 g agar
- antibiotika 1:1000

Maleátový pufr

- 11,6 g kyseliny maleinové
- 8,7 g NaCl
- 7,8 g NaOH do 1000 DEPC H₂O

NTMT alkalický AP pufr

- 12 ml 5M NaCl
- 30 ml $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
- 60 ml 1M Tris pH 9,5
- 6 ml 10% Tween 20
- ad 600 ml destilovaná H_2O
- připravujeme vždy čerstvý, protože skladováním dochází ke změně pH.

20 × PBS

- 160 g NaCl
- 4 g KCl
- 28,8 g Na_2HPO_4 bezvodý
- 4,8 g KH_2PO_4 bezvodý
- rozpustíme v 800 ml DEPC H_2O
- doplníme do 1000 ml

4% PFA v PBT

- Ke 400 ml PBT v lahvi po zautoklávování přidáme 16 g PFA, protřepeme a vložíme do vodní lázně 65°C . Ponecháme do rozpuštění, trvá cca 2–3 hodiny. Zamrazíme do -20°C .

PBT

- 400 ml PBS + 4 ml 10% Tritonu X-100 vše v DEPC vodě
- autoklávujeme

Proteináza K

- zásobní koncentrace 20 mg v DEPC vodě
- v alikvotech zamrazíme do -20°C .

10% SDS

- 10 g SDS do 100 ml DEPC H_2O
- při ředění na 0,1% ředíme v DEPC H_2O

20 × SSC

- 175,3 g NaCl
- 88,2 g citrát sodný
- doplníme do 1000 ml DEPC H_2O , autoklávujeme

10 × TBS

- 80 g NaCl
- 2 g KCl
- 250 ml Tris-HCl, pH 7,5
- doplníme do 1000 ml H₂O

10 × TRIS - Glycin pufr

- 60,5 g TRIS base
- 37,5 g glycinu do 500 ml DEPC H₂O, autoklávueme

Tris – HCl, pH 7,5

- 6,1 g Tris rozpustíme v DEPC H₂O a titrujeme 1M HCl do požadovaného pH (cca 37 ml 0,1M HCl)

10% Triton X 100

- ředíme při 37 °C
- 5 ml Triton X 100
- doplníme 50 ml H₂O

10% Tween 20

- ředíme při 37 °C
- 5 ml Tween 20
- doplníme do 50 ml H₂O

10 Reference

- Ahlgren SC, Bronner-Fraser M.* 1999. Inhibition of sonic hedgehog signaling in vivo results in craniofacial neural crest cell death. *Curr Biol* 9:1304–1314.
- Astorga J, Carlsson P.* 2007. Hedgehog induction of murine vasculogenesis is mediated by Foxf1 and Bmp4. *Development* 134:3753–3761.
- Bartel H, Lametschwandtner A.* 2000. Intussusceptive microvasculant growth in the lung of larval *Xenopus laevis*. A light microscope, transmission electron microscope and SEM study of microvascular corrosion casts. *Anat Embryol* 202: 55–66.
- Bjerring HC.* 1967. Does a homology exist between the basicranial muscle and the polar cartilage? *Colloques int Cent Natn Rech Scient* 163: 223–267.
- Bjerring HC.* 1973. Relationships of coelacanthiforms. In *Interrelationships of Fishes* (eds Greenwood PH, Miles RS, Patterson C), London: Academic Press:179–205.
- Bjerring HC.* 1977. A contribution to structural analysis of the head of craniate animals. *Zool Scr* 6: 127–183.
- Boas JEV.* 1882. Über den Conus arteriosus und die Arterienbogen der Amphibien. *Morph Jahrb* 7: 488–568.
- Brand-Saberi B, Seifert R, Grim M, Wilting J, Kuhlewein M, Christ B.* 1995. Blood vessel formation in the avian limb bud involves angioblastic and angiogenic growth. *Dev Dyn* 202:181–194.
- Brazeau MD, Ahlberg PE.* 2006. Tetrapod-like middle ear architecture in a Devonian fish. *Nature* 439: 318–321.
- Brito JM, Teillet MA, Le Douarin NM.* 2006. An early role for sonic hedgehog from foregut endoderm in jaw development: ensuring neural crest cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:11607–11612.
- Byrd N, Becker S, Maye P, Narasimhaiah R, St-Jacques B, Zhang X, McMahon J, McMahon A, Grabel L.* 2002. Hedgehog is required for murine yolk sac angiogenesis. *Development* 129:361–372.
- Carroll R.* 1995. Between fish and amphibian. *Nature* 373: 389–390.
- Carpenter D, Stone DM, Brush J, Ryan A, Armanini M, Frantz G, Rosenthal A, de Sauvage FJ.* 1998. Characterization of two patched receptors for the vertebrate hedgehog protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13630–13634.

- Clack JA, Ahlberg PE, Finney SM, Dominguez Alonso P, Robinson J, Ketcham RA.* 2003. A uniquely specialized ear in a very early tetrapod. *Nature* 425: 65–69.
- Clack JA.* 1994. The earliest known tetrapod braincase and the evolution of the stapes and fenestra ovalis. *Nature* 369: 392–394.
- Corcoran RB, Scott MP.* 2001. A mouse model for medulloblastoma and basal cell nevus syndrome. *J Neurooncol* 53:307–318.
- Cuadros MA, Coltey P, Carmen Nieto M, Martin C.* 1992. Demonstration of a phagocytic cell system belonging to the hemopoietic lineage and originating from the yolk sac in the early avian embryo. *Development* 115:157–168.
- Daeschler EB, Shubin NH, Jenkins FA Jr.* 2006. A Devonian tetrapod-like fish and the evolution of the tetrapod body plan. *Nature* 440: 757–763.
- Darnell RM Jr.* 1949. Aortic arches and associated arteries of caudate Amphibia. *Copeia* 1949: 18–31.
- De Saint-Aubain ML.* 1985. Blood flow patterns of the respiratory system in larval and adult amphibian: functional morphology and phylogenetic significance. *Z Zool Syst Evol* 23: 229–240.
- Delsol M, Flatin J.* 1972. Anatomie du systeme vasculaire des tetards de batraciens. Paris: Librairie de la Faculté des Sciences.
- Duprez D, Fournier-Thibault C, Le Douarin N.* 1998. Sonic Hedgehog induces proliferation of committed skeletal muscle cells in the chick limb. *Development* 125:495–505.
- Eggenchwiler JT, Espinoza E, Anderson KV.* 2001. Rab23 is an essential negative regulator of the mouse Sonic hedgehog signalling pathway. *Nature* 412:194–198.
- Elsie M, Stephenson NG.* 1947. On the circulatory system of *Leiopelma hochstetteri* with particular references to the posterior cardinal vein and to the blood-vessels of the kidneys. *Trans R Soc N Z* 76: 492–503.
- Esner M, Meilhac SM, Relaix F, Nicolas JF, Cossu G, Buckingham ME.* 2006. Smooth muscle of the dorsal aorta shares a common clonal origin with skeletal muscle of the myotome. *Development* 133:737–749.
- Evans DJ, Noden DM.* 2006. Spatial relations between avian craniofacial neural crest and paraxial mesoderm cells. *Dev Dyn* 235:1310–1325.
- Fan CM, Tessier-Lavigne M.* 1994. Patterning of mammalian somites by surface ectoderm and notochord: evidence for sclerotome induction by a hedgehog homolog. *Cell* 79:1175–1186.

- Flamme I.* 1989. Is extraembryonic angiogenesis in the chick embryo controlled by the endoderm? A morphology study. *Anat Embryol (Berl)* 180:259–272.
- Fox H.* 1959. The study of the development of the head and pharynx of the larval urodele *Hynobius* and its bearing on the evolution of the vertebrate head. *Phil Trans R Soc* 242: 151–205.
- Gaupp E.* 1899. Anatomie des Frosches. Abt. 2. Lehre Vom Nerven- und Gefäßsystem. Braunschweig: Vieweg u. Sohn.
- Goodrich LV, Milenkovic L, Higgins KM, Scott MP.* 1997. Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science* 277:1109–1113.
- Grobbelaar CS.* 1924a. On the venous and arterial system of the ‘Platanna’ (*Xenopus laevis*, Daud). *Z Anat Entwicklungs* 72: 392–398.
- Hamburger V, Hamilton HL.* 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* 88:49–90.
- Handley-Gearhart PM, Stephen AG, Trausch-Azar JS, Ciechanover A, Schwartz AL.* 1994. Human ubiquitin-activating enzyme, E1. Indication of potential nuclear and cytoplasmic subpopulations using epitope-tagged cDNA constructs. *J Biol Chem* 269:33171–33178.
- Hiruma T, Hirakow R.* 1995. Formation of the pharyngeal arch arteries in the chick embryo. Observations of corrosion casts by scanning electron microscopy. *Anat Embryol (Berl)* 191:415–423.
- Hooper JE, Scott MP.* 2005. Communicating with Hedgehogs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:306–317.
- Chadee DN, Taylor WR, Hurta RA, Allis CD, Wright JA, Davie JR.* 1995. Increased phosphorylation of histone H1 in mouse fibroblasts transformed with oncogenes or constitutively active mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem* 270:20098–20105.
- Chen Y, Struhl G.* 1996. Dual roles for patched in sequestering and transducing Hedgehog. *Cell* 87:553–563.
- Christ B, Grim M, Wilting J, von Kirschhofer K, Wachtler F.* 1991. Differentiation of endothelial cells in avian embryos does not depend on gastrulation. *Acta Histochem* 91:193–199.
- Incardona JP, Gaffield W, Lange Y, Cooney A, Pentchev PG, Liu S, Watson JA, Kapur RP, Roelink H.* 2000. Cyclopamine inhibition of Sonic hedgehog signal transduction is not mediated through effects on cholesterol transport. *Dev Biol* 224:440–452.

- Jaffredo T, Gautier R, Eichmann A, Dieterlen-Lievre F.* 1998. Intraaortic hemopoietic cells are derived from endothelial cells during ontogeny. *Development* 125:4575–4583.
- Jarvik E.* 1980. *Basic Structure and Evolution of Vertebrates*. London: Academic Press.
- Jeong J, Mao J, Tenzen T, Kottmann AH, McMahon AP.* 2004. Hedgehog signaling in the neural crest cells regulates the patterning and growth of facial primordia. *Genes Dev* 18:937–951.
- Johnson RL, Laufer E, Riddle RD, Tabin C.* 1994. Ectopic expression of Sonic hedgehog alters dorsal-ventral patterning of somites. *Cell* 79:1165–1173.
- Kato S, Kurihara K.* 1989. The blood vascular architecture of the salamander external gill: a scanning microscopic study of corrosion cast. *Okajimas Folia Anat Japon* 66: 171–194.
- Klinckowström AV.* 1894. *Zur Anatomie der Pipa Americana*. 3. Gefäßsystem und subcutane Lymphsäcke. *Zool Jahrb Abt Anat Ontog Tiere* 7: 647–666.
- Kolesová H, Lametschwandtner A, Rocek Z.* 2007. The evolution of amphibian metamorphosis: insights based on the transformation of the aortic arches of *Pelobates fuscus* (Anura). *J Anat* 210:379–393.
- Kolesová H, Roelink H, Grim M.* 2008. Sonic hedgehog is required for the assembly and remodeling of branchial arch blood vessels. *Dev Dyn* 237:1923–1934.
- Kusakabe T.* 1992. Ultrastructural characteristic of glomus cells in the external carotid artery during the larval development and metamorphosis in bullfrogs, *Rana catesbeiana*. *Anat Rec* 233: 461–466.
- Koziel L, Kunath M, Kelly OG, Vortkamp A.* 2004. Ext1-dependent heparan sulfate regulates the range of Ihh signaling during endochondral ossification. *Dev Cell* 6:801–813.
- Lammert E, Cleaver O, Melton D.* 2001. Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels. *Science* 294:564–567.
- Lanot R.* 1962. Evolution des arcs artériels postérieurs au cours de la métamorphose chez la grenouille rousse (*Rana temporaria*). *B Biol Fr Belg* 96: 703–722.
- Le Lievre CS, Le Douarin NM.* 1975. Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos. *J Embryol Exp Morphol* 34:125–154.
- Lupi O.* 2007. Correlations between the Sonic Hedgehog pathway and basal cell carcinoma. *Int J Dermatol* 46:1113–1117.

- Magnin E.* 1959. Anatomie du tetard d'Alytes obstetricans Laur. Act Soc Linn Bordeaux 98: 1–60.
- Marigo V, Tabin CJ.* 1996. Regulation of patched by sonic hedgehog in the developing neural tube. Proc Natl Acad Sci U S A 93:9346–9351.
- Mc Indoe R, Smith DG.* 1984a. Functional anatomy of the internal gills of the tadpole *Litoria ewigni* (Anura: Hylidae). Zoomorphology 104: 280–291.
- Mc Indoe R.* 1984b. Functional morphology of gills in larval amphibians. Respiration and metabolism of embryonic vertebrate, Seymour RS, Dordrecht: Dr. W. Junk: 55–69.
- McMahon AP, Ingham PW, Tabin CJ.* 2003. Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. Curr Top Dev Biol 53:1–114.
- Millard N.* 1941. The vascular anatomy of *Xenopus laevis* (Daudin). Trans R Soc S Afr 28: 387–439.
- Millard N.* 1942. Abnormalities and variations in the vascular system of *Xenopus laevis* (Daudin). Trans R Soc S Afr 29: 9–28.
- Millard N.* 1945. The development of the arterial system of *Xenopus laevis*, including experiments on the destruction of the larval aortic arches. Trans R Soc S Afr 30: 217–234.
- Moy-Thomas JA, Miles RS.* 1971. Palaeozoic Fishes. London: Chapman & Hall.
- Muller B, Basler K.* 2000. The repressor and activator forms of *Cubitus interruptus* control Hedgehog target genes through common generic gli-binding sites. Development 127:2999–3007.
- Nagase T, Nagase M, Yoshimura K, Machida M, Yamagishi M.* 2006. Defects in aortic fusion and craniofacial vasculature in the holoprosencephalic mouse embryo under inhibition of sonic hedgehog signaling. J Craniofac Surg 17:736–744.
- Nanka O, Valasek P, Dvorakova M, Grim M.* 2006. Experimental hypoxia and embryonic angiogenesis. Dev Dyn 235:723–733.
- Nieto MA, Patel K, Wilkinson DG.* 1996. In situ hybridization analysis of chick embryos in whole mount and tissue sections. Methods Cell Biol 51:219–235.
- Nieuwkoop PD, Faber J.* 1967. Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Amsterdam: North-Holland Publishing Co.
- Nimmagadda S, Geetha Loganathan P, Huang R, Scaal M, Schmidt C, Christ B.* 2005. BMP4 and noggin control embryonic blood vessel formation by antagonistic regulation of VEGFR-2 (Quek1) expression. Dev Biol 280:100–110.

- Nimmagadda S, Loganathan PG, Wilting J, Christ B, Huang R.* 2004. Expression pattern of VEGFR-2 (Quek1) during quail development. *Anat Embryol (Berl)* 208:219–224.
- Noden DM, Trainor PA.* 2005. Relations and interactions between cranial mesoderm and neural crest populations. *J Anat* 207:575–601.
- Nonaka S, Yoshida S, Watanabe D, Ikeuchi S, Goto T, Marshall WF, Hamada H.* 2005. De novo formation of left-right asymmetry by posterior tilt of nodal cilia. *PLoS Biol* 3:e268.
- Oh SJ, Jeltsch MM, Birkenhager R, McCarthy JE, Weich HA, Christ B, Alitalo K, Wilting J.* 1997. VEGF and VEGF-C: specific induction of angiogenesis and lymphangiogenesis in the differentiated avian chorioallantoic membrane. *Dev Biol* 188:96–109.
- Orlando K, Pinder AW.* 1995. Larval cardiorespiratory ontogeny and allometry in *Xenopus laevis*. *Physiol Zool* 68: 63–75.
- Pardanaud L, Dieterlen-Lievre F.* 1993. Emergence of endothelial and hemopoietic cells in the avian embryo. *Anat Embryol (Berl)* 187:107–114.
- Pardanaud L, Yassine F, Dieterlen-Lievre F.* 1989. Relationship between vasculogenesis, angiogenesis and haemopoiesis during avian ontogeny. *Development* 105:473–485.
- Poh A, Karunaratne A, Kolle G, Huang N, Smith E, Starkey J, Wen D, Wilson I, Yamada T, Hargrave M.* 2002. Patterning of the vertebrate ventral spinal cord. *Int J Dev Biol* 46:597–608.
- Pola R, Ling LE, Silver M, Corbley MJ, Kearney M, Pepinsky RB, Shapiro R, Taylor FR, Baker DP, Asahara T, Isner JM.* 2001. The morphogen Sonic hedgehog is an indirect angiogenic agent upregulating two families of angiogenic growth factors. *Nature Medicine* 7:706–711.
- Pouget C, Gautier R, Teillet MA, Jaffredo T.* 2006. Somite-derived cells replace ventral aortic hemangioblasts and provide aortic smooth muscle cells of the trunk. *Development* 133:1013–1022.
- Riddle RD, Johnson RL, Laufer E, Tabin C.* 1993. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* 75:1401–1416.
- Risau W, Flamme I.* 1995. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11:73–91.
- Roberts DJ, Johnson RL, Burke AC, Nelson CE, Morgan BA, Tabin C.* 1995. Sonic hedgehog is an endodermal signal inducing Bmp-4 and Hox genes during induction and regionalization of the chick hindgut. *Development* 121:3163–3174.

- Roček Z.* 2003. Larval development and evolutionary origin of the anuran skull. In *Amphibian Biology, Vol. 5: Osteology* (eds Heatwole H, Davies M), Chipping Norton: Surrey Beatty & Sons: 1877–1995.
- Rodriguez Esteban C, Capdevila J, Economides AN, Pascual J, Ortiz A, Izpisua Belmonte JC.* 1999. The novel Cer-like protein Caronte mediates the establishment of embryonic left-right asymmetry. *Nature* 401:243–251.
- Roelink H, Porter JA, Chiang C, Tanabe Y, Chang DT, Beachy PA, Jessell TM.* 1995. Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. *Cell* 81:445–455.
- Romer AS.* 1937. The braincase of the Carboniferous crossopterygian *Megalichthys nitidus*. *B Mus Comp Zool* 82: 1–73.
- Saunders JW, Jr., Gasseling MT.* 1963. Trans-filter propagation of apical ectoderm maintenance factor in the chick embryo wing bud. *Dev Biol* 7:64–78.
- Schmalhausen II.* 1953. The first arterial arches and the development of the carotid artery system in Amphibia. *Zool Zh* 32: 937–954.
- Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzouana G, Gillessen D, Gabbiani G.* 1986. A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol* 103:2787–2796.
- Stadelmann C, Lassmann H.* 2000. Detection of apoptosis in tissue sections. *Cell Tissue Res* 301:19–31.
- Strawinski S.* 1956. Vascularization of respiratory surfaces in ontogeny of the edible frog, *Rana esculanta*. *Zool Pol* 7: 327–365.
- Szarski H.* 1937. The blood vessels of the thymus gland in some of the Salientia. *B Acad Pol Sci Lett B* 1937: 139–149.
- Tian H, Tenzen T, McMahon AP.* 2004. Dose dependency of *Disp1* and genetic interaction between *Disp1* and other hedgehog signaling components in the mouse. *Development* 131:4021–4033.
- Tickle C, Summerbell D, Wolpert L.* 1975. Positional signalling and specification of digits in chick limb morphogenesis. *Nature* 254:199–202.
- van Tuyl M, Groenman F, Wang J, Kuliszewski M, Liu J, Tibboel D, Post M.* 2007. Angiogenic factors stimulate tubular branching morphogenesis of sonic hedgehog-deficient lungs. *Dev Biol* 303:514–526.
- Vokes SA, Krieg PA.* 2002. Endoderm is required for vascular endothelial tube formation, but not for angioblast specification. *Development* 129:775–785.

- Vokes SA, Yatskievych TA, Heimark RL, McMahon J, McMahon AP, Antin PB, Krieg PA. 2004. Hedgehog signaling is essential for endothelial tube formation during vasculogenesis. *Development* 131:4371–4380.
- von Kirschhofer K, Grim M, Christ B, Wachtler F. 1994. Emergence of myogenic and endothelial cell lineages in avian embryos. *Dev Biol* 163:270–278.
- Vorobyeva E. 1995. The shoulder girdle of *Panderichthys rhombolepis* (Gross) (Crossopterygii), Upper Devonian, Latvia. *Geobios* 19: 285–288.
- Washington Smoak I, Byrd NA, Abu-Issa R, Goddeeris MM, Anderson R, Morris J, Yamamura K, Klingensmith J, Meyers EN. 2005. Sonic hedgehog is required for cardiac outflow tract and neural crest cell development. *Dev Biol* 283:357–372.
- Wiegrefe C, Christ B, Huang R, Scaal M. 2007. Sclerotomal origin of smooth muscle cells in the wall of the avian dorsal aorta. *Dev Dyn* 236:3191–3192.
- Wilting J, Eichmann A, Christ B. 1997. Expression of the avian VEGF receptor homologues Quek1 and Quek2 in blood-vascular and lymphatic endothelial and non-endothelial cells during quail embryonic development. *Cell Tissue Res* 288:207–223.
- Witschi E. 1956. Integration of larval organs. In *Development of Vertebrates* (ed. Witschi E), Philadelphia: Saunders: 115–137.
- Xie J, Johnson RL, Zhang X, Bare JW, Waldman FM, Cogen PH, Menon AG, Warren RS, Chen LC, Scott MP, Epstein EH, Jr. 1997. Mutations of the PATCHED gene in several types of sporadic extracutaneous tumors. *Cancer Res* 57:2369–2372.
- Yamagishi C, Yamagishi H, Maeda J, Tsuchihashi T, Ivey K, Hu T, Srivastava D. 2006. Sonic hedgehog is essential for first pharyngeal arch development. *Pediatr Res* 59:349–354.
- Yamazaki M, Nakamura K, Mizukami Y, Ii M, Sasajima J, Sugiyama Y, Nishikawa T, Nakano Y, Yanagawa N, Sato K, Maemoto A, Tanno S, Okumura T, Karasaki H, Kono T, Fujiya M, Ashida T, Chung DC, Kohgo Y. 2008. Sonic hedgehog derived from human pancreatic cancer cells augments angiogenic function of endothelial progenitor cells. *Cancer Sci* 99:1131–1138.
- Yokouchi Y, Vogan KJ, Pearse RV, 2nd, Tabin CJ. 1999. Antagonistic signaling by Caronte, a novel Cerberus-related gene, establishes left-right asymmetric gene expression. *Cell* 98:573–583.

11 Publikace

Podkladem dizertační práce jsou:

Kolesová H, Roelink H, Grim M. 2008. Sonic hedgehog is required for the assembly and remodeling of branchial arch blood vessels. Dev Dyn 237:1923–1934 (IF 3,169).

*Kolesová H, Lametschwandtner A, Roček Z. 2007. The evolution of amphibian metamorphosis: insights based on the transformation of the aortic arches of *Pelobates fuscus* (Anura). J Anat 210(4): 379–93. (IF 2,458).*

Kumulovaný impact factor na počet autorů je 2,8135.

Prezentace na kongresech a sympoziích

Kolesová H, Roelink H, Grim M. 2008. Disruption of Shh signaling causes vascular malformation in the branchial arches region. Developmental Vascular Biology Workshop III, Monterey, Kalifornia, USA

Kolesová H, Roelink H, Grim M. 2007. Disruption of Shh signaling causes vascular malformation and increases number of non-luminized vessels in the branchial arches region. Morphology 2007, Bratislava, SK

Kolesová H, Roelink H, Grim M. 2007. Sonic hedgehog in avian branchial arch development. Experimental Biology Meeting 2007, Washington DC, USA

Kolesová H, Roelink H, Grim M. 2007. Sonic hedgehog in avian branchial arch development. Northwest Developmental Biology Meeting, Friday Harbor, USA

Kolesová H, Grim M. 2006. Influence of Sonic hedgehog onto the branchial arches development in avian embryo. Morphology 2006, Praha

Kolesová H, Grim M. 2006. Vliv Sonic hedgehog na vývoj aortálních oblouků. 7. studentská vědecká konference 1.LF UK, Praha

Kolesová H, Roelink H, Grim M. 2006 Influence of Sonic hedgehog onto the aortic arches development in avian embryo. Anatomische Gesellschaft, Freiburg, Germany

Kolesová H, Grim M. 2006. Influence of Sonic hedgehog onto the aortic arches development in avian embryos. Developmental Vascular Biology Workshop II, Monterey, Kalifornia, USA

- Kolesová H, Grim M. 2005. Expression of Sonic Hedgehog in the Branchial Region of Chick and Quail Embryo. 43th Symposium of the Czech Anatomical Society, Brno, 131*
- Majorová H, Roček Z. 2004. Transformations of Aortic Arches During Metamorphosis of the Spade-foot Toad, Pelobates fuscus. J Morph 260 (3):309 (7th International Congress of Vertebrate Morphology, Boca Raton, Florida, USA)*
- Majorová H, Roček Z. 2003. Transformations of aortic arches in Pelobates fuscus. 41th Symposium of the Czech Anatomical Society, Hradec Králové 40*
- Majorová H, Roček, Z. 2003. Metamorphic reorganization of aortic arches of Pelobates fuscus (Anura, Amphibia). Abstracts from Advances in vascular casting, Salzburg, Austria 58–61*

Ocenění

- Cena České anatomické společnosti a firmy Olympus CČS v roce 2008 za oba články, které jsou podkladem této dizertace.*
- Cena nakladatelství Galén a druhá cena ve studentské vědecké konferenci 1. LF UK. Kolesová H, Grim M. 2006. Vliv Sonic hedgehog na vývoj aortálních oblouků. 7. studentská vědecká konference 1.LF UK, Praha*