

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra antropologie a genetiky člověka



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Rozbor embryotoxického účinku hydrokortizonu
metodou CHEST**

*Analysis of embryotoxic effect of hydrocortisone using chick embryotoxicity screening test
(CHEST)*

Bc. Michaela Janíková

Školitel: Doc. MUDr. Miroslav Peterka, DSc.

Srpen 2011

Tato diplomová práce byla vypracována na oddělení teratologie Ústavu experimentální medicíny Akademie věd České republiky v Praze v letech 2009-2011 pod vedením
Doc. MUDr. Miroslava Peterky, DSc.

Prohlášení:

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Všechny literární prameny, které jsem při vypracování používala, nebo z nich čerpala, v práci řádně cituji s uvedením úplného odkazu na příslušný zdroj.

V Praze dne 25.8.2011

.....
Michaela Janíková

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému školiteli Doc. MUDr. Miroslavu Peterkovi, DSc. za iniciaci mého zájmu o teratologii jako takovou, za uvedení do problematiky tohoto vědního oboru a za všestrannou pomoc, vedení a sdílení zkušeností během vypracovávání mé diplomové práce.

Dále bych chtěla poděkovat svým kolegům z oddělení teratologie za vřelé přijetí a pomoc při získávání zkušeností s prací v laboratoři. Jmenovitě děkuji především Mgr. Janu Procházkovi za cenné rady a pomoc při vypracovávání metodiky i celkovou podporu a své kolegyni Mgr. Petře Herlové za velkou ochotu a pomoc při provádění metody CHEST. Můj dík patří také Mgr. Janě Oujezdské z laboratoře imunologie Ústavu molekulární genetiky AV ČR za asistenci a pomoc při provádění měření na průtokovém cytometru.

Obsah

Abstrakt (v českém jazyce).....	7
Abstract (v anglickém jazyce).....	8
Seznam zkratek.....	9
1. Úvod.....	10
1.1. Základní principy teratologie.....	10
1.1.1. Historie teratologie a její vymezení jakožto vědeckého oboru.....	10
1.1.2. Základní teratologické pojmy a principy teratogeneze.....	12
1.1.3. Příčiny vrozených vad a jejich dělení.....	14
1.1.4. Kritická a senzitivní perioda.....	15
1.2. Orofaciální rozštěpové vady.....	17
1.2.1. Srůstání obličejových výběžků a způsob vzniku orofaciálních rozštěpových vad.....	17
1.2.2. Teratogeneze orofaciálních rozštěpů.....	18
1.2.3. Teratogeny způsobující orofaciální rozštěpové vady.....	19
1.2.4. Závažnost rozštěpových vad.....	20
1.3. Hydrokortizon.....	21
1.3.1. Obecné vlastnosti hydrokortizonu.....	21
1.3.2. Glukokortikoidový receptor.....	22
1.3.3. Hydrokortizon jako teratogen.....	24
1.3.4. Kuře jako model teratogenního působení hydrokortizonu.....	25
1.4. Buněčný cyklus a možnosti jeho ovlivnění.....	29
1.4.1. Obecné parametry buněčného cyklu.....	29
1.4.2. Délka buněčného cyklu.....	30
1.4.3. Možnosti ovlivnění buněčného cyklu vnějším činitelem.....	30
1.4.4. Vliv hydrokortizonu na buněčný cyklus.....	31
2. Cíle práce.....	32
3. Materiál a metody.....	33
3.1. Materiál.....	33
3.2. Metody.....	34
3.2.1. Inkubace kuřecích zárodků.....	34

3.2.2. CHEST (<i>Chick Embryotoxicity Screening Test</i>).....	35
3.2.3. Natržení amniového vaku.....	37
3.2.4. Průtoková cytometrie.....	37
3.2.5. Imunohistochemie.....	40
3.2.6. Detekce apoptózy – metoda TUNEL.....	42
4. Výsledky.....	45
4.1. Optimalizace užívané dávky.....	45
4.2. Natržení amniového vaku.....	47
4.3. Analýza pomocí průtokové cytometrie.....	48
4.3.1. Určení koncentrace pH3 a optimalizace dalších parametrů protokolu.....	48
4.3.2. Měření počtu buněk v M fázi.....	48
4.3.3. Analýza buněčného cyklu.....	50
4.4. Analýza pomocí imunohistochemie.....	54
4.4.1. Značení buněk v S fázi.....	54
4.4.2. Sledování vlivu hydrokortizonu na buněčný cyklus na histologických řezech.....	55
4.5. Analýza výskytu apoptózy po aplikaci hydrokortizonu.....	57
4.5.1. Volba pozitivní kontroly.....	57
4.5.2. Výskyt apoptózy na řezech frontonasálního výběžku.....	57
5. Diskuze.....	59
5.1. Úvod do diskuze.....	59
5.2. Buněčný cyklus.....	60
5.2.1. Rozbor výsledků průtokové cytometrie.....	60
5.2.2. Vlastnosti populace buněk citlivých na působení hydrokortizonu.....	61
5.2.3. Změny po aplikaci hydrokortizonu v GC populaci.....	62
5.2.4. Propojení získaných výsledků s dřívějšími studiemi.....	63
5.2.5. Rozbor výsledků imunohistochemie.....	64
5.3. Rozdíly v senzitivitě mezi epitelem a mezenchymem.....	66
5.4. Apoptóza.....	68
5.5. Etiopatogeneze rozštěpu rtu v souvislosti se získanými výsledky.....	69
5.5.1. Malá velikost senzitivní populace buněk.....	69
5.5.2. Senzitivita buněk na hydrokortizon v širším vývojovém kontextu.....	70
5.6. Směr dalšího výzkumu a uplatnění výsledků v klinické praxi.....	73

6. Závěry.....	75
7. Seznam použité literatury.....	76
8. Přílohy	89

Abstrakt

Rozštěp rtu je jednou z nejčastějších vrozených vad u lidí. Jeho etiopatogeneze je multifaktoriální a mnoho aspektů jeho vzniku je jak na poli genetiky tak teratologie stále neznámých. Jedním z negativních zevních faktorů, který je s jeho vznikem spojen, je hydrokortizon. Působení hydrokortizonu na buněčnou proliferaci je velice různorodé v závislosti na vlastnostech konkrétní buněčné populace. V této práci byl na základě metody CHEST studován vznik rozštěpu zobáku u kuřete po aplikaci hydrokortizonu. Cílem práce bylo odhalit změny v cyklu buněk frontonasálního výběžku pomocí průtokové cytometrie. Hydrokortizon způsoboval zbrždění buněčného cyklu v S fázi, avšak pouze u menšinové subpopulace vysoce granulárních buněk se specifickým buněčným cyklem. Tato senzitivní subpopulace byla lokalizována v oblastech výskytu již dříve určených proliferačních center frontonasálního výběžku na podkladě imunohistochemie na řezech zamražené tkáně. Kvantitativní analýza buněk těchto oblastí odhalila signifikantní pokles podílu buněk v M fázi u hydrokortizonovaných vzorků oproti kontrole. Pro určení míry apoptózy v oblasti frontonasálního výběžku bylo použito barvení metodou TUNEL na histologických řezech. Porovnání hydrokortizonovaných a kontrolních vzorků neodhalilo v množství apoptózy žádné rozdíly.

V této práci jsme prokázali, že buňky frontonasálního výběžku kuřete v oblastech proliferačních center jsou působením hydrokortizonu zbržděny v S fázi cyklu, což se projevuje snížením jejich proliferace. Součástí negativního efektu hydrokortizonu ve frontonasální oblasti není nárůst míry apoptózy. Tento děj lze proto jako významného činitele v rámci etiopatogeneze rozštěpu zobáku po působení hydrokortizonu vyloučit.

Klíčová slova: Rozštěp rtu, hydrokortizon, buněčný cyklus, S fáze, CHEST, průtoková cytometrie, imunohistochemie, TUNEL, apoptóza

Abstract

Cleft lip is one of the most common human birth defects. Its etiopathogenesis is multifactorial and many aspects of its occurrence remain unknown in the fields of both genetics and teratology. One of the set of known negative external factors causing cleft lip is chemical hydrocortisone. Its effect on cell proliferation is highly heterogeneous and depends on attributes of a specific cell population. In this work we studied the cleft beak origin after the hydrocortisone treatment on the basis of Chick Embryotoxicity Screening Test (CHEST). Our main aim was to detect cell cycle changes in the chick frontonasal process after hydrocortisone injection via flow cytometry analysis. Hydrocortisone caused S phase arrest within a minor subpopulation of highly granular cells with specific cell cycle. This sensitive subpopulation was localized in the areas of previously defined proliferative centers within the frontonasal process using immunohistochemistry of frozen sections. Quantitative analysis of cells in these areas revealed significant decrease of M phase portion in the hydrocortisone treated samples in comparison with the control samples. The TUNEL staining of histological sections was used to determine the apoptotic rate in the frontonasal process. The comparison between the control and the hydrocortisone treated samples didn't reveal any differences.

Our results show that cells in the areas of the proliferative centers in the chick frontonasal process are slowed down in the S phase of the cycle after the hydrocortisone treatment. This is reflected in lower proliferation of these cells. Apoptosis isn't part of the negative effect of hydrocortisone in the frontonasal process. It can be therefore excluded as the substantial agent in the etiopathogenesis of a cleft beak after hydrocortisone treatment.

Key words: Cleft lip, hydrocortisone, cell cycle, S phase, CHEST, flow cytometry, immunohistochemistry, TUNEL, apoptosis

Seznam zkratek

ACTH	Adrenocorticotropic hormone (adrenokortikotropní hormon)
BrdU	Bromodeoxyuridine
BSA	Bovine serum albumine
CRH	Corticotropin-releasing hormone (kortikotropin uvolňující hormon)
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
ED	Embryonic day (embryonální den)
FCS	Fetal calf serum
FSC	Forward scatter
CHEST	Chick embryotoxicity screening test
IVF	In vitro fertilisation (umělé oplodnění)
LMD	Lehká mozková dysfunkce
PBS	Phosphate buffered saline
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PFA	Paraformaldehyd
SSC	Side scatter
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

1. Úvod

1.1. Základní principy teratologie

1.1.1. Historie teratologie a její vymezení jakožto vědeckého oboru

Teratologie jako věda je oborem relativně mladým. Za základní dílo, které ji v tomto smyslu vymezilo, je považován rozsáhlý třísvazkový soupis pozorovaných vývojových vad nejen u lidských, ale i u zvířecích plodů, doplněný názornými ilustracemi, který v první půli devatenáctého století sestavil francouzský zoolog Isidore Geoffroy Saint-Hilaire (Geoffroy Saint-Hilaire, 1832).

Kořeny tohoto oboru však sahají mnohem hlouběji do minulosti. Lidé byli odpradáвна fascinováni výskytem nejrůznějších vývojových abnormalit u novorozenců či potracených plodů a snažili se pro ně nalézat různá vysvětlení. Často se zde uplatňovala lidová pověřivost (vada jako následek uřknutí), či nábožensky motivované představy (boží trest za spáchané hříchy, soulož matky s ďáblem apod.). Výskytem rozličných tělesných monstrosit se nechala inspirovat i lidová tvořivost ve formě mnohých bájí, pohádek a legend (známí řečtí kykloponé, indičtí bohové s mnoha páry rukou, římský bůh Janus se dvěma obličejí a další). Postupem času se s vývojem vědeckého myšlení začala kromě laické veřejnosti na tuto problematiku soustřeďovat i veřejnost odborná. Přírodovědci se tehdy zaměřovali především na morfologický popis vad a jejich katalogizaci, o teratologii jako takové zde proto ještě nehovoříme. Tato hranice byla překročena právě až u výše zmiňovaného Geoffroy Saint-Hilaira, který vyjádřil stěžejní myšlenku, že na pozorované abnormality nemá být nahlíženo pouze jako na jakési hříčky přírody, ale má v nich být spatřován projev zákonitostí lidského vývoje. Od této doby se tedy nová věda od pouhé popisné činnosti posouvá k mnohem složitější problematice – ke zkoumání příčin a mechanismů vzniku vývojových vad, což můžeme považovat za obecnou definici teratologie jako takové.

Z etymologického hlediska pochází slovo teratologie z řeckého slova *teras* – zrůda, doslovně přeloženo se tedy jedná o nauku o zrůdách. Dříve bylo i mezi odborníky běžné označovat postižené jedince jako zrůdy a vrozené vady jako zrůdnosti (např. v přednáškách Prof. MUDr. Václava Jedličky, primáře patologicko-anatomického oddělení nemocnice Na

Bulovce v letech 1931 – 1952, se tyto termíny vyskytují běžně jako termíny odborné, tedy zjevně bez etické závadnosti; Jedlička, 1954). Dnes bychom již tyto termíny zajisté v odborné literatuře ani v běžné mluvě nepoužili, oproti dobám dřívějším se postupně mění i postoj a chování vůči těmto lidem, kterým se medicína snaží v největší možné míře zajistit co nejplnější život. Posláním a hlavním přínosem teratologie je ale především prevence vzniku takovýchto postižení. Díky rozvíjení poznatků o mechanismech a příčinách vzniku vad a rozšiřováním těchto vědomostí mezi lékařskou i laickou veřejností je možné předejít vzniku velkého množství potencionálních vývojových postižení. Z této primární pomoci pak vyplývá mnoho dalších pozitivních efektů, jako vyhnutí se psychickému trápení samotných postižených i jejich příbuzných, či v neposlední řadě také ekonomická úleva od nákladů, které nevyhnutelně léčbu těchto postižených provázejí. Byť se můžeme pozastavovat nad etičností takovýchto úvah, jsou tyto nepopiratelnou zátěží pro celou společnost. Doposud již bylo nashromážděno velké množství poznatků, které k úspěšné prevenci vzniku vrozených vad mohou dopomoci. Zároveň je však před námi ještě rozsáhlá oblast nezodpovězených otázek. Stále se setkáváme s nejasnými či zcela neznámými mechanismy, neobjasněnými příčinami a vzájemnými interakcemi mnoha faktorů. Tato bílá místa pohánějí teratologii a její propojení s klinickou praxí vpřed a představují velký potenciál pro zvyšování kvality lidského života.

Dynamický vývoj v této oblasti je patrný, uvědomíme-li si, že spojitost mezi působením negativního exogenního faktoru během těhotenství a vznikem vývojové vady byla poprvé doložena a publikována až roku 1941, kdy Sir Norman Gregg podal důkaz o nebezpečnosti viru zarděnek pro lidský plod (Gregg, 1941). Tento a další poznatky tak postupně vyvrátili dříve vžitý názor, že plod je v děloze matky od vnějšího prostředí de facto izolován a proti jeho nebezpečným vlivům, jako jsou různé chemikálie (včetně léků), viry či bakterie, je tak zcela ochráněn. Co se týče matkou užívaných léků, velkým skandálem a zároveň událostí, která poukázala na důležitost teratologie jako vědního oboru, byl případ thalidomidu, který byl v padesátých a šedesátých letech dvacátého století (většinou pod názvem Contergan) podáván matkám v Německu, Švédsku, Kanadě a dalších státech jakožto uklidňující přípravek pro těhotné ženy přímo určený. Až po poměrně dlouhé době se podařilo dvěma lékařům vystopovat jeho spojitost s rapidním nárůstem výskytu vady zvané fokomelie (tzv. tulení končetiny), při které dochází k abnormálnímu vývoji horních i dolních končetin v různém rozsahu (McBride, 1961; Lenz a Knapp, 1962; Lenz, 1988). Tato tragická lekce odhalila i nutnost zvýšené opatrnosti

při extrapolaci výsledků testování léčiv a jiných chemických látek, které se z pochopitelných důvodů provádí na zvířecích embryích, na člověka. Tento systém je ale zatím spolu s výsledky epidemiologických dat, která lze ovšem sbírat až retrospektivně, naší nejlepší alternativou pro získávání cenných informací. Musíme s nimi však zacházet obezřetně a snažit se jít v našich výzkumech stále dál a prozkoumávat nové poznatky v širších souvislostech, abychom se mohli stále přibližovat ideji pochopení principů, o kterých hovořil již výše zmiňovaný otec teratologie Geoffroy Saint-Hilaire.

1.1.2. Základní teratologické pojmy a principy teratogeneze

Pro dobrou orientaci v teratologické problematice je nutné definovat několik základních pojmů. Výše jsme již uvedli obecnou definici tohoto oboru, jejímž základem je pojem *vrozená vývojová vada*. Tento pojem je však často užíván v nesprávném významu, je proto vhodnější užívat dvou jasně definovaných rozdílných pojmů – *vývojová vada* a *vrozená vada*. Vývojová vada je každá vada vzniklá během prenatalního vývoje. Na základě stupně její závažnosti však dochází v různé míře k potracení takovýchto plodů, nejčastěji u závažných defektů jako např. anencefalie (absence mozkové oblasti jako následek neuzavření předního neuroporu). Pouze o těch defektech, jejichž nositel se dožije narození, mluvíme od okamžiku porodu jako o vadách vrozených.

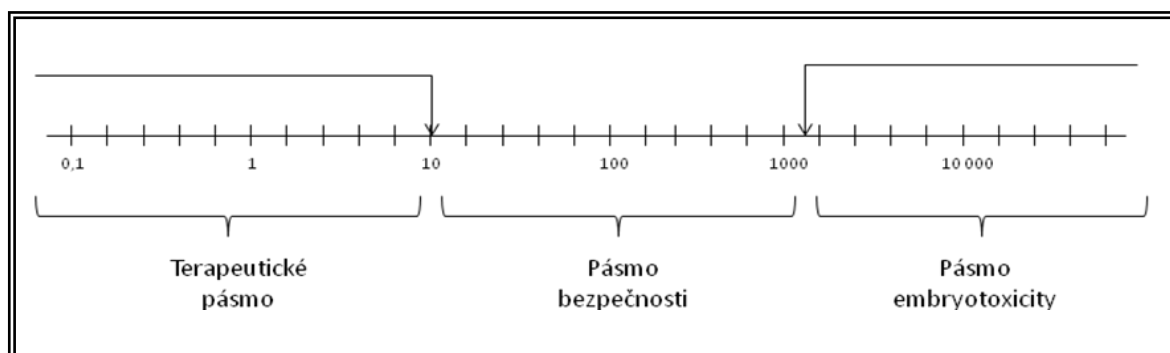
Vrozenou vadu tedy můžeme definovat jako defekt organismu vznikající v důsledku působení zevních nebo genetických faktorů, popř. jejich kombinací, na individuální prenatalní vývoj; jedná se o trvalou odchylku od struktury, funkce nebo biochemismu, která přesahuje meze normální variability druhu (Rychter a Jelínek, 1978; Kučera, 1989). V dalších navazujících teratologických definicích, které s tímto pojmem operují, se jako úzus povětšinou užívá právě pojmu vrozená vada, přičemž mnohdy to může být poněkud zavádějící a ne zcela přesné. Po předchozím poučení však nebude na závadu uvádět je tak, jak je zvykem. Je však velmi důležité mít tento rozdíl na zřeteli, zejména při popisu a hodnocení konkrétních případů.

Prvním z pojmů, který je přímo odvozen od názvu oboru, je pojem *teratogeneze*, který označuje proces vzniku a vývoje vrozené vady. Naproti tomu *teratogenita* označuje vlastnost určité látky, konkrétně její schopnost vyvolat vznik vrozené vady u vyvíjejícího se plodu. Teratogenita je jednou z podmnožin *embryotoxicity* - schopnosti určité látky

zárodek usmrtit (*letalita*), způsobit jeho vývojovou vadu (výše zmiňovaná *teratogenita*) nebo růstovou retardaci, přičemž tyto projevy se mohou vyskytovat v kombinaci.

Látku, která je teratogenní, potom můžeme označit jako *teratogen*. Přesněji definovat ho můžeme ze dvou různých hledisek. Z kvalitativního hlediska jako chemický, fyzikální nebo biologický faktor prostředí vyvolávající vznik vrozené vady, jež není dědičná. Z kvantitativního hlediska potom jako faktor vyskytující se v takové dávce, která v exponované části populace významně zvýší výskyt vrozených vad oproti populaci neexponované (Rychter a Jelínek, 1978). Otázka dávky je zde stěžejní podobně jako u určování toxicity, neboť je nasnadě, že v určitých koncentracích může být každá látka jedem či teratogenem. Z podstaty naší definice však vyplývá, že takové označení pro látku použijeme pouze v případě, kdy se látka v nebezpečných koncentracích reálně běžně vyskytuje. Minimální dávka teratogenu způsobující vrozenou vadu určuje tzv. začátek pásma embryotoxicity. Se stoupající dávkou se pak mění poměry projevů embryotoxicity podle vlastností dané látky. Zatímco v nižších dávkách způsobuje konkrétní teratogen vznik vrozených vad, růstovou retardaci, popř. obojí, ve vyšších dávkách jsou proporce těchto projevů snižovány na úkor stoupajícího letálního efektu.

Důležitým parametrem zejména pro posuzování vhodnosti léčiv z hlediska jejich embryotoxicity je tzv. pásmo bezpečnosti. Jedná se o různě široké rozpětí mezi terapeutickým pásmem a výše popsaným pásmem embryotoxicity (viz Obr.1). Terapeutické pásmo je vymezeno rozpětím běžně předepisovaných dávek léku. Šíře pásma bezpečnosti vyjádřená v řádech pak vypovídá o bezpečnosti podávaného léku při užívání standardních terapeutických dávek. Na jeho základě můžeme určit, kolikrát by musela být dávka překročena, aby v daném případě vystalo riziko teratogenních účinků.



Obr. 1. Příklad vyznačení terapeutického pásma, pásma bezpečnosti a pásma embryotoxicity dle dávky na příkladu vitamínu E. Jednotky stupnice v mg/1kg hmotnosti matky. Upraveno podle Peterka a Fára, 1990.

U některých látek (určitá antibiotika, vitamin A, aj.) je pásmo bezpečnosti velice úzké či dokonce úplně chybí, neboť pásmo terapeutické se již překrývá s pásmem embryotoxicity. Při úzkém pásmu bezpečnosti je nebezpečí také veliké, neboť mnoho vad vzniká jako důsledek působení více faktorů, které jednotlivě nemusí tento práh překračovat, ale při současném výskytu se jejich negativní vliv sčítá - vznik vady je tak v závislosti na dávce teratogenu a výskytu dalších faktorů (např. genetických), prahovým jevem (podrobněji viz kapitola 1.1.3). Léky s úzkým pásmem bezpečnosti jsou proto pro těhotné ženy velmi nevhodné. Ve většině případů je však možné nahradit je po dobu těhotenství léky obdobného účinku s širším pásmem bezpečnosti, popřípadě jejich užívání v tomto období omezit.

1.1.3. Příčiny vrozených vad a jejich dělení

Vrozené vady můžeme dělit z několika možných hledisek. Z etiologického pohledu je řadíme do dvou základních kategorií – na vady vzniklé působením vnějšího činitele (negativního faktoru prostředí, teratogenu) a na vady mající genetickou příčinu (nondisjunkce chromozomů, strukturní chromosomové aberace apod.). Odhady procentuálních proporcí těchto příčin se liší, v průměru se však většinou má za to, že chyby v genetické informaci zapříčiňují zhruba 20% vrozených, zevní faktory jsou odhaleny jako příčina 10% vrozených vad a zbytek (tedy až 70%!) vzniká z neznámé příčiny (Moore a Persaud, 2002). Obecně se předpokládá, že za většinou z těchto případů stojí neodhalené genetické příčiny, popř. interakce mezi genetickým pozadím a jedním či více negativními faktory prostředí.

Zde se projevuje princip vzniku vady jako prahového jevu. Obecně můžeme testováním či epidemiologickými studiemi stanovit dávku, která u průměrného zárodků vyvolá vznik vady, a označit tuto hranici jako práh teratogeneze. Musíme mít ale na zřeteli, že při individuálním hodnocení budou některé zárodky reagovat senzitivněji vlivem horších genetických predispozic. Ty je na pomyslném žebříčku posouvají blíže k prahu teratogeneze a k jeho překročení tudíž stačí nižší dávka teratogenu. Ještě složitější je pak situace, kdy do hry vstupuje více různých vlivů s obdobným negativním účinkem, který se kumuluje, až zapříčiní překročení prahu, byť jsou jednotlivé látky v relativně bezpečných koncentracích. Tento důležitý fakt by měl být brán v potaz například v případě užívání

námi studovaného hydrokortizonu a dalších kortikoidů, kdy může být vznik orofaciálních rozštěpových vad zapříčiněn kupříkladu současným výskytem genetické predispozice, či kombinací s teratogenem (viz níže kapitoly 1.2 a 1.3).

Zaměříme-li se pouze na faktory prostředí, můžeme tyto dále rozdělit na faktory chemické (toxické látky, léky, drogy), fyzikální (UV záření, zvýšená teploty), biologické (bakterie, viry) a mechanické (nedostatek plodové vody a z něj vyplývající tlak na vyvíjející se části těla zárodku). Vady vzniklé posledně jmenovaným mechanismem můžeme nazvat deformace, neboť dochází pouze k mechanickému utlačování tkání, nikoli k poruše jejich morfologického vývoje. Druhou skupinu vad, u nichž k takovým morfologickým defektům dochází, pak nazýváme malformace. Ty mohou být zapříčiněny kterýmkoli z ostatních vnějších faktorů.

Podle dalšího kritéria můžeme potom dělit vady na mnohočetné (často se jedná o různé syndromy) či izolované. Z hlediska závažnosti je primárně rozdělujeme na klinicky významné a nepodstatné. Lehké izolované anomálie můžeme nalézt u 14% novorozenců (Jones, 1997). S klinicky významnými vrozenými vadami se rodí zhruba 3% dětí (Schardein, 2000). U raných zárodků, jež byly potraceny, se vývojové vady vyskytují zhruba v 19 % případů (Shepard et al., 1989). Prenatální ztráty jsou zapříčiněny z více než 50% chromozomovými aberacemi, kdy k potratu dochází velice časně, většinou již během implantace na konci prvního týdne zárodečného vývoje (Kaufman, 1991). Poté začíná kritické embryonální období končící 8. týdnem (přechodem do fetálního stádia), během něhož se utváří základní struktura všech budoucích orgánů, které z tohoto důvodu ve velkém měřítku procházejí svými kritickými periodami.

1.1.4. Kritická a senzitivní perioda

V rámci problematiky vrozených vad způsobených vnějšími faktory, tedy teratogeny, si zvláštní pozornost zaslouží teratologický pojem *kritická perioda*, který je pro pochopení mechanismů vzniku vrozených vad a z těchto poznatků vyplývající efektivní prevenci jedním z klíčových. Jedná se o časový údaj vymežující období, ve kterém tvořící se orgány prochází nejdůležitější fází svého vývoje – dochází k diferenciaci základních struktur, probíhá výrazná buněčná proliferace, migrace buněk apod. V tomto období jsou tudíž orgánové soustavy také nejvíce náchylné na působení teratogenních vlivů. Tato

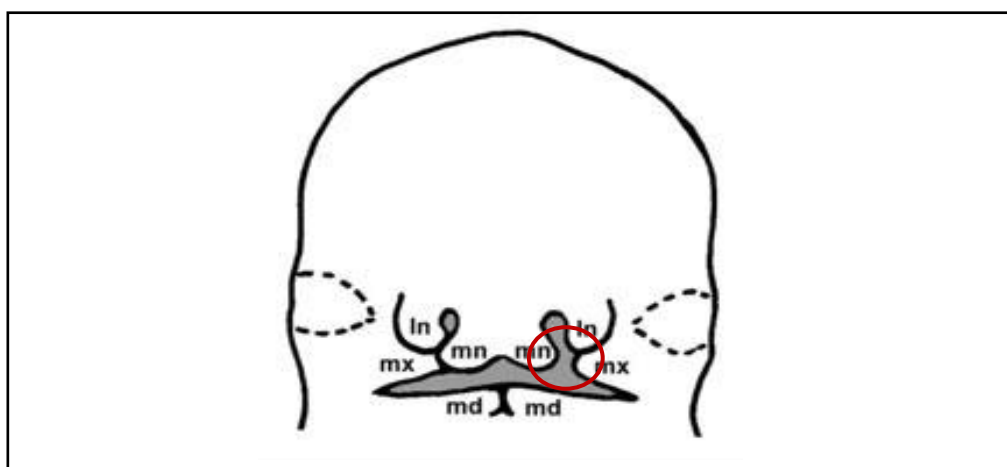
perioda je ohraničena tzv. terminačním bodem (konkrétním časovým určením), po jehož překročení už k poškození daného orgánu ani v přítomnosti teratogenu nemůže dojít. Příkladem zde může být třeba moment srůstu obličejových patrových plotének, jež je tak terminačním bodem pro vznik rozštěpu patra (Ferguson, 1991). Jedním z přístupů pro podrobnější popis kritické periody je její rozdělení na silně a méně vnímavou periodu. Silně vnímavá perioda spadá u většiny orgánových systému do embryonálního období, tedy do rozmezí prvních osmi týdnů těhotenství. Vady, které během ní vznikají, jsou řazeny k těžkým defektům, které mohou být pro zárodek i neslučitelné se životem (úplná absence orgánu - např. anencefalie, či těžká malformace, která může omezit nebo zcela znemožnit jeho správnou funkčnost - výše zmiňovaná fokomelie, rozštěpové vady, aj.). Při vystavení orgánů vlivům teratogenu během méně vnímavé periody (zpravidla probíhá ve fetálním období s různými terminačními body pro konkrétní orgánové soustavy) dochází většinou již k méně závažným morfologickým či funkčním vadám (rozštěp duhovky, mentální retardace). V případě CNS, což je systém s nejdélší kritickou periodou vůbec, může dojít k poškození ještě v perinatálním období za vzniku behaviorálních defektů, jako je např. LMD (Matějček, 1991). Přehled základních kritických period je názorně zpracován například v knize Zrození člověka (Moore a Persaud, 2002).

Pojem *senzitivní perioda* bývá někdy s kritickou periodou nesprávně zaměňován. Senzitivní periodu však již neurčuje pouze stav vývoje určitého orgánu, ale zároveň také konkrétní, na něj působící teratogen, resp. povaha jejich vzájemné interakce. Orgánové receptory (popř. další parametry na buněčné úrovni) v daných tkáních totiž vykazují v různých obdobích vývoje různou senzitivitu vůči dané látce. Období, kdy na toto vnější agens buňky reagují, se pak nazývá senzitivní perioda. Ke vzniku vady tudíž může dojít pouze v průsečíku kritické a senzitivní periody, což je pro pochopení tkáňové a časové specifického působení konkrétních teratogenů velmi důležité.

1.2. Orofaciální rozštěpové vady

1.2.1. Srůstání obličejových výběžků a způsob vzniku orofaciálních rozštěpových vad

Rozštěpové vady obličeje jsou u lidí jedním z nejčastějších vrozených defektů. Pro pochopení způsobu vzniku možných orofaciálních rozštěpových vad je esenciální znalostí proces morfologického utváření této oblasti. Dochází zde k přesně načasovanému srůstání několika původně samostatně se vyvíjejících obličejových výběžků. Dobře patrnou orofaciální vadou je rozštěp rtu (označovaný CL z anglického *cleft lip*). Má několik variant o různé závažnosti, u nichž může být v různé míře postižena také horní čelist (různá míra nespojení výběžků podél hranice premaxily). Tuto skupinu vad, vyjma čistého rozštěpu rtu, bychom tedy měli nazývat rozštěp rtu a čelisti, obecně zde ale budeme pro zjednodušení uvádět pouze pojem rozštěp rtu, který je pro potřeby popisu raného orofaciálního vývoje, kterým se budeme zabývat, dostačující. V oblasti budoucího středního obličeje se v embryonálním období nacházejí tři samostatné výběžky na každé straně – jeden výběžek maxilární a dva výběžky nasální, které obkružují budoucí nozdru. Podle jejich pozic je označujeme jako výběžek lateronasální a medionasální, přičemž medionasální výběžky obou stran spolu vytváří ve středu obličeje útvar, který jako celek nazýváme výběžkem frontonasálním. Kritickým místem pro vznik rozštěpu je místo spojení maxilárního a frontonasálního (medionasálního) výběžku (Peterka a Jelínek, 1978; Young et al., 2000). Schematické zobrazení výběžků, jejich správné spojení i defektní vývoj vedoucí ke vzniku CL jsou znázorněny na Obrázku 2. Ve vyobrazeném případě by se jednalo o jednostranný rozštěp rtu, přičemž z praxe známe rozštěpy pravostranné, levostranné i oboustranné.



Obr. 2. Schematické znázornění srůstajících obličejových výběžků u lidského embrya; mx = maxilární, ln = lateronasální, mn = medionasální, md = mandibulární. Místo vzniku CL označeno kroužkem. Upraveno podle Hovořáková et al., 2006.

Co se týče embryonálního patra, používá se pro jeho původně samostatné části výrazu patrové ploténky. Ty se v určitém momentu horizontalizují (zprvu v dutině ústní pouze volně splývají ukotveny k její laterální stěně) a následně pak dochází k jejich spojení. K rozštěpu patra, který značíme CP z anglického *cleft palate* (popř. CLP, vyskytuje-li se zároveň s rozštěpem rtu), tedy dochází v případě, že z nějakého důvodu ke srůstu patrových plotének nedojde. Takovéto mechanismy známe dva – v prvním případě je příčinou hypoplazie samotných patrových plotének, které se z toho důvodu nemohou spojit a srůst (Peterka a Dostál, 1977). V druhém případě nejde primárně o defekt patrových plotének. Jejich vývoj může být zcela normální, dojde však k mechanickému znemožnění jejich horizontalizace (a tím i možnosti spojení) nedostatečným růstem mandibuly, která za normálních okolností umožní odtážením jazyka vytvořit pro tyto procesy dostatečný prostor (Jelínek a Peterka, 1977; Silbermann a Levitan, 1979). Kritické periody vzniku těchto variant budou spolu s periodami pro CL podrobněji probrány v následující kapitole.

Vhodným modelem pro zkoumání rozštěpů je vedle obvykle používaného myšního modelu zárodek kuřete. Zatímco u myši jsou převážně zkoumány procesy provázející rozštěpy patra, neboť až na pár kmenů nejsou myši náchylné k rozštěpům rtu, kuřecí model je naopak na zkoumání CL velmi vhodný. Utváření obličejové oblasti v embryonálním období je u něj velmi podobné a dobře srovnatelné s orofaciálním vývojem u člověka (Peterka a Jelínek, 1978; Young et al., 2000). Rozštěp patra u něj naopak přímo sledovat nelze, neboť u kuřete patrové ploténky fyziologicky nesrůstají.

1.2.2. Teratogeneze orofaciálních rozštěpů

Incidence rozštěpových vad se napříč zeměkoulí pohybuje v relativně širokém rozmezí (cca 1:500 až 1:2500), a to nejen v místě, ale i v čase (Rintala et al., 1983; Vanderas et al., 1987, Jensen et al., 1988; Schutte a Murray, 1999). Různit se mohou také podíly jednotlivých typů rozštěpových vad (Peterka et al., 2006; Reddy et al., 2010). Ačkoli postup získávání takovýchto dat není celosvětově a často ani celonárodně standardní (pečlivost a všímavost porodníků, různá kvalita a dostupnost odborného porodnictví obecně, apod.) je nasnadě, že etiopatogeneze těchto vad je velmi složitá a multifaktoriální. Roli zde hrají jak genetické tak environmentální faktory (Dixon et al.,

2011). Zvláště chceme-li z výsledků usuzovat na zátěž, jež představuje dané životní prostředí, je nutné mít toto na zřeteli a odlišovat třeba případy s rodinou zátěží či výskyt rozštěpu jako součásti syndromu, kde bývají příčiny také převážně genetické (mezi takovéto syndromy patří například Pierre Robin, Van der Woude či Patau). Sledování incidence vad a shromažďování dalších důležitých údajů o novorozencích má v České republice dlouholetou tradici – pro lékaře povinné monitorování bylo zavedeno roku 1965, přičemž Národní monitorovací systém byl založen a začal fungovat již roku 1961 (Kučera, 1989). Z podrobných údajů o výskytu orofaciálních rozštěpů z Kliniky plastické chirurgie v Praze víme, že jejich incidence se u nás dlouhodobě pohybuje kolem poměru 1,74 na 1000 novorozenců = 1:575 (podle dat z let 1964-1992) (Peterka et al., 1995).*

Kritickou periodou pro vznik rozštěpových obličejových vad u člověka je období mezi přibližně 27. - 60. dnem embryonálního vývoje (Peterka et al., 1985). Toto období můžeme dále rozdělit na několik kratších úseků podle typu a způsobu vzniku příslušných vad. Mezi 27. - 35. dnem může působením negativního faktoru vzniknout rozštěp rtu. Následující období mezi 35. - 55. dnem je pak kritickou periodou pro vznik CP prvním z výše jmenovaných způsobů, tedy hypoplazií patrových plotének. Pokud škodlivý faktor působí přes obě dvě tato období (konkrétně mezi 27. - 45. dnem), vzniká celkový rozštěp – tedy CLP (*cleft lip and palate*), jednostranný či oboustranný. Zvláštním případem je potom výše zmiňovaný rozštěp patra související s hypoplazií mandibuly – jeho relativně krátká kritická perioda je nejpozdější a celé období tak uzavírá, neboť se odehrává mezi 55. a 60. dnem, který je tak terminačním bodem pro vznik orofaciálních rozštěpů.

1.2.3. Teratogeny způsobující orofaciální rozštěpové vady

Jak již bylo řečeno, orofaciální oblast je na působení vnějších vlivů velmi citlivá. Známe celou řadu prokázaných, popř. podezřelých teratogenů, které se tohoto procesu mohou účastnit, ať již za přispění genetických predispozic či samy o sobě. Jedním z nich je vitamin A (či isotretinoin, jeho syntetický derivát předepisovaný pod lékařským názvem

*Pozn.: aktuální data z klinické praxe však naznačují, že zejména díky sekundární prevenci (viz níže) začíná počet živě rozených dětí s rozštěpem rtu znatelně klesat, neboť téměř polovina matek se rozhodne pro interrupci (Gregor a Šípek, 2009)

Accutane), který díky své vysoké potenci v morfogenetických pochodech dokáže způsobit vznik celého spektra závažných vad (Cohlan, 1953; Lammer et al., 1985; Rosa, 1983). Rozštěpy patra pak ve velké míře způsobuje látka TCDD, složka nechvalně známého herbicidu Agent Orange (Courtney a Moore, 1971; Smith et al., 1976; Pratt et al., 1984). Rozštěpové vady má na svědomí také cyklofosfamid, který se používá především v chemoterapii (Fritz a Hess, 1971; McClure et al., 1979) Vedle mnoha dalších, zejména orofaciálních a končetinových vad, způsobuje rozštěpy také cytostatikum cisplatina (Peterka et al., 2002). Není překvapivé, že na teratogenní potenciál aspirují také různé drogy a další návykové látky, jako ethanol u matek alkoholiček (orofaciální rozštěpy jako součást FAS – fetálního alkoholového syndromu) (Webster et al., 1980; Smith, 1981; Thomas, 1995; Leite a Koifman, 2009). Dalšími velice významnými teratogeny způsobujícími rozštěpy jsou kortikoidy, mezi něž patří námi studovaný hydrokortizon, jemuž bude věnována samostatná kapitola (1.3.), rozebírající podrobně i toto hledisko.

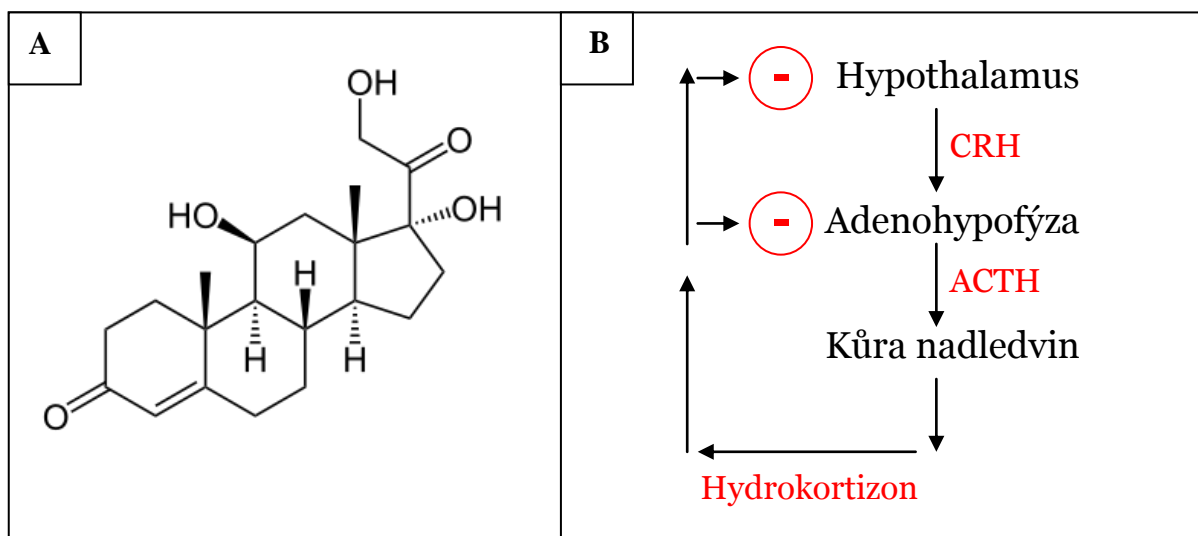
1.2.4. Závažnost rozštěpových vad

Na závěr této kapitoly o rozštěpových vadách bych ráda zmínila ještě jeden náhled na tuto problematiku, a to náhled psychosociální. Ač se může zdát ve světle jiných, závažnějších vad rozštěp rtu či patra jako vada téměř banální, je důležité vzít v potaz všechna negativní hlediska, která přináší. Kromě problémů s mluvením či přijímáním potravy, které dnes naštěstí s úspěchem dokáže vyřešit zručný chirurg, popř. logoped, zde stále zůstává aspekt psychické zátěže - pocitů méněcennosti a viny vůči své rodině či budoucím potomkům, a to vše i v případě zdárné operace (Tyl et al., 1990; Kasuya et al., 2000). Pro budoucí rodiče je nejlepším řešením úspěšná primární prevence (pro niž by měla být teratologie hlavním přínosem), tzn. znalost nebezpečných faktorů a vyhnutí se jejich vystavování. Ani tak se samozřejmě zejména v případech vysoké dědičné zátěže mnohdy nepodaří vzniku vady předejít. Zde ovšem moderní medicína nabízí pomoc prostřednictvím tzv. sekundární prevence včasným odhalením vady pomocí technik prenatalní diagnostiky. Rodiče pak mají možnost, byť nelehké, volby umělého přerušení těhotenství. Před svým rozhodnutím by měli být co nejhlouběji o problematice dané vady informováni a znát všechna úskalí, která by představovala pro jejich budoucího potomka i pro ně. Mají tak možnost rozhodnout se této zátěži nikoho nevystavit a v budoucnu počít zdravé dítě.

1.3. Hydrokortizon

1.3.1. Obecné vlastnosti hydrokortizonu

Hydrokortizon neboli kortizol je steroidní hormon kůry nadledvin, který hraje důležitou roli v mnoha metabolických pochodech a dalších v organismu probíhajících dějích. Patří do skupiny tzv. glukokortikoidů, které mají obecně obdobné účinky, avšak z glukokortikoidů tělu vlastních je právě hydrokortizon tím nejúčinnějším. Jako mnoho dalších látek je jeho tvorba primárně regulována hypothalamem, který produkuje CRH, jež stimuluje přední lalok hypofýzy ke tvorbě ACTH. Tento hormon pak působí již přímo na kůru nadledvin (konkrétně na její střední vrstvu *zona fasciculata*) a podporuje tvorbu hydrokortizonu, který je uvolňován do oběhu a negativní zpětnou vazbou reguluje tvorbu hormonů ve vyšších centrech (viz Obr.3B). Spektrum jeho funkcí je velice široké a tkáňově specifické. Někdy je také nazýván stresovým hormonem, neboť jeho uvolňování je při zátěži této povahy stimulováno (Fagerlung, 1967; Tsigos a Chrousos, 2002). Potlačuje také funkci imunitního systému a negativně ovlivňuje růst (De Souza a Adlard, 1973; Palacios a Sugawara, 1982). Je též funkčním antagonistou insulínu, neboť zvyšuje množství cukru v krvi, přičemž může zapříčinit až hyperglykémii (Greenwood et al., 1966; Eigler et al., 1979). Ta je také jedním z hlavních příznaků primárního hyperkortizolismu známého pod názvem Cushingův syndrom (vzniká např. při nádorech adenohypofýzy, způsobujících zvýšenou produkci ACTH). Hydrokortizon dále ovlivňuje například metabolismus tuků, bílkovin či uhlovodíků.



Obr. 3. (A) Vzorec hydrokortizonu (11 β ,17,21-trihydroxypregn-4-en-3,20-dion, souhrnný vzorec C₂₁H₃₀O₅). (B) Schematické znázornění kortikotropní dráhy a zpětnovazebné aktivity hydrokortizonu.

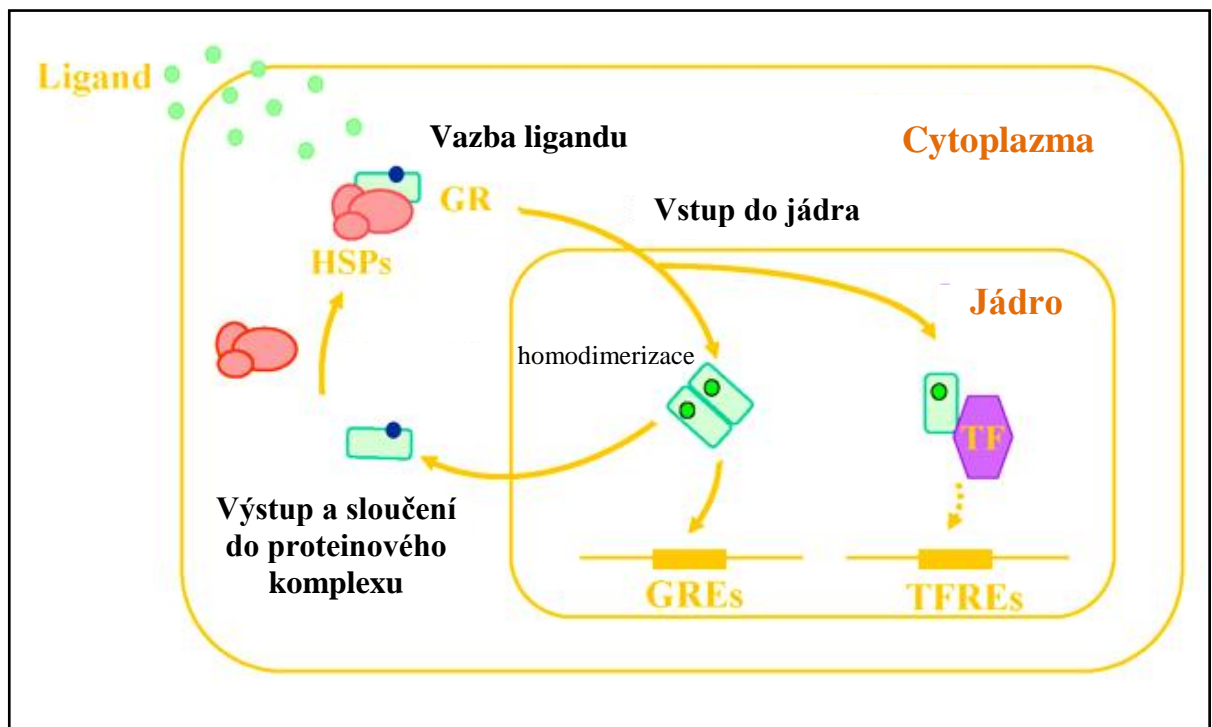
1.3.2. Glukokortikoidový receptor

Na buněčné úrovni je prostředníkem mezi molekulou hydrokortizonu a akcí, kterou v buňce vyvolá, glukokortikoidový receptor. Jedná se o intracelulární protein, který funguje (ačkoli ne zcela výhradně – viz níže) přímo jako transkripční faktor. Ačkoli je translatován pouze z jednoho genu, vlivem post-translačních modifikací, specifity dané buňky (kupříkladu v přítomnosti dalších transkripčních faktorů) a mnoha dalších interakcí může být odpověď na jeho aktivaci velice různorodá (Zhou a Cidlowski, 2005; Duma et al., 2006). Alternativním genovým sestřihem mohou vzniknout dvě isoformy receptoru, které označujeme hGR α a β , přičemž hGR α představuje klasickou formu a dále se proto budeme zabývat primárně jeho vlastnostmi. Forma hGR β se vyznačuje na klasické α formě nezávislou, genově specifickou aktivitou (Duma et al., 2006; Kino et al., 2009). Každá z těchto isoform může dát alternativní translaci vzniknout množství specifických podforem, které se vyznačují například odlišnou distribucí v rámci buňky či spektrem rozdílných transkripčních aktivit, které po aktivaci ligandem vyvolají (Lu a Cidlowski, 2005).

Samotný receptor sestává z několika částí, jež zastávají různé funkce. Některé z domén například interagují s transkripčními koaktivátory, chromatinovými modulátory a dalšími molekulami ovlivňujícími proces transkripce. Doména, jež je konformačně uzpůsobena pro vazbu ligandu, neboli LBD (*ligand-binding domain*), hraje stěžejní úlohu nejen v aktivaci receptoru, který se v neobsazeném stavu nachází zpravidla v cytoplazmě jako součást proteinového komplexu, ale také v jeho následné translokaci do jádra, vazebné aktivitě vůči tzv. heat shock proteinům a homodimerizaci s dalším aktivovaným receptorem (Pratt, 1993; Zhou a Cidlowski, 2005; Duma et al., 2006). Posledně jmenovaný krok je nezbytný pro možnost vazby na DNA (viz Obr.4). Konkrétní místa na DNA pro tuto vazbu určená, která se nalézají v promotorových oblastech na cílových genech, nazýváme *glucocorticoid-response elements* (GREs). Tato vazba může expresi daného genu podpořit nebo potlačit v závislosti na konkrétní sekvenci GRE a na vlastnostech promotorové oblasti (Bamberger et al., 1996, Schaaf a Cidlowski, 2002). Receptorovou doménu, která se na GREs váže, označujeme DBD (*DNA-binding domain*). Vedle ovlivňování cílové buňky přímou vazbou na DNA dokáže aktivovaný receptor ještě ve formě monomeru interagovat s dalšími přítomnými molekulami, např. indukibilními transkripčními faktory, a spustit tak další pochody vedoucí ke změnám v genové expresi

(Scheinman et al., 1995; Gottlicher et al., 1998). Existuje celá řada dalších známých a jistě i těch ještě neobjasněných pochodů, specifických interakcí a podmínek, které ovlivňují determinaci následků, které má aktivace glukokortikoidového receptoru pro cílovou buňku. Již z výše uvedeného stručného výčtu některých základních parametrů je však zřejmé, že možnost predikce těchto dějů a jejich následků pro každou konkrétní situaci není s našimi dosavadními znalostmi možná a každý takový systém, kde se vliv kortikoidů projevuje, je pro pochopení jeho podstaty třeba pečlivě prozkoumat.

Ačkoli jsme zde hovořili primárně o vlastnostech lidského glukokortikoidového receptoru, lze tyto znalosti aplikovat i v širším smyslu, neboť glukokortikoidový receptor jako takový je silně konzervovanou strukturou. Bylo prokázáno, že jeho obecná funkce se mezi skupinou savců a ptáků neliší, což nás opravňuje k možnosti interpretace výsledků na kuřecím modelu ve vztahu k člověku (Proszkowiec-Weglarz a Porter, 2010).



Obr. 4. Průběh aktivace glukokortikoidového receptoru - jeho přesun do jádra, homodimerizace a možnosti ovlivnění genové exprese. GR = glukokortikoidový receptor; GREs = *glucocorticoid-response elements*; TF = transkripční faktor; TFREs = *transcription factor-response elements*; HSPs = *heat shock proteins*. Upraveno podle Nicolaidis et al., 2010.

1.3.3. Hydrokortizon jako teratogen

Vzhledem k jeho vysoké potenci a vlivu na celé spektrum tělesných pochodů není překvapivé, že hydrokortizon dokáže ve vyšších dávkách působit jako chemický teratogen. Tato jeho vlastnost je stále z určitých míst popírána, zejména proto, že hydrokortizon a jemu podobné látky našly široké uplatnění v soudobé medicíně, od kožních potíží typu lupénky, přes zánětlivá onemocnění až po proces umělého oplodnění (viz níže). Není však na místě přehlížet četné experimenty a klinické studie, které tento fakt potvrzují, a nezvažovat tento aspekt při jeho medikaci.

Na jeho teratogenní účinky bylo upozorněno již v padesátých letech jakožto na agens zapříčiňující vznik rozštěpu patra u myši (Fraser a Fainstat, 1951). Tento efekt byl pak v průběhu let potvrzován dalšími studii, v převážné většině také na myším modelu, tzn. se zaměřením na rozštěp patra (Dostál, 1971; Spain et al., 1975; Shah a Travill, 1976; Rowland a Hendrickx, 1983). Ačkoli některé epidemiologické studie, které jsou v odpověď na tyto výsledky prováděny, statisticky významnou souvislost mezi vystavením matek zvýšenému působení kortikoidů a incidencí rozštěpů u jejich potomků nenalezly (Hviid a Mølgaard-Nielsen, 2011), mnoho jiných spojitost tohoto působení s rozštěpy patra i s rozštěpy rtu u lidí prokázalo (Loffredo et al., 1994; Rodriguez-Pinilla a Martinez-Frias, 1998; Park-Wyllie et al., 2000; Edwards et al., 2003).

Některé klinické studie diskutují také možnost, která se u hydrokortizonu jakožto stresového hormonu nabízí – zda vedle vzniku rozštěpů způsobených dávkou kortikoidů exogenního původu nemůže vyvolat tuto vadu i tělu vlastní hydrokortizon, vznikající fyziologicky během dlouhodobé stresové zátěže. Řada studií pak tuto možnost podporuje (Poradowska a Jaworska, 1963; Wallace et al., 2011), přičemž tento závěr je v souladu i s výsledky experimentů na zvířecích modelech (Rosenzweig, 1966; Hemm et al., 1977, Montenegro et al., 1995).

Studie Ci et al., 2011 sice neprokázala souvislost se zvýšenou incidencí orofaciálních rozštěpů, potvrdila ovšem signifikantní vliv kortikoidů (v tomto případě užívaných matkami při kožních potížích, tedy v relativně nízkých dávkách oproti jiným medicínským aplikacím) na intrauterinní růstovou retardaci (IUGR). Tento teratogenní účinek je dalším ze známých a studii potvrzených vlivů kortikoidů na prenatální vývoj (Jobe et al., 1998; Wapner et al., 2006; Murphy et al., 2008). Diskutován je také vliv zvýšených hladin hydrokortizonu na sexuální chování, zejména na snížení maskulinity, od menší agresivity, sníženého libida, až k opačné sexuální orientaci. Hydrokortizon v tomto

systemu funguje jako faktor snižující hladinu testosteronu (Fenske, 1997; Reznikov et al., 1997; Ellis a Cole-Harding, 2001).

V medicínské praxi jsou kromě samotného hydrokortizonu často využívány především jemu podobné syntetické deriváty, které mohou být několikanásobně účinnější. Své uplatnění nacházejí při mnoha diagnózách, ovšem obzvlášť aktuálním tématem je jejich užívání ve vysokých dávkách během IVF, kde se používají pro potlačení imunitní reakce matky během implantace (Ando et al., 1996; Ubaldi et al., 2002; Boomsma et al., 2010). K tomuto účelu je využíván především prednison, který se ve výsledcích studií a experimentů vyznačuje mnoha teratogenními vlivy, které jsou pro kortikoidy typické, rozštěpové vady nevyjímaje (Carmichael a Shaw, 1999; Yucel et al., 2004). Tento syntetický kortikoid se užívá mimo jiné také při léčbě kožních potíží, stejně jako další zástupci této skupiny – bethamethason a triamcinolon, oba s obdobným teratogenním potenciálem (Parker a Hendrickx, 1983; Piffer et al., 2009). Časté je také využití těchto látek při zánětlivých onemocněních či jako imunosupresivum (například u léčby autoimunitních chorob). K těmto účelům se používá i další derivát z této skupiny – dexamethason, nejsilnější z používaných syntetických kortikoidů (v rámci protizánětlivých účinků je 50krát účinnější než hydrokortizon; Whitehouse, 2011), jehož mnohočetné negativní vlivy na zárodek nejsou příliš překvapující (Hauser et al., 2008). Obecně se v rámci těchto a dalších studií nacházejí spojitosti mezi užíváním těchto látek a spektrem typických teratogenních následků vlivu hydrokortizonu, které jsou jmenovány výše – rozštěpy, IUGR i feminizace plodu. Jejich indikace u těhotných žen by proto měla být s ohledem na tyto skutečnosti dána jako protiváha pozitivního dopadu medikace a pečlivě zvážena. V případě IVF, kdy je těhotenství s medikací v těsném vztahu, je tento aspekt obzvlášť závažný a měl by být řádně diskutován, nikoli z komerčních důvodů popírán či bagatelizován.

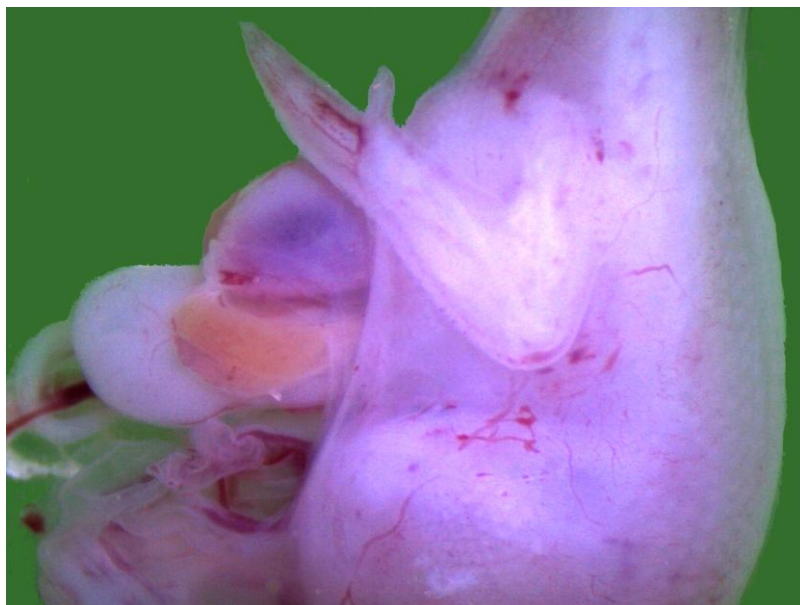
1.3.4. Kuře jako model teratogenního působení hydrokortizonu

Jak již bylo zmíněno, pro zkoumání procesu vzniku rozštěpu rtu je velice vhodným modelovým organismem zárodek kuřete, u kterého hovoříme o analogické vadě – rozštěpu zobáku. Kritická perioda pro vznik této vady se u kuřete rozprostírá mezi 3. – 6. dnem embryonálního vývoje (ED 3 – ED 6). Toto období časově koreluje i s přítomností

glukokortikoidového receptoru v kuřecím organismu, jehož množství se rapidně zvedá právě na ED 3, ačkoli nižší hladiny jsou přítomny už o den dříve (= počátek senzitivní periody). Je tedy nasnadě, že zde dochází k průsečíku obou period a možnosti vyvolat vznik vad – v případě kuřete se po působení hydrokortizonu kromě rozštěpu zobáku objevuje ve vysokém procentu také rozštěp stěny břišní (viz Obr.5 a 6). Nejcitlivěji zárodek reaguje při aplikaci na ED 4 a 5 (Jelínek et al., 1983).

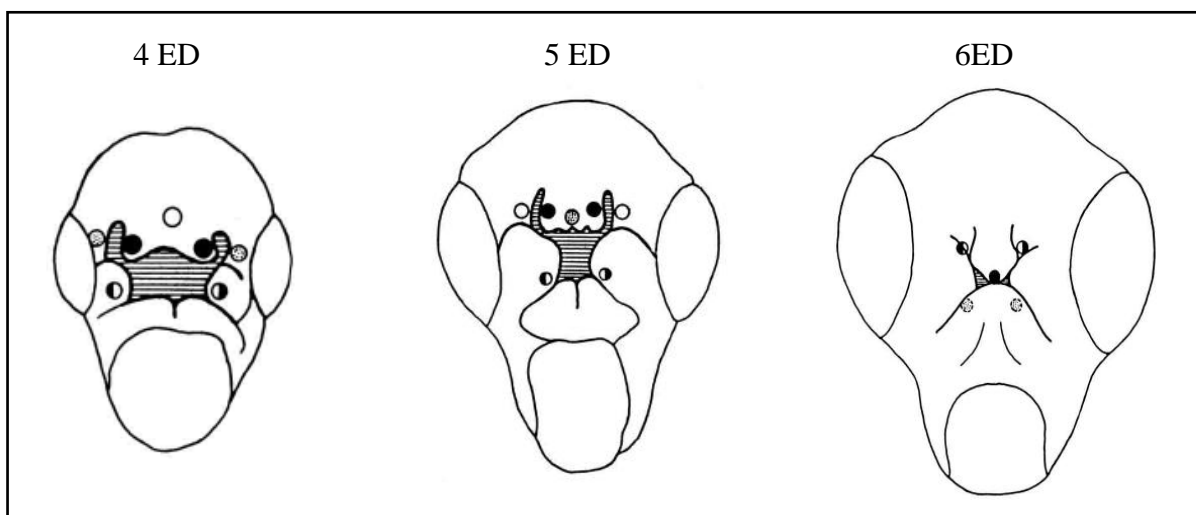


Obr. 5. Rozštěp zobáku (označen šipkou) u zárodku kuřete (odběr na ED 10).



Obr. 6. Rozštěp stěny břišní s typickým vyhřeznutím tělních orgánů (eventrací) u zárodku kuřete (odběr na ED 10)

Pro hlubší prozkoumání zákonitostí růstu orofaciálních výběžků, které s touto vadou souvisí, byly zkoumány jak jejich vlastnosti obecné, tak změny pozorovatelné po působení hydrokortizonu. V rámci frontonasálního a maxilárního výběžku byla určena tzv. proliferační centra pomocí kolchicinu, jež hromadí buňky v M fázi buněčného cyklu. Podle množství takto zastavených buněk v jednotlivých oblastech výběžků byla označena místa s vyšší proliferací, která vykazovala značnou proměnlivost v čase, jak je vidět na Obrázku 7 (Peterka a Jelínek, 1983). V této práci bylo také prokázáno, že působení hydrokortizonu signifikantně zmenšuje velikost frontonasálního výběžku a znemožňuje mu tak včasný dotyk a srůst s výběžkem maxilárním (terminačním bodem je ED 6, tedy konec kritické periody). Další pokusy se pak zaměřily na podrobnější zkoumání již na úrovni buňky. Úvodním překvapivým zjištěním ve studii Peterka et al., 1997 byl objev, že bylo-li po aplikaci na ED 4 den poté (tedy na ED 5) experimentálně natrženo amnio, dokázalo toto



Obr. 7. Schematické znázornění výskytu proliferačních center v orofaciální oblasti u kuřecího zárodku na ED 4 – ED6. Intenzita odpovídá intenzitě výplně kroužků. Zaměříme-li se na frontonasální výběžek, můžeme zde vidět dvě oblasti proliferačních center, které pro naše účely můžeme nazvat centra postranní a centrum středové. Upraveno podle Peterka a Jelínek, 1983.

vypuštění amniotické tekutiny s aplikovaným hydrokortizonem zvrátit negativní efekt jeho působení. Při odběru několik dní poté totiž nebyly nalezeny žádné pro hydrokortizon typické vady. Tento výsledek napověděl, že působení hydrokortizonu je reverzibilní, takže po uvolnění receptorů dojde k návratu do původního stavu a i přes handicap, který během 24 hodin působení kortikoidu vznikl, dokáže být tento během dalších 24 hodin dohnán, takže může dojít k normálnímu spojení výběžků. V rámci této studie se proto autoři dále zaměřili na efekt, který tyto změny mají na proliferaci, tedy na cyklus buněk

frontonasálního výběžku. Po aplikaci hydrokortizonu byl zaznamenán pokles proporce množství buněk v M fázi oproti kontrole. Počítání bylo prováděno den po aplikaci v oblasti okraje frontonasálního výběžku naproti výběžku maxilárnímu, tedy zhruba v oblasti postranního proliferačního centra. Při analýze této oblasti po natržení amnia byl zaznamenán prudký nárůst počtu buněk v mitóze, který byl nejmarkantnější po 45 minutách a poté postupně slábl, až se ustálil na počtu odpovídajícímu kontrolám bez aplikace. Zmíněný efekt byl patrný pouze u buněk mezenchymu, buňky povrchového epitelu nevykazovaly oproti kontrole žádné změny v buněčném cyklu. Tyto výsledky se staly základním kamenem pro vytvoření cílů pro mou práci.

1.4. Buněčný cyklus a možnosti jeho ovlivnění

1.4.1. Obecné parametry buněčného cyklu

Důležitým faktorem, který je pro ucelené chápání výše zmíněných výsledků a pro možnost vyvození závěrů usměřujících další práci velice potřebný, je seznámení se s problematikou buněčného cyklu jako takového. Jedná se o základní buněčný pochod, jehož parametry se liší u jednotlivých buněk jak mezi sebou (např. tkáňově specifické vlastnosti), tak i v rámci jedné buněčné populace v čase. Toto specifické nastavení určuje, jak rychle se buňka dělí, zda směřuje k diferenciaci, popř. k apoptóze, a mnohé další parametry, jejichž široké spektrum umožňuje vznik nepředstavitelně komplikovaných organismů z původně homogenní buněčné hmoty.

Základní rozdělení buněčného cyklu spočívá v oddělení procesů tzv. interfáze a mitózy (M fáze). Během mitózy dochází k dělení mateřské buňky na dvě buňky dceřiné, z nichž každá obdrží úplnou sadu chromozomů. Aby k tomuto mohlo dojít, je třeba provést mnoho přípravných a kontrolních kroků, které se odehrávají v jednotlivých částech interfáze. V první z nich – G_1 fázi, dochází především k množení buněčného materiálu a k syntéze enzymů a dalších molekul nezbytných v další fázi, která zahrnuje duplikaci genetického materiálu. G_1 fáze je také nejdůležitějším z kontrolních bodů cyklu. Buňka zde může být nasměrována např. do klidové G_0 fáze, která stojí mimo cyklus. Toto se děje zejména u diferenciovanych buněk, které dále vykonávají již svou specifickou funkci. Dochází zde ale i ke kontrole správného průběhu všech dějů před vstupem do dalších fází, přičemž buňka, která touto kontrolou neprojde, může být ve svém množení pozastavena a v případě nevratného poškození poslána do procesu programované buněčné smrti - apoptózy. Další fází, během které, jak už bylo zmíněno, dochází k množení genetického materiálu formou syntézy sesterské (tedy totožné) chromatidy každého chromozomu, nazýváme S fází. Na jejím konci je tedy v buňce přítomno dvakrát více DNA, než ve fázi G_1 . Následuje relativně krátká fáze G_2 , kde opět dochází především k tvorbě a množení dále potřebného buněčného materiálu a na jejímž konci se nachází kontrolní bod přechodu G_2/M . Po jeho zdárném překročení je buňka připravena na další dělení a vstupuje do M fáze.

1.4.2. Délka buněčného cyklu

Co se týče délky jednotlivých fází i celého cyklu, lze jen velice těžko určit nějaký obecný vzor. Tyto údaje se liší, jak již bylo předestřeno, organismus od organismu, tkáň od tkáně, a téměř i den ode dne. Buňky mohou podle potřeby cyklovat různými rychlostmi (většinou v rádech hodin), přičemž se podle potřeby liší i poměry jednotlivých fází cyklu. Je například známo, že rychle se dělící, např. kmenové či rakovinné buňky, mají tendenci zkracovat obě G fáze cyklu (S a M v tomto směru nemohou být již ze své podstaty takto neomezitelně kráceny), přičemž G₂ fáze může být téměř úplně přeskočena (Liskay, 1977; Holstein a David, 1990; Alberts et al., 2002).

Pro naši potřebu a možnost alespoň přibližného odhadu a nasměrování úvah zde uvedu údaje získané ze studie buněk mezenchymu maxilárního výběžku kuřete (Minkoff, 1984), což je oblast námi zkoumanému frontonasálnímu výběžku velmi blízká. Minkoff určil přibližnou dobu trvání jednotlivých fází takto:

$$\left. \begin{array}{l} G_1 = 2\text{h} \\ S = 5,4\text{h} (5\text{h } 24\text{min}) \\ G_2 = 2,5\text{h} (2\text{h } 30\text{min}) \\ M = 0,7\text{h} (42\text{min}) \end{array} \right\} \text{ celková doba trvání jednoho cyklu} = 10,6\text{h} (10\text{h } 36\text{min})$$

1.4.3. Možnosti ovlivnění buněčného cyklu vnějším činitelem

Buněčný cyklus je možné ovlivnit mnoha způsoby. Toho využívá organismus sám v rámci fyziologických regulací, je toho ale možné samozřejmě dosáhnout i zásahy zvenčí, nejčastěji různými chemickými agens. Tyto látky mohou zapříčinit rozličné změny prostřednictvím vlivu na jednotlivé fáze buněčného cyklu. Je nutné podotknout, že se často jedná o specifickou interakci látka x konkrétní buňka, takže některé látky mohou působit na různé buněčné populace různým způsobem, jiné však mohou působit na konkrétní fázi striktně bez rozdílu. Takovými látkami jsou například inhibitory mitózy, jako je kolchicin či vinblastin, které postihují funkci dělicího vřeténka, a jejich efekt je proto cílen pouze na M fázi (Eigsti et al., 1949; Malawista et al., 1968; Gigant et al., 2009). Bylo vysledováno mnoho látek ovlivňujících určité buňky v jedné z G fází cyklu, často bráněním průchodu

kontrolním bodem (Yan et al., 2011; Cai et al., 2011; Cho et al., 2011). Časté je i ovlivnění buňky procházející S fází (Joe et al., 2002; Zhu et al., 2004; Moosavi et al., 2006). V rámci tohoto širokého spektra efektů na všechny z možných fází cyklu se podle konkrétních případů jedná buď o pouhé zbrždění v dané fázi, přičemž jindy dochází k úplnému zastavení cyklu. Efekt na buněčný cyklus může být jak vratný tak ireverzibilní a v některých případech může dojít k indukci apoptózy.

1.4.4. Vliv hydrokortizonu na buněčný cyklus

Co se týče hydrokortizonu, nemůžeme i vzhledem k výše zmiňované široké škále důsledků aktivace jeho receptoru na buněčné pochody vyloučit v podstatě žádnou z uváděných možností. Ve většině pozorování ovlivňuje především délku cyklu (viz níže), jsou ale zaznamenány i děje související s apoptózou. V některých případech může tento nevratný jev podporovat (Nair et al., 2000; Gama et al., 2000), jindy jej naopak potlačuje (Komiya et al., 2008). U patrových plotének, kde je výskyt apoptózy během jejich spojování známým fyziologickým jevem (Glucksmann, 1951), bylo po působení hydrokortizonu také zaznamenáno snížení jejího výskytu (Goldman et al., 1981). Co se týče vlivu na buněčný cyklus, dokáže ho hydrokortizon v některých případech stimulovat a zvyšovat tak proliferaci (Salamanca et al., 2004; Perez et al., 2005). V souvislosti s teratogenním působením nás však více zajímá obvyklejší jev, který má opačný charakter – zpomalení proliferace prodloužením cyklu (Kaufmann et al., 1981; Hirobe, 1996; Sakayama et al., 2008). Při podrobnějším rozboru je v tomto kontextu často uváděn jeho efekt zbrždění buňky v G₁ fázi, a to zejména u rakovinných buněk, kde se do něj v tomto směru vkládají terapeutické naděje (Cha et al., 1998; Funakoshi et al., 2005). V práci Vento et al. (1985) byl jeho zásah do buněčného cyklu kuřecích hepatocytů odvozen jako pozastavení buněk v G₂ fázi. Obecně zde tedy opravdu platí předpokládaná široká variabilita a s tím související nutnost pečlivého prozkoumání konkrétních aplikací.

2. Cíle práce

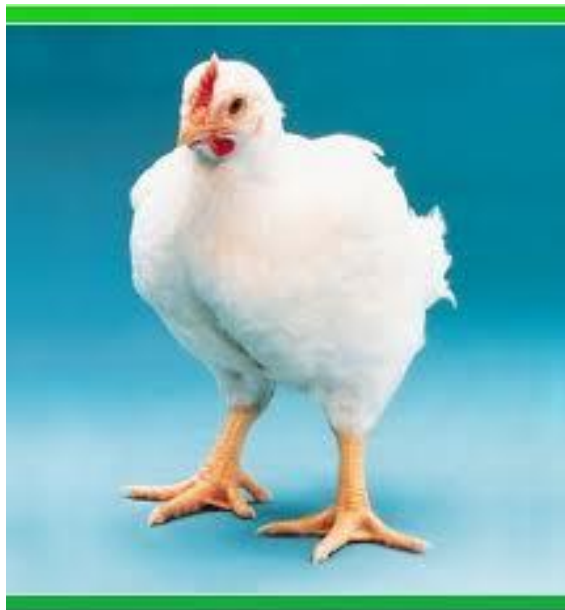
1. Prozkoumat vliv hydrokortizonu v rámci etiopatogeneze rozštěpu zobáku na kuřecím modelu na úrovni změn v buněčném cyklu frontonasálního výběžku. Hypotéza: na základě výsledků studie Peterka et al., 1997, kdy byl odhalen rapidní nárůst podílu buněk v M fázi po odstranění hydrokortizonu ze systému, bylo očekáváno hromadění buněk v G₂ fázi cyklu.

2. Provéřit roli apoptózy, jakožto dalšího děje souvisejícího s buněčnou proliferací, v souvislosti s negativními vlivy hydrokortizonu na frontonasální oblast kuřete. Hypotéza: pro vratnou povahu účinku hydrokortizonu v této oblasti nebyl očekáván významný nárůst míry apoptózy.

3. Materiál a metody

3.1. Materiál

Základním materiálem pro experimenty byly zárodky kuřete (*Gallus gallus domesticus*) plemene COBB 500 (viz Obr.8). Ve formě oplozených (tzv. násadových) vajec jsme je získávali z chovů firmy Xavergen a.s. (líheň Habry). Tato vejce byla pro možnost přesné kontroly doby vývoje zárodku během nadcházejícího pokusu udržována až do své inkubace v teplotách kolem 15 °C, při níž je vývoj zastaven, aniž by docházelo k ohrožení kvality zárodku a znemožnění následné inkubace.



Obr. 8. Masné plemeno kura domácího COBB 500.

3.2. Metody

3.2.1. Inkubace kuřecích zárodků

Pro co nejpřesnější imitaci přirozeného vývoje byla násadová vejce inkubována potřebnou dobu v inkubátoru Gallenkamp Plus II Incubator, který dokáže udržet stálou teplotu s možností nastavení na desetinu stupně – v našem případě byla nastavena teplota 37,5°C, která je pro vývoj kuřete optimální. Teplota v inkubátoru sice může lehce kolísat a mírně se lišit v rámci jeho různých oblastí, tyto výkyvy ale byly pro naše účely zanedbatelné, neboť nezpůsobovaly žádné zásadní odchylky od předpokládaného stádia odpovídajícího době inkubace, a to ani mezi jednotlivými pokusy, ani mezi zárodky v rámci jednoho pokusu. Pro udržení potřebné vlhkosti byly do inkubátoru vloženy skleněné nádoby s vodou, která byla průběžně podle potřeby doplňována.

Vejce byla umístěna v horizontální poloze do vytemperovaného inkubátoru na nosných kovových mřížkách (strana čtverce mřížky cca 4,5cm). Než byla vejce z inkubátoru poprvé vyndána k počátku provedení pokusu, byla tato každý den inkubace pootočena o zhruba 45° kolem své osy pro zabránění přichycení vznikajících cév k papírové bláně (membrana testa), což by znemožnilo následnou manipulaci s vejcem při jeho přípravě pro metodu CHEST. Zároveň toto opatření odpovídá pohybu vejce při přirozené inkubaci pod nosnicí, přičemž přínosem je v obou případech skutečnost, že tento pohyb umožňuje zárodku čerpání potřebného množství vápníku postupně z různých oblastí skořápky.



Obr. 9. Gallenkamp Plus II Incubator s násadovými vejci na nosných mřížkách.

3.2.2. CHEST (*Chick Embryotoxicity Screening Test*)

CHEST, jakožto velmi vhodná metoda pro teratologické pokusy, byla patentována v roce 1979 (Jelínek et al., 1979). Využili jsme ji pro kontrolovanou aplikaci známého množství hydrokortizonu do amniového vaku kuřete. Metodický postup obsahoval tyto kroky:

1. Třetí den inkubace zárodků (ED 3) bylo provedeno prosvícení skořápky za účelem lokalizace vzduchové bubliny a zárodku, obojí bylo pro další postup označeno na povrchu skořápky obyčejnou tužkou (kruh v případě vzduchové bubliny, obdélník cca 1x1,5 cm ohraničující zárodek). Obdélníky byly následně lehce napíleny (nesmělo dojít k porušení papírové blány) pomocí elektrické brusky.
2. Následně bylo za sterilních podmínek provedeno probodnutí skořápky v místě bubliny pro poklesnutí zárodku a ruční dobroušení napíleného okénka. Papírová membrána byla poté odstraněna v rozsahu okénka pomocí pinzety. Během tohoto procesu i další manipulace jsme pro zabránění vyschnutí obnaženého zárodku užívali podle potřeby fyziologický roztok (0,9% chlorid sodný, Hoechst-Biotika) upravený pro kuře (fyziologický roztok : injekční voda = 10:3).
3. Skořápka kolem okénka byla po obvodu zakapána roztaveným parafínem a těsně uzavřena sterilním sklíčkem odpovídající velikosti. Parafínem byl utěsněn také otvor u vzduchové komůrky. Vejce pak byla v tomto stavu vrácena do inkubátoru a bez dalšího otáčení zde ponechána do dalšího kroku. (Pozn.: ED 3 je pro otevírání okének nejvhodnější – zárodek je již méně senzitivní na manipulaci než na ED 2 a zároveň hrozí menší nebezpečí natržení cév obrůstajících zárodek než na ED 4; pro konkrétní potřebu je však možné využít i těchto alternativ. Pro ukázky stádií vývoje viz Obr.10 a 11.)
4. Na ED 4 byla provedena intraamniální aplikace. Vajíčka byla opět otevřena, byla zkontrolována a zaznamenána stadia jejich vývoje (Hamburger a Hamilton, 1951). Případné neoplozené, vývojově opožděné či již malformované nebo mrtvé zárodky byly ještě před pokusem vyřazeny. Samotná aplikace dané dávky hydrokortizonu v objemu 3 μ l skrz amnio přímo do vaku (avšak bez dotyku a možného poškození zárodku samotného) byla provedena skleněnou mikropipetou. Používali jsme hydrokortizon ve formě sodné soli (Hydrocortisoni natrii succinas, Valeant) pro možnost rozpuštění ve vodě. Po aplikaci bylo okénko znovu uzavřeno a vejce vráceno do inkubátoru k další inkubaci.

5. Pokud nebyl zárodek využit pro zpracování v rámci dalších níže popsaných metod, byl na ED 10 proveden odběr přeživších zárodků (zárodky, jež v důsledku aplikace zemřely, byly průběžně z inkubátoru odebírány). V rámci normálního vývoje kuřete odpovídá tato doba zhruba polovině délky celkového vývoje (20-21 dní), všechny orgánové soustavy jsou již poměrně vyvinuté a je tedy možné zhodnotit přítomnost možných vad. Toto bylo prováděno pomocí stereomikroskopu Leica MZ 6, přičemž bylo možné díky k němu náležícímu softwaru LAS EZ pořídit i obrazovou dokumentaci. Veškeré vady byly pečlivě zaznamenány do aplikačního protokolu. Základní postup metody CHEST byl použit při zpracování celkem 105 zárodků, z nichž bylo 78 použito pro určení optimální aplikační dávky hydrokortizonu pro další metody. Zbylé zárodky sloužily jako kontrola správného průběhu aplikace v těchto navazujících metodách.



Obr. 10. Kuřecí zárodek s napojenými vitelinními cévami na ED 3.



Obr. 11. Kuřecí zárodek na ED 5 před preparací pro analýzu frontonasální oblasti.

3.2.3. Natržení amniového vaku

Speciálním postupem, prováděným u některých embryí, bylo experimentální natržení amnia jeden den po aplikaci hydrokortizonu, tedy na ED 5. Natržení bylo provedeno sterilními nástroji v dorzální oblasti zárodku o rozsahu zhruba 1/3 jeho délky, aniž by došlo k přímému kontaktu se zárodkem. Touto cestou došlo k vypuštění amniové tekutiny i s jejím naaplikovaným obsahem. Poté bylo vejce vráceno zpět do inkubátoru a na ED 10 byl proveden standardní odběr s odečtem vad. V jednotlivých skupinách určených dávkou hydrokortizonu (10^{-3} ; 10^{-4}) a provedením či neprovedením natržení amnia v tomto pokusu bylo použito vždy 10 jedinců, tzn. 40 zárodků celkem.

3.2.4. Průtoková cytometrie

Pro kvantitativní prozkoumání proporce fází buněčného cyklu u buněk frontonasálního výběžku jako celku byla použita metoda průtokové cytometrie. Frontonasální výběžky embryí byly jeden den po aplikaci hydrokortizonu (na ED 5) odpreparovány pod stereomikroskopem (Leica MZ 6). Stejným procesem vyjma aplikace zároveň prošla i kontrolní embrya (tedy i okénkováním v rámci metody CHEST). Před dalšími kroky byly odpreparované výběžky ve 2ml mikrozkuumavkách s plochým dnem umístěny na led, aby byly zastaveny buněčné pochody probíhající ve tkáni. Pro udržení vhodných podmínek prostředí bylo do mikrozkuumavek předem nepipetováno 200 μ l Hanksova roztoku upraveného pro kuře ředěním s injekční vodou (ekvivalentně k úpravě fyziologického roztoku, viz kapitola 3.2.2.). Další zpracování a imunofluorescenční barvení buněk probíhalo dle následujícího protokolu:

1. Trypsinizace tkání

- a) ze všech vzorků odsát Hanksův roztok
- b) přidat 500 μ l trypsinizačního roztoku – nechat působit 45min
- c) rychle odsát trypsinizační roztok a přidat 500 μ l STOP roztoku
- d) ze 40 μ m nylonového filtru vystříhnout malý čtvereček a přitavit k hrotu 1ml stříkačky
- e) nasadit jehlu, pipetou přenést roztok se vzorkem do stříkačky, pozvolna protáhnout jehlou do nové mikrozkuumavky

2. Fixace buněk

- a) centrifugovat vzorky - 6min při 2000 RPM a 4°C
- b) opatrně odsát STOP roztok nad na dně vzniklou peletkou z buněk
- c) přidat 1ml vychlazeného metanolu a pomocí pipety opakovaným nasáváním opatrně promíchat (rozrušit peletku)
- d) umístit na 10min do -20°C
- e) centrifugovat (RPM 2500, platné po zbytek protokolu) a odsát metanol
- f) 2x promýt v 1% BSA

3. Permeabilizace buněk

- a) přidat 100µl permeabilizačního roztoku, zamíchat a nechat 15min na temném místě při pokojové teplotě (vyndat z ledu)
- b) centrifugovat a odsát
- c) promýt 2ml permeabilizačního roztoku

4. Značení protilátkami a jadernou barvou

Primární protilátka (Ab1): pH3 – ředění 1:400 v perm. roztoku

Sekundární fluorescenční protilátka (Ab2): TRITC – ředění 1:200 v perm. roztoku – chránit před světlem

- a) rozpipetovat Ab1, zamíchat a nechat inkubovat 30min
- b) centrifugovat a odsát Ab1
- c) 2 x promýt permeabilizačním roztokem
- d) inkubace s Ab2 – 30min, odteď minimalizovat dobu vystavení vzorků světlu
- e) 2 x promýt permeabilizačním roztokem
- f) nechat ve 200 µl permeabilizačního roztoku (pokud ihned nenásleduje vyhodnocení na cytometru, je možno uchovat v temnu na ledu)
- g) zhruba půl hodiny před měřením přidat Hoechst v konečné koncentraci 20µg/ml, celkový objem vzorku 200µl

Použité chemikálie a roztoky:

Metanol (Sigma)

Hanksův roztok (Sigma)

Trypsinizační roztok – 5ml Hanksova roztoku (Sigma) + 50mg trypsinu (Sigma)

STOP roztok – 20% FCS (Sigma) v Hanksově roztoku upraveném pro kuře

PBS (1l): 8 g NaCl (Penta)

0,2 g KCl (Sigma)

1,44 g Na₂HPO₄·12H₂O (Fluka)

0,24 g KH₂PO₄ (Fluka)

- rozpuštěno v destilované vodě, výsledné pH 7,4

1% BSA (Sigma) v PBS

Permeabilizační roztok – 0,1% saponin (Sigma), 0,5% BSA, 1% FCS, 0,1% N₃Na (Sigma)
v PBS

pH3 (Histone H3 phospho S10) – protilátka na fosforylovaný histon H3 (ab14955, Abcam)

TRITC – sekundární fluorescenční protilátka proti myšímú imunoglobulinu (Abcam)

Hoechst 33342 – jaderné barvivo (Sigma)

Parametry zpracovaných buněk byly poté měřeny v servisní laboratoři mikroskopie a cytofluorometrie v Ústavu molekulární genetiky na průtokovém cytometru BD LSR II. Celkem bylo pomocí průtokové cytometrie analyzováno 7 hydrokortizonovaných směsných vzorků z 20 zárodků a 6 kontrolních směsných vzorků z 18 zárodků. Pro správné nastavení bylo nutné dodat také vzorky pro kalibraci přístroje (buňky zcela nebarvené, buňky pouze s Hoechstem; buňky barvené pouze Ab2), které byly připraveny vynecháním příslušných kroků protokolu. Analýza výstupů byla provedena také na výše uvedeném pracovišti pomocí softwaru Flow Jo 8.8.6. Základními měřenými parametry byly buněčná velikost a granularita buněk (hustota buněčných membrán), jež se určují na základě analýzy rozptylových a odrazových vlastností buněk měřených pomocí příslušných laserů. Světelný rozptyl odpovídající velikosti buňky se nazývá FSC a granularitu buňky odráží hodnota rozptylu SSC. K analýze buněčného cyklu bylo použito vyhodnocení intenzity fluorescence jaderného barvení, které odpovídá množství jaderné DNA. Fluorescence buněk v G₁ fázi je tudíž poloviční oproti buňkám, které se nachází v G₂/M fázi, přičemž S fáze odpovídá fluorescenci mezi těmito dvěma hodnotami. Imunofluorescenční barvení proliferačním markerem pH3 sloužilo k odlišení buněk v mitóze. Buňky vyhodnocené cytometrem jako na toto barvení pozitivní, se nacházejí v M fázi, neboť fosforylovaná forma histonu H3, kterou tato protilátka značí, je výhradním markerem pro tuto fázi.

3.2.5. Imunohistochemie

Pro možnost sledování a vyhodnocování markerů buněčného cyklu v kontextu tkáně jsme zvolili postup imunofluorescenčního barvení na řezech zamražené tkáně. Na ED 5 byly inkubovaným embryím odpreparovány hlavy, které byly ihned naorientovány a zamraženy v roztoku 1:1 zamrazovacího media Cryomount (Histolab AB) a Hanksova roztoku upraveného pro kuře (viz výše). Vzorky byly poté uchovávány v -80° a 24 hodin před krájením vytemperovány na -20° . Řezy zamražené tkáně o síle $10\ \mu\text{m}$ byly zhotoveny na zmrazovacím mikrotomu Mikron HM 560 (Mikrom Walldorf, Germany) a před dalším postupem uchovány v -20° . Následné imunofluorescenční barvení bylo prováděno podle níže uvedeného protokolu:

1. Řezy zamražené tkáně uchovávané při -20°C necháme 30min rozmrznout a oschnout při pokojové teplotě
2. Permeabilizace 15min v permeabilizačním roztoku
3. Oplach 1x2min v PBS
4. Fixace 10min v acetonu v kyvetě v digestoři
5. Oplach 3x5min v PBS
6. Suché řezy obkroužíme PAP-penem (obkroužení dvou skupin vzorků pro jednotlivé protilátky)
7. Blokování: Chemibloker – nakapat pipetou na obkroužené osušené vzorky, inkubovat 60min; ředění zásobního roztoku: Chemibloker : PBS = 1:3
8. Oplach 1x5min v PBS, nechat oschnout
9. Primární protiláka:
 - ředění (v 1%BSA) – p_{H3} 1:200; PCNA 1:100
 - na každý řez 30-50 μl
 - inkubace 60min (při pokojové teplotě v zavřené vlhké komůrce)
 - negativní kontrola – pár vybraných řezů pouze s 1%BSA
10. Oplach 3x5min v PBS
11. Sekundární protilátka:
 - ředění (v 1%BSA) – TRITC 1:150
 - na každý řez 30-50 μl (včetně negativní kontroly)
 - inkubace 60min (při pokojové teplotě v zavřené a zatemněné komůrce)

12. Oplach 3x5min v PBS ve tmě
13. Montování krycího skla po aplikaci media s DAPI
14. Preparáty před mikroskopováním dát na nejméně 30min zabalené v alobalu do lednice

Použité chemikálie a roztoky:

Aceton (Chemapol)

PBS (1l): 8 g NaCl (Penta)

0,2 g KCl (Sigma)

1,44 g Na₂HPO₄·12H₂O (Fluka)

0,24 g KH₂PO₄ (Fluka)

- rozpuštěno v destilované vodě, výsledné pH 7,4

1% BSA (Sigma) v PBS

Chemiblocker (Millipore)

Permeabilizační roztok: 1% BSA v PBS

0,5% Triton X-100 (Sigma)

0,2μg/ml EDTA (Fluka)

pH3 (Histone H3 phospho S10) – protilátka na fosforylovaný histon H3 (ab14955, Abcam)

PCNA (PC10) – proliferační marker (ab29, Abcam)

TRITC – sekundární fluorescenční protilátka proti myšímú imunoglobulinu (Abcam)

vodní montovací medium s jaderným barvivem DAPI (Invitrogen)

Detekce fluorescence byla prováděna na mikroskopu Leica DMI 6000 a pomocí k němu náležícího softwaru LAZ AF bylo možné veškeré výstupy nasnímat. Počítání pH3 pozitivních buněk ve vztahu k celku pro určení mitotického indexu bylo prováděno v programu ImageJ. Takto bylo zpracováno 23 vhodných řezů pocházejících z 11 různých zárodků ve skupině po aplikaci hydrokortizonu a 20 řezů z 11 zárodků kontrolních. Volba vhodných řezů vycházela z distribuce imunofluorescenčního barvení a z nároků na kvalitu řezů pro možnost další analýzy. Výsledky byly statisticky zpracovány pomocí Fisherova exaktního testu (čtyřpolní kontingenční tabulka).

3.2.6. Detekce apoptózy – metoda TUNEL

K detekci buněk ve stádiu programované buněčné smrti – apoptózy, bylo užito značení pomocí metody TUNEL, která je založena na přítomnosti krátkých fragmentů dvoušroubovice DNA v apoptotických buňkách. V našem případě byl využit produkt ApopTag Red *In Situ* Apoptosis Detection Kit S7165 (Chemicon) obsahující všechny hlavní složky v tomto procesu potřebné. Fragmenty DNA jsou zde značeny přidáním nukleotidů s navázanou vizualizovatelnou značkou – digoxigeninem, který je možné detekovat pomocí protilátky s konjugovaným rhodaminem. Značení bylo prováděno na řezech zamražené tkáně (viz výše) dle výrobcem doporučeného protokolu:

1. Řezy zamražené tkáně uchovávané při -20°C nechat 30min rozmrznout a oschnout při pokojové teplotě

2. Fixace

a) 10min fixace v 1% PFA

b) promýt 2x5min v PBS

c) 5min postfixace v předem vychlazeném roztoku etanol:kyselina octová = 2:1 při teplotě -20°C

d) promýt 2x5min v PBS

3. Aplikace „Equilibration Buffer“

a) obkroužit řezy PAP-penem

b) nanést „Equilibration Buffer“ na vzorky (spotřeba cca $75\ \mu\text{l}/5\text{cm}^2$) a inkubovat 2min při pokojové teplotě

4. Aplikace „Working Strength TdT Enzyme“

a) připravit roztok „Working Strength TdT Enzyme“ ze složek „Reaction Buffer“ a „TdT Enzyme“ v potřebném množství v poměru $77\ \mu\text{l}/33\ \mu\text{l}$

b) napipetovat na vzorky „Working Strength TdT Enzyme“ ($55\ \mu\text{l}/5\text{cm}^2$) a inkubovat 60min ve vytemperované vlhké komůrce ve 37°

5. Aplikace „Stop/Wash Buffer“

- a) naředit zásobní roztok „Stop/Wash Buffer“ – 1ml pufru + 34ml destilované vody
- b) vložit skla do kyvety se zředěným „Stop/Wash Buffer“, 15 sekund lehce protřepat a inkubovat 10min při pokojové teplotě
- c) promýt 3x1min v PBS

6. Aplikace „Working Strength Anti-Digoxigenin Conjugate“

- a) odebrat potřebné množství alikvóty „Anti-Digoxigenin Conjugate“ (obsahuje rhodamin) a nechat bez přístupu světla zahřát na pokojovou teplotu
- b) připravit roztok „Working Strength Anti-Digoxigenin Conjugate“ ze složek „Blocking Solution“ a „Anti-Digoxigenin Conjugate“ v potřebném množství v poměru 68 μ l/62 μ l
- c) nanést na vzorky „Working Strength Anti-Digoxigenin Conjugate“ (65 μ l/5cm²) a inkubovat 30min ve vlhké komůrce bez přístupu světla
- d) promýt 4x2min v PBS

7. Montování krycího skla

- a) montování po aplikaci media s DAPI
- b) před mikroskopováním ponechat 30min v alobalu v lednici

Použité chemikálie a roztoky:

ApopTag Red *In Situ* Apoptosis Detection Kit S7165 (Chemicon):

Equilibration Buffer

Reaction Buffer

TdT Enzyme

Stop/Wash Buffer

Blocking Solution

Anti-Digoxigenin Conjugate

PBS (11): 8 g NaCl (Penta)

0,2 g KCl (Sigma)

1,44 g Na₂HPO₄·12H₂O (Fluka)

0,24 g KH₂PO₄ (Fluka)

- rozpuštěno v destilované vodě, výsledné pH 7,4

1%PFA: 0,5g PFA (Sigma) v 50ml PBS

vodní montovací medium s jaderným barvivem (Invitrogen)

Takto naznačené vzorky řezů zmražené tkáně byly poté prohlíženy a snímány pomocí mikroskopu Leica DMI 6000 a příslušejícího softwaru LAZ AF. Ve skupině vzorků po aplikaci hydrokortizonu bylo takto analyzováno osm řezů pocházejících z celkem čtyř zárodků. Stejný počet zárodků byl výchozím materiálem i ve skupině kontrolní, kde bylo nasnímáno celkem šest různých řezů o vhodné kvalitě a pozici v rámci tkáně.

4. Výsledky

4.1. Optimalizace užívané dávky

Pro možnost porovnání se staršími výsledky a optimálního projektování nových pokusů bylo nutné nejprve podrobně prozkoumat obecný teratogenní vliv konkrétního námi užívaného hydrokortizonu. Je známo, že chemické látky mohou vlivem nejrůznějších faktorů, jako je např. doba a podmínky skladování, postupně ztrácet svou účinnost. Proto bylo nutné nejprve pomocí metody CHEST stanovit teratogenní účinnost různých dávek námi užívané šarže produktu, kterou jsme poté používali ve všech dalších pokusech. Toto opatření bylo velice důležité zejména pro ty pokusy, kde nebyly zárodky odebírány, ale byly použity pro jiné metody. Pro naprostou jistotu bylo v každém z těchto pokusů ponecháno několik zárodků vystavených hydrokortizonu, které se vyvíjely až do standardní doby odběru, pro kontrolu správného průběhu aplikace. Prvním krokem tedy byla aplikace různých dávek v rozpětí s odstupy jednoho řádu, které bylo odvozeno od výsledků dřívějších pokusů, a to sice koncentrace 10^{-2} (molární koncentrace hydrokortizonu 20mmol/l*), 10^{-3} (2mmol/l) a 10^{-4} (0,2mmol/l) aplikované do amniového vaku ve standardním množství 3 μ l. Při aplikaci na ED 4 byl letální efekt (počet zárodků mrtvých před odběrem na ED 10 vyjádřený pro zjednodušení v procentech z celkového počtu) u jednotlivých dávek takovýto:

10^{-2}	75%
10^{-3}	37,5%
10^{-4}	18,75%

Procento výskytu rozštěpu zobáku (jednostranného či oboustranného, v tabulkách značen CL) u přeživších zárodků vyjádřené v procentech bylo toto:

10^{-2}	100%
10^{-3}	80%
10^{-4}	61,5%

* Pozn.: přesná koncentrace = 0,020639 mol/l

U zárodků aplikovaných na ED 5 bylo odstupňování teratogenního efektu obdobné, pouze posunuté k nižším hodnotám. Pro naše účely byly směřovatné především výsledky z ED 4, který pro nás byl k aplikaci vhodnější, jak je vysvětleno níže. Pro podrobná data pro oba dva dny aplikace viz Tab.1. Z těchto údajů vyplývá, že nejvhodnější dávkou, která splňuje podmínky relativně nízkého letálního efektu a má zároveň vysoký teratogenní potenciál v etiopatogenezi rozštěpů zobáku, je dávka 10^{-3} . Ve všech navazujících pokusech, není-li uvedeno jinak, jsme proto aplikovali právě tuto dávku, a to na ED 4, který leží časově uprostřed kritické periody, teratogenní potenciál je zde tedy na vrcholu a zároveň dobře umožňuje další zásahy či analýzu odezvy na aplikaci na ED 5, kdy tvorba orofaciální oblasti (a tedy ani kritická perioda) ještě není ukončená.

Tab. 1. Porovnání působení hydrokortizonu v různých dávkách při aplikaci na ED 4 a ED 5.

			ED 4			
dávka	celkový počet zárodků	počet mrtvých	% mrtvých z celku	počet CL vad	% CL vad z celku	% CL vad u přeživších
10^{-2}	16	12	75%	4	25%	100%
10^{-3}	16	6	37,50%	8	50%	80%
10^{-4}	16	3	18,75%	8	50%	61,50%

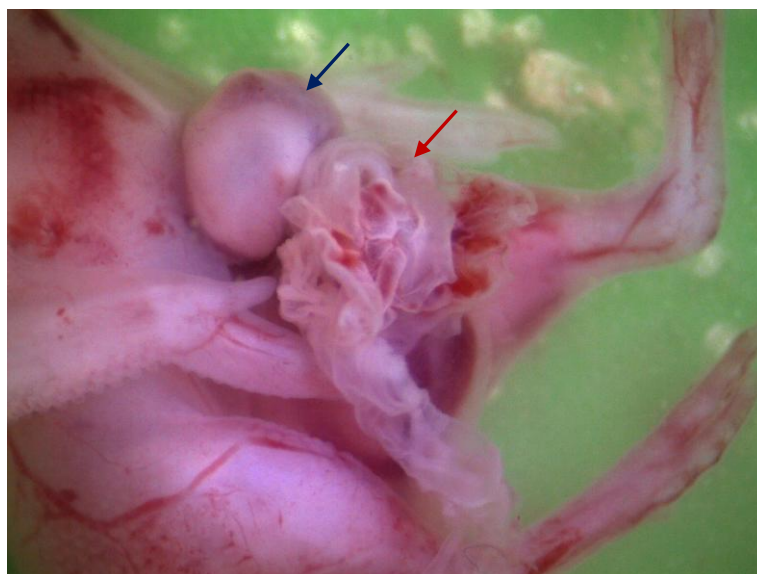
			ED 5			
dávka	celkový počet zárodků	počet mrtvých	% mrtvých z celku	počet CL vad	% CL vad z celku	% CL vad u přeživších
10^{-2}	10	4	40%	3	30%	50%
10^{-3}	10	2	20%	1	10%	12,50%
10^{-4}	10	1	10%	0	0%	0%

4.2. Natržení amniového vaku

Jelikož pokus se záchranným efektem natržení amniového vaku byl prováděn s jinou šarží látky a s dávkou o cca půl řádu méně koncentrovanou ($1\mu\text{g}/3\mu\text{l}$) než námi zvolená koncentrace 10^{-3} , rozhodli jsme se pro úplnost tento pokus zopakovat, a to s dávkami 10^{-3} a 10^{-4} , které původní dávku z obou stran ohraničují. Ačkoli pro některé zárodky bylo natržení amnia příliš velkým zásahem, který měl letální efekt, vzorek přeživších zárodků potvrdil u obou dávek záchranný efekt natržení absencí CL vad i rozštěpu stěny břišní (viz Tab.2). Pouze v jednom případě u dávky 10^{-3} byla patrná malformace, a to umbilikální hernie spolu s ektopií srdce (viz Obr.12), což lze považovat za lehčí formu rozštěpu stěny břišní.

Tab. 2. Záchranný efekt natržení amnia u dávek 10^{-3} a 10^{-4} ; evn = rozštěp stěny břišní, „cross beak“ = asymetrický zobák v důsledku jeho jednostranné hypoplázie

dávka	natržení amnia	celkový počet zárodků	počet malform. zárodků	z toho evn	z toho CL	Jiné + popis
10^{-3}	NE	6	6	5	5	1 umbilikální hernie
10^{-4}	NE	8	7	6	6	1 "cross beak"
10^{-3}	ANO	5	1	0	0	1 umbil. hernie + ektopie srdce
10^{-4}	ANO	4	0	0	0	-



Obr. 12. Umbilikální hernie s ektopií srdce u zárodku odebraném na 10 ED. Modrá šipka – ektopicky umístěné srdce; červená šipka – břišní orgány částečně vyhřezlé do pupečníku.

4.3. Analýza pomocí průtokové cytometrie

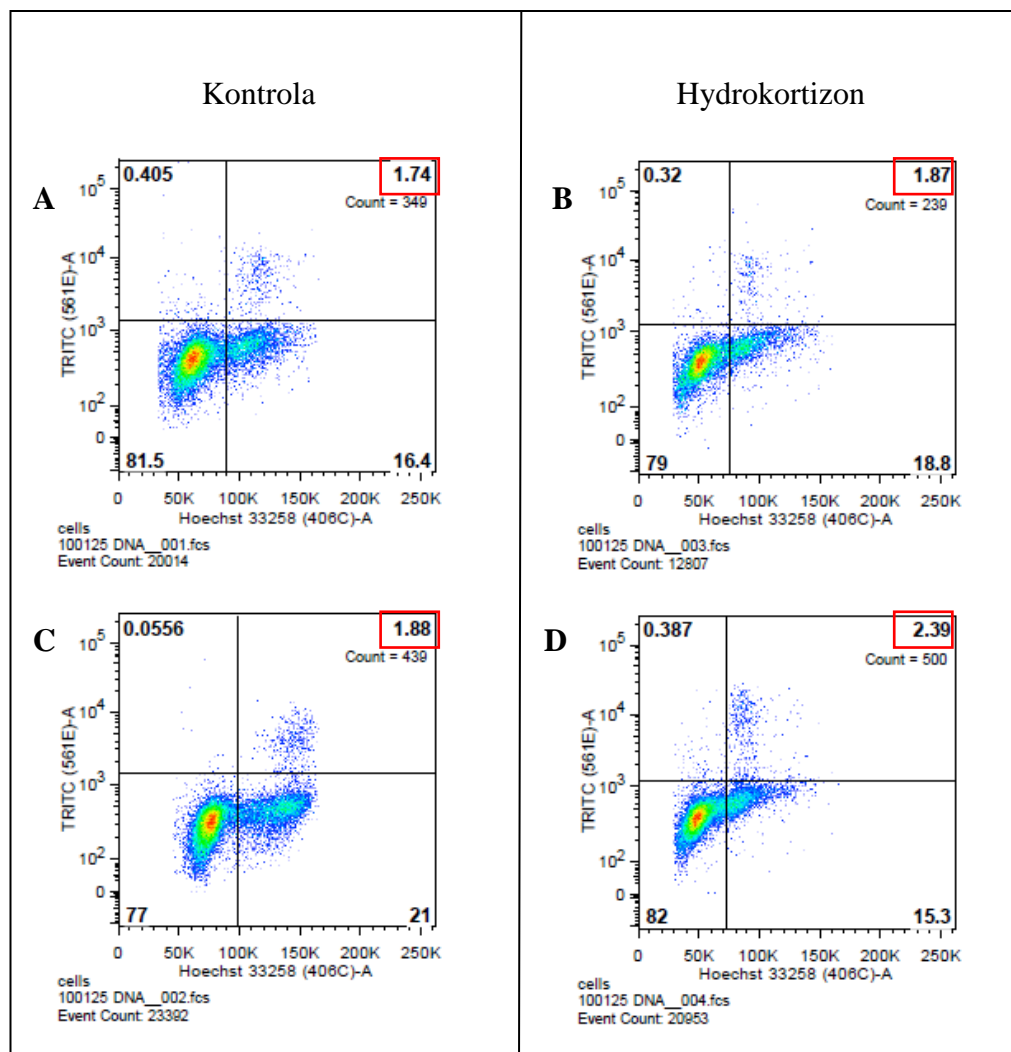
4.3.1. Určení koncentrace pH3 a optimalizace dalších parametrů protokolu

Jelikož jsme čerpali zkušenosti o postupech a protokolech z pokusů prováděných na myším modelu, bylo nutné před barvením buněk pro potřeby průtokové cytometrie nejprve udělat zkušební barvení pro nalezení vhodné koncentrace námi vybrané primární protilátky na barvení buněk v mitóze – pH3. Cílem bylo najít kompromis mezi dostatečnou fluorescencí a minimální spotřebou protilátky. Zároveň nám tento pokus pomohl optimalizovat délku trypsinizace kuřecí tkáně, neboť pro validní měření je nutná úplná disociace buněk, jejichž struktura zároveň nesmí být působením trypsinu porušena. Buňky proto podstoupily totožný protokol jako při přípravě pro průtokovou cytometrii. Bylo barveno 5 kontrolních vzorků obsahujících po jednom odpreparovaném frontonasálním výběžku, každý jinak koncentrovanou protilátkou pH3 ve škále ředění 1:100, 1:200, 1:300, 1:400 a 1:500, přičemž koncentrace sekundární protilátky (TRITC) byla u všech vzorků stejná (1:200). Poté byl výsledek barvení vizuálně zkontrolován pomocí fluorescenčního mikroskopu. Za optimální ředění bylo určeno 1:400 (viz Přílohy Obr.A). Jelikož buňky nebyly zcela disociovány, došlo pro další pokusy k prodloužení doby trypsinizace na konečných 45min (původní protokol pro myší tkáň doporučoval 30min). Další novou informací, kterou nám tento pokus poskytl, bylo zjištění, že během četných promývání dochází k nezanedbatelné ztrátě určitého množství buněk, což by mohlo negativně ovlivnit výstupy z průtokového cytometru. Rozhodli jsme se proto v dalších pokusech vytvářet směsné vzorky obsahující 2-3 frontonasální výběžky (podle okolností preparace – velikost odpreparované části výběžku apod.).

4.3.2. Měření počtu buněk v M fázi

Jedním z možných výstupů průtokového cytometru je vyčlenění populace buněk, jež jsou fluorescenčně pozitivní na konkrétní použitou protilátku. V našem případě šlo o pH3, resp. o detekci na ní navázané sekundární protilátky TRITC. Den po standardní aplikaci hydrokortizonu byly odebrány směsné vzorky (2-3 výběžky v jedné mikrozkuhavce) jak hydrokortizonovaných tak kontrolních zárodků (předchozí postup

shodný s metodou CHEST). Analýza průtokovým cytometrem neodhalila rozdíl mezi počtem buněk v M fázi, který by odpovídal údajům získaným v analyzované oblasti výběžku při pokusu Peterka et al., 1997 (viz Obr.13). Získaná data byla však poměrně variabilní i v rámci jednotlivých skupin. Možná vysvětlení získaných výstupů budou diskutována níže. Obecně lze říci, že tato data nepotvrdila radikální pokles počtu buněk v mitóze po aplikaci hydrokortizonu jakožto markantní proces platný pro celý frontonasální výběžek.

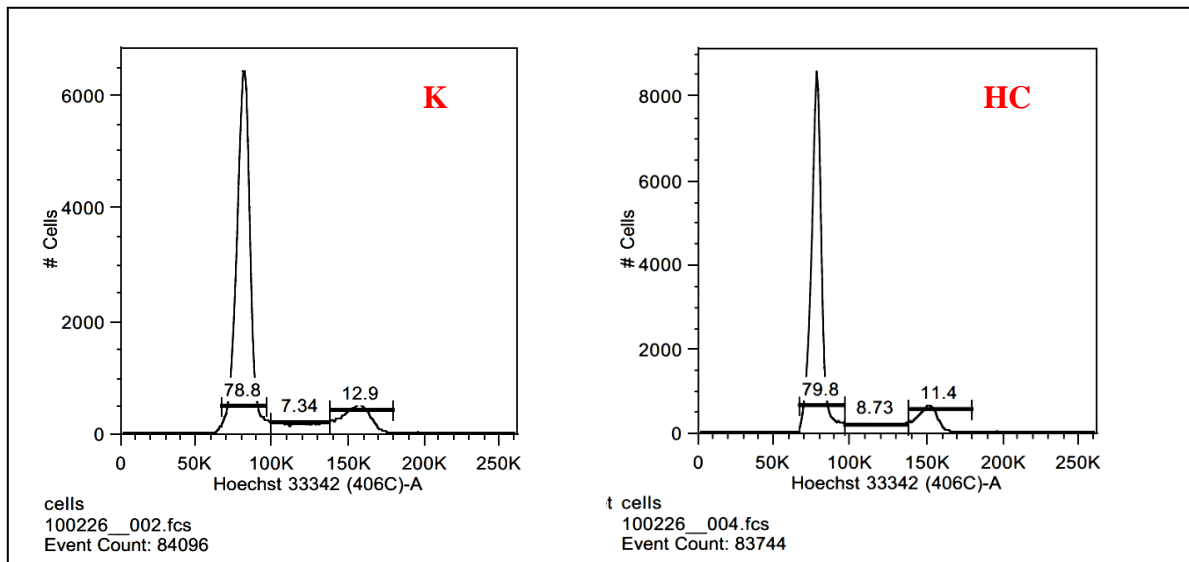


Obr. 13. Podíl buněk v M fázi podle výsledků průtokové cytometrie vyjádřený podílem buněk pozitivních na pH3 barvení = pravý horní kvadrant; číslo v červeném obdelníku udává procento buněk v mitóze z celku. A,B = kontrolní vzorky; C,D = hydrokortizonované vzorky.

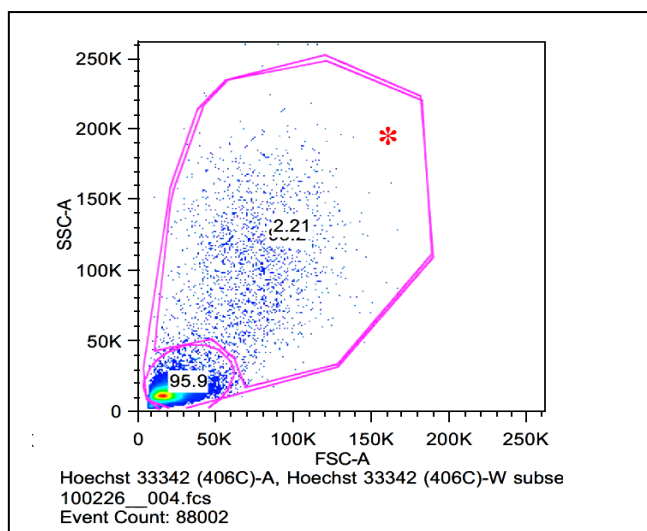
4.3.3. Analýza buněčného cyklu

Výše zmíněné směsné vzorky a vzorky z dalšího pokusu připravené shodným způsobem byly analyzovány také na obsah jaderné DNA. Tato data umožňují vytvořit histogram, který odráží proporce množství buněk v jednotlivých fázích cyklu. Standardním výstupem je histogram se dvěma vrcholy, z nichž první (blíže k nule na ose x), zpravidla nejvyšší, je vytvářen buňkami v G_1 fázi. Druhý vrchol nalézající se na nad dvojnásobnými hodnotami než první, značí buňky v G_2/M fázi. Mezi oběma vrcholy se pak nachází různě vysoké plató buněk v S fázi (odráží postupně přibývajícím DNA materiál). Pro odlišení mezi fázemi G_2 a M jsme chtěli využít pozitivitu/negativitu buněk na pH3 barvení. Bohužel se ukázalo, že proces barvení výstupy z histogramu zkresluje a znemožňuje tak přesnější analýzu – permeabilizace patrně narušuje vnitrobuněčné membrány (včetně jádra a přilehlých struktur) a intenzita fluorescence jaderného barvení tím byla ovlivněna. Pro přesnější výsledek jsme proto provedli pokus s měřením nebarvených vzorků (protokol v tomto případě končí fixací a následuje přidání jaderného barviva Hoechst, které pro svůj průnik do jádra permeabilizaci nepotřebuje), čímž jsme docílili velice standardních výstupů pro analýzu histogramů. V tomto pokusu bylo použito 9 zárodků hydrokortizonovaných (3 směsné vzorky) a 6 kontrolních (2 směsné vzorky). Pokud by platila naše hypotéza, čili zbrždění buněk v G_2 fázi, očekávali bychom u hydrokortizonovaných vzorků výrazné zvýšení druhého vrcholu na úkor zbylých částí histogramu. Další eventualitou, které by odrážela zásah do buněčného cyklu, bylo navýšení proporcí jiné oblasti histogramu poukazující na pozastavení v jiné z fází cyklu, než v očekávané G_2 .

Histogramy hydrokortizonovaných vzorků však nevykazovaly žádné extrémní odchylky a v porovnání s kontrolními histogramy byly až na malé rozdíly shodné (viz Obr.14). Na výstupu zobrazujícím buněčnou populaci v souvislosti s velikostí jednotlivých buněk (osa x - FSC) a jejich granularitou, tedy hustotou buněčných membrán (osa y - SSC), nás zaujala populace buněk mimo hlavní koncentrované centrum (viz Obr.15). Tyto buňky, vykazující větší velikost i granularitu než buňky v centru, jsme se rozhodli podrobit podrobnější analýze, neboť jsme na grafech spatřovali určité možné rozdíly mezi oběma skupinami vzorků, konkrétně dosahování celkově vyšších hodnot buněčné granularity v populaci hydrokortizonovaných buněk oproti kontrole.



Obr. 14. Histogramy znázorňující fáze buněčného cyklu. Nad úsečkami orientační vyčíslení počtu buněk v dané fázi v procentech. Levý vyšší vrchol = G_1 fáze; pravý nižší vrchol = G_2 fáze; plató mezi vrcholy = S fáze. K = kontrolní buňky, HC = hydrokortizonované buňky.

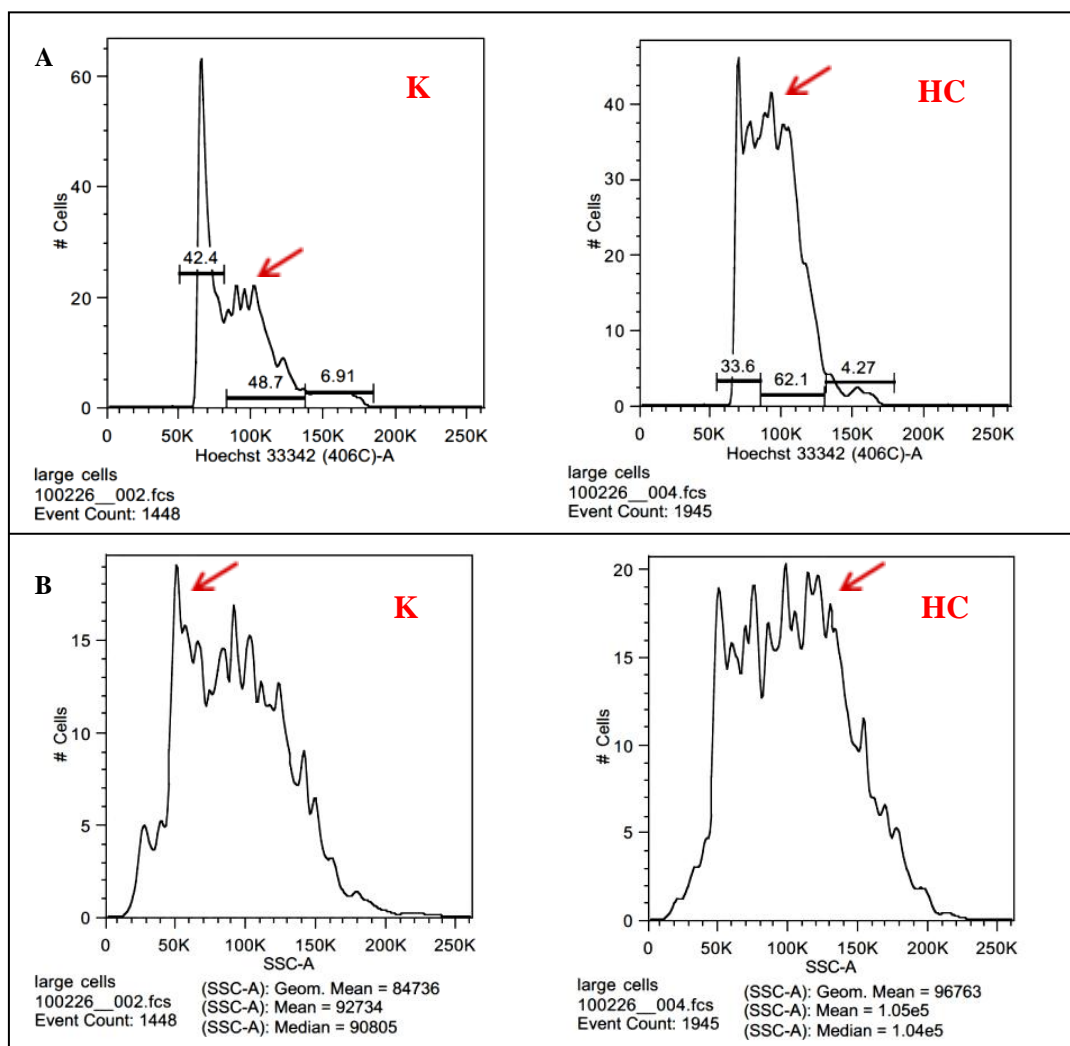


Obr. 15. Graf znázorňující velikost a granularitu buněk (hydrokortizonový vzorek). Hvězdičkou je označen sektor buněk mimo hlavní centrum, které se vyznačují vyšší velikostí (FSC) a především větší granularitou (SSC). Číslo uvnitř sektorů vyjadřují podíl buněk na celkové populaci.

Ukázalo se, že tyto buňky, jejichž počet se u všech vzorků pohyboval kolem 2% z celkové buněčné populace, opravdu vykazují zvláštní vlastnosti. Proporce fází buněčného cyklu této subpopulace byly rozdílné, a to především vlivem mnohem většího podílu buněk v S fázi. Jak je vidět na Obrázku 16A, u kontrolních měření dosahoval podíl této fáze zhruba 50%, zatímco u hydrokortizonovaných vzorků byl tento podíl ještě o cca 10% vyšší, samozřejmě na úkor proporce buněk v ostatních fázích cyklu (hranice jednotlivých fází byly zkopírovány z histogramů daných vzorků pro celou populaci, kde se díky jeho standardnímu průběhu daly dobře určit). Tyto výstupy naznačily, že zbrždění, které jsme

očekávali v G₂ fázi, se odehrává v S fázi, avšak pouze v rámci malé, velice specifické buněčné populace. Po odečtení dat této populace z původních histogramů (tedy při vyjádření histogramů pouze pro buňky v koncentrovaném centru) se mírné rozdíly mezi kontrolními a hydrokortizonovanými vzorky při měření celé populace ještě zmenšily.

Provedli jsme také analýzu vlastnosti, která nás primárně ke zkoumání této specifické populace přivedla, a sice granularity do ní náležících buněk. Jak ukazuje Obrázek 15B, potvrdila se naše domněnka, že buňky hydrokortizonovných vzorků byly oproti kontrolním více granulární, což lze vyčíst z grafů samotných i z vyčíslených průměrných hodnot, které jsou uvedeny pod nimi



Obr. 16. Parametry populace granulárních buněk mimo centrum. (A) Histogramy znázorňující fáze cyklu; šipky označují oblast histogramu s podílem buněk v S fázi. (B) Grafy znázorňující granularitu buněk měřenou SSC; šipky ukazují na rozdíly v proporcích grafů (posun k vyšším hodnotám u hydrokortizonovaných buněk). K=kontrolní vzorek, HC = hydrokortizonovaný vzorek.

Souhrnem lze říci, že analýza pomocí průtokové cytometrie nám odhalila, že změny po aplikaci hydrokortizonu se nedotýkají plošně všech buněk frontonasálního výběžku (čemuž by odpovídaly i výsledky analýzy procenta buněk v M fázi), ale postihují pouze určitou specifickou populaci. Metoda průtokové cytometrie se pro podrobnější rozbor ukázala jako příliš robustní i vzhledem ke směsné povaze vzorků, jejichž přesná analýza touto metodou má oproti testování monokultur mnohá úskalí. Pro možnost přesnější lokalizace a rozboru specifických dějů po působení hydrokortizonu na podkladě získaných informací jsme proto pro další postup zvolili imunofluorescenční barvení na histologických řezech.

4.4. Analýza pomocí imunohistochemie

4.4.1. Značení buněk v S fázi

S cílem lokalizovat příslušnou na hydrokortizon citlivou populaci jsme se rozhodli použít metodu, která na rozdíl od průtokové cytometrie zachovává tkáňový kontext, a sice imunofluorescenčního barvení histologických řezů. Pro možnost zacílení a zkoumání hledané specifické populace bylo na základě výsledků průtokové cytometrie nejlepší cestou označení buněk procházejících S fází, neboť právě jejím rapidním navýšením se tato populace (u kontrolních i hydrokortizonovaných vzorků) primárně vyznačovala. Stěžejním krokem bylo najít specifickou protilátku na tuto fázi cyklu fungující na kuřecím modelu. Tradiční značení S fáze pomocí BrdU nebylo žádoucí, neboť by vyžadovalo další aplikační zásah před odebráním zárodku a především takto aplikovaný BrdU sám o sobě způsobuje v námi studované orofaciální oblasti významný pokles proporce buněk v M fázi oproti kontrole, jak ukázala studie Peterka et al., 1997. V této studii byly navíc při interakci s hydrokortizonem výsledky podílu buněk v M fázi opět odlišné jak od skupiny s čistou kontrolou, tak od hydrokortizonovaných vzorků bez BrdU. Tento efekt by byl pro naše potřeby velmi nežádoucí. Rozhodli jsme se proto pro protilátku PC10 značící proliferací marker PCNA, který je primárně určen pro značení proliferujících buněk obecně, tzn. nediferenciovaných buněk mimo G_0 . V případě námi studované embryonální tkáň vykazují pozitivitu za normálních okolností prakticky všechny buňky (pro ukázkou tohoto barvení viz Přílohy Obr.C a D). PCNA ale může být použita i jako marker výhradně pro S fázi. V průběhu cyklu se PCNA nalézá povětšinou volně v karyoplasmě, jedna z forem se vyskytuje také v cytoplasmě (Naryzhny a Lee, 2004), avšak pouze PCNA aktivní při buněčné replikaci je komplexem pevně navázaným na DNA. Tuto formu proto jako jedinou nelze odstranit působením detergentu (Bravo a MacDonald-Bravo, 1987). Na pokladě tohoto poznatku byly provedeny studie, které potvrzují korelaci mezi takto ošetřenými na PCNA pozitivními buňkami a buňkami v S fázi (Landberg a Roos, 1991; Beppu et al., 1994). Na základě studie Landberga a Roose (1991), která velice podrobně zkoumala různé možnosti fixace a permeabilizace v zájmu optimalizace výsledků, jsme upravili také náš protokol – před fixací jsme zařadili permeabilizaci (která se normálně na řezech neprovádí) pomocí detergentu totožného složení, jaký byl použit v uvedené studii.

Použitím tohoto barvení se nám pak podařilo nalézt oblasti se zvýšenou mírou výskytu S fáze, čímž se ukázalo, že hledané buňky se v rámci tkáně nevyskytují difúzně – nacházely se v největší míře ve středu předního okraje výběžku (středová na S fázi bohatá oblast; dále jen S-oblast) a méně markantně v jeho předních laterálních oblastech (postranní S-oblasti). Obě oblasti postupně s rostoucí hloubkou řezů (mediálním směrem) slábly a postranní oblasti nebyly u některých řezů (zejména kontrolních) téměř vůbec patrné. Pro ukázkou barvení výskytu S-oblastí viz Přílohy Obr.E. Na detailním obrázku (viz Přílohy Obr.F) můžeme vidět ukázkou barvení v S-oblasti při větším zvětšení (koncentrované červené body v rámci modrých jader), která zároveň ukazuje, že koncentraci buněk v S fázi jsme pozorovali pouze u buněk mezenchymu, nikoli epitelu.

4.4.2. Sledování vlivu hydrokortizonu na buněčný cyklus na histologických řezech

Jelikož je barvení markeru PCNA vhodné spíše pro kvalitativní zhodnocení, jako je vymezení hranic oblasti bohaté na pozitivní buňky, než pro přesnou kvantitativní analýzu (např. vyhodnocení podílu pozitivních buněk z celku), rozhodli jsme se použít také marker mitózy pH3, který byl pro tento účel vhodnějším nástrojem (pro ukázkou pH3 barvení na řezu viz Přílohy Obr.B). Využili jsme se kombinaci obou barvení, a to následujícím způsobem – sklíčka s histologickými frontálními řezy frontonasálních výběžků byla barvena na obě protilátky zároveň tak, že vždy první ze tří řezů v jedné řadě měl jako primární protilátku použito PCNA a zbylé dva pH3. Docílili jsme tak nabarvení sousedních vzorků různými protilátkami. To nám poté umožnilo na jednom z řezů provést vymezení hranic S-oblastí a na sousedním řezu poté kvantitativně vyhodnotit podíl buněk v M fázi uvnitř (popř. vně) této oblasti pomocí přeneseného vyznačení těchto hranic. Naší hypotézou vycházejících z dosavadních pozorování bylo, že pokud se opravdu jedná o oblasti bohaté na buňky specifické populace nalezené průtokovou cytometrií, odrazí se toto na snížení počtu buněk v M fázi u hydrokortizonovaných vzorků oproti kontrole, neboť nalezený nárůst S fáze se musí logicky odehrát na úkor proporce fází ostatních (jak naznačily i histogramy). Naopak u buněk mimo S-oblasti by se neměly vyskytovat mezi oběma skupinami významné rozdíly. Pro unifikaci byly oblasti buněk mimo S-oblasti určené pro analýzu vymezeny jako ovály o výšce poloviny délky daného výběžku a šířce

odpovídající jedné šestině jeho střední šířky, přičemž byly umístěny z každé strany jednu šestinu šířky od kraje se středem v polovině délky výběžku (viz Přílohy Obr. G).

Uvnitř S-oblastí i v definovaných oblastech mimo ně byl pak počítán celkový počet buněk (DAPI pozitivních) proti počtu buněk v M fázi (pH3 pozitivních). Pro výsledný podíl buněk v M fázi (=mitotický index) ve všech oblastech viz Tabulku 3. Pro středovou S-oblast tyto výsledky potvrdily signifikantní rozdíl mezi hydrokortizonovanými výběžky a kontrolou, zatímco výsledky ve zvolené oblasti mimo S-oblasti se mezi těmito skupinami téměř vůbec nelišily. U postranní S-oblasti sice také došlo k poklesu mitotického indexu u hydrokortizonované skupiny proti kontrole, avšak tento rozdíl nebyl signifikantní. Pozoruhodné jsou i rozdíly mezi jednotlivými oblastmi pouze v rámci kontrolní skupiny, které svědčí o obecně vysoké heterogenitě a dynamice dějů v rámci různých oblastí výběžku.

Tab. 3. Mitotické indexy jednotlivých analyzovaných oblastí kontrolních a hydrokortizonovaných vzorků. * = statisticky signifikantní rozdíl od kontroly (P<0,01)

KONTROLA					
oblast	celkový počet b.	počet b. v M fázi	mitotický index	mitotický index v %	S.D.
středová S-obl	15025	573	0,038136439	3,81	1,07
postranní S-obl	8520	198	0,023239437	2,32	0,69
mimo S-obl	26029	873	0,033539514	3,35	0,84
HYDROKORTIZON					
oblast	celkový počet b.	počet b. v M fázi	mitotický index	mitotický index v %	S.D.
středová S-obl	15641	377	0,024103318	2,41*	0,58
postranní S-obl	15435	314	0,020343375	2,03	0,52
mimo S-obl	26287	883	0,033590748	3,36	0,89

Naše analýza na histologických řezech odhalila obdobnou specifitu určité populace buněk a povahu její reakce na hydrokortizon jako průtoková cytometrie, což nám umožnilo tyto výsledky navzájem propojit a zamýšlet se nad nimi jako nad souvisejícími fenomény. Samotný frontonasální výběžek i interakce jeho buněk s hydrokortizonem se ukázaly být mnohem složitějším systémem, než jsme původně předpokládali.

4.5. Analýza výskytu apoptózy po aplikaci hydrokortizonu

4.5.1. Volba pozitivní kontroly

Za účelem zvážení role programované buněčné smrti v rámci negativního vlivu hydrokortizonu při etiopatogenezi rozštěpů bylo provedeno porovnání výskytu apoptózy mezi kontrolní tkání nasofrontálního výběžku a hydrokortizonovanou tkání. Buňky podléhající tomuto ději byly vizualizovány pomocí metody TUNEL. Jelikož jsme s tímto procesem na kuřecím modelu neměli přímou zkušenost, bylo nutné pro zhodnocení správného průběhu barvení vytvořit vhodnou pozitivní kontrolu. K tomuto účelu byla vybrána oblast končetin na ED 6,5 (stádium H & H 30), kde je v tomto období u kuřete pozorován známý proces fyziologické hromadné buněčné smrti mezi jednotlivými budoucími prsty (Hamburger a Hamilton, 1951; Saunders et al., 1962). Končetiny byly po příslušné době inkubace kuřecích zárodků odpreparovány, zamrazeny a nakrájeny obdobným postupem jako hlavy pro analýzu frontonasálních výběžků. Poté prošly také shodným postupem barvení dle protokolu pro TUNEL. Při následném pozorování a snímání bylo u této pozitivní kontroly patrné jasně lokalizované fluorescenční značení v jádrech buněk, přičemž nejvíce zřetelné bylo centrum silné apoptózy u laterálního okraje dolních končetin (viz Přílohy Obr.H).

4.5.2. Výskyt apoptózy na řezech frontonasálního výběžků

Hodnocení výskytu apoptózy bylo zaměřeno na hledání shluků apoptotických buněk obdobného charakteru jako u kontrolních řezů končetin. U hydrokortizonovaných zárodků nebyl zaznamenán výskyt apoptotických shluků ani větší hustota jednotlivých buněk podléhajících programované buněčné smrti než u vzorků kontrolních. Byly zde přítomny pouze soliterně se vyskytující na barvení TUNEL pozitivní buňky (v řádu jednotek na plochu výběžku), které se svou hustotou nevymykaly fyziologické normě. V žádném z ohledů se tak hydrokortizonované řezy nelišily od řezů kontrolních (viz Přílohy Obr.I a J).

Při podrobnějším zkoumání řezů z hlubších vrstev tkáně bylo možné u kontrolních řezů nalézt menší centra apoptotické aktivity v místech počínajícího splývání výběžků,

např. v okolí hranice frontonasálního a maxilárního výběžku (viz Přílohy Obr.K). Tento jev pravděpodobně souvisí s fyziologickými pochody v rámci srůstání orofaciálních výběžků. U hydrokortizonovaných vzorků tento jev z důvodu opožděného vývoje a z toho vyplývající absence pochodů souvisejících se spojováním výběžků pozorován nebyl.

Z našich pozorování lze vyvodit, že apoptóza není na buněčné úrovni součástí negativního efektu působení hydrokortizonu v oblasti frontonasálního výběžku v rámci problematiky etiopatogeneze orofaciálních rozštěpů.

5. Diskuze

5.1. Úvod do diskuze

Ačkoli byla naše původní hypotéza ohledně vlivu na buněčný cyklus relativně jednoduchá, postupným testováním se ukázalo, že problematika efektu hydrokortizonu na buněčné úrovni v námi studované orofaciální oblasti je mnohem složitější a komplexnější, než bychom zprvu předpokládali. Původně zamýšlený design řešení primárních otázek jsme proto tomuto faktu v průběhu práce dle potřeby přizpůsobovali, abychom se mohli posunout dále a vyvodit další indicie a možné závěry. Studie nám takto poskytla určitý náhled zkoumaného fenoménu, jehož zákonitosti a jejich zasazení do celkového vývojového a teratologického kontextu zde budou dále podrobněji diskutovány. Zároveň samozřejmě ve vztahu k vysoké složitosti, široké propojenosti a specifitě buněčných dějů vyvstalo množství navazujících otázek a podnětů pro další studium, jehož možné cíle zde budou taktéž zmíněny.

5.2. Buněčný cyklus

5.2.1. Rozbor výsledků průtokové cytometrie

Provedená analýza buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie vyvrátila naši původní hypotézu, že významná část buněk frontonasálního výběžku je po 24 hodinovém působení hydrokortizonu nahromaděna v G₂ fázi cyklu. Překvapujícím zjištěním bylo, že většina buněk v tomto ohledu nevykazuje žádné rozdíly v průběhu buněčného cyklu oproti kontrolním vzorkům. Nalezli jsme však malou specifickou populaci (cca 2% z celku), která měla i u kontrolních vzorků nestandardní proporce fází s výrazným navýšením podílu buněk v S fázi (kolem 50%), přičemž vzorky odebrané z hydrokortizonovaných jedinců vykazovaly ještě o 10% větší navýšení proporce buněk v této fázi. Tento výsledek tedy naznačuje, že působením hydrokortizonu jsou buňky určité specifické populace zbrzděovány v S fázi buněčného cyklu. Tuto populaci jsme primárně odlišili od zbytku na základě vysoké buněčné granularity, dále bude proto v textu pro zjednodušení používán termín GC (granular cell) populace. Tato i další její vlastnosti budou podrobněji probírány níže.

Co se týče poklesu podílu buněk v M fázi, který byl po aplikaci hydrokortizonu pozorován ve studii Peterka et al., 1997, nebyl pomocí průtokové cytometrie obdobný efekt odhalen. Kvůli nekompatibilitě imunofluorescenčního barvení s analýzou histogramů znázorňujících buněčný cyklus bylo možné zkoumat tento efekt pouze v rámci celé měřené populace. S ohledem na odhalení pouze malého množství ovlivněných buněk je tedy pravděpodobné, že takto malý rozdíl nebyla metoda průtokové cytometrie, vhodná spíše pro čisté buněčné unifikované populace, schopná relevantně odhalit. Uvědomíme-li si, že ve studii Peterka et al., 1997 byl zaznamenán pokles M fáze kolem 1% a 98% procent buněk se ukázalo jako na působení hydrokortizonu necitlivých, dostáváme se v rámci populace celého výběžku k velice malým odchylkám, které mohou být při analýze výstupů z cytometru velice snadno zkresleny např. vlivem „gatování“, tedy ohraničování hledané populace v rámci směsného vzorku, či stanovováním hranice mezi buňkami na barvení pozitivními a negativními, přičemž ani jeden z těchto procesů nemůže být nikdy zcela přesný. Tyto komplikace poukazují na obecně příliš velkou robustnost cytometrického

měření, chceme-li zjistit menší odchylky. Proto bylo barvení M fáze pro větší přesnost a zachování kontextu dále využito na tkáňových řezech.

5.2.2. Vlastnosti populace buněk citlivých na působení hydrokortizonu

Vrátíme-li se k primárním výsledkům analýzy cyklu průtokovou cytometrií a nalezení citlivé GC populace, nabízí se zde otázka, z jakého důvodu je tato populace tak odlišná a to i v rámci neovlivněné populace kontrolních buněk. Buňky GC populace se vyznačují těmito vlastnostmi: jsou vysoce granulární, mají menší podíl G_1 fáze než zbylá populace, podíl G_2/M fáze je také menší a nejvíce buněk se nachází v S fázi. Z měření bohužel neznáme dynamiku cyklování, neboť můžeme vidět pouze proporce jednotlivých fází u buněk zastavených v jednom momentu. Nemůžeme proto přímo usuzovat na dobu trvání jednoho cyklu ani jednotlivých fází, ale vlastnosti této populace v porovnání s některými již známými fakty napovídají, že by se mohlo jednat o populaci rychle cyklujících buněk. Mezi příklady rychle cyklujících buněk patří například kmenové či jiné prekurzorové buňky (jako např. fibroblasty). Ty se často vyznačují maximálním možným zkrácením G_1 a G_2 fáze, přičemž namísto obvyklé G_1 fáze je nejdelší částí cyklu S fáze (fáze S a M příliš krátit nelze a M je relativně krátkou fází) (Liskay, 1977; Holstein a David, 1990; Smith, 2001; Alberts et al., 2002; Becker et al., 2006). V práci Liskaye a kolegů (1977) bylo zaznamenáno dokonce téměř úplné přeskočení fáze G_2 fáze u křeččích fibroblastů. Jelikož S fáze je tedy u takovéto buňky s omezeným trváním G fází nejdelší fází cyklu, logicky by jí na histogramu v momentě zastavení náležel největší podíl buněk, stejně jako to ukazují naše výstupy.

Další zajímavou vlastností je vysoká granularita těchto buněk. Pokud vezmeme v úvahu nastíněný model rychle se dělící buňky, nabízí se v této souvislosti vysvětlení přítomnosti vysokého obsahu hotových buněčných membránových organel jako vhodného prostředku pro zkrácení celého procesu dělení, zejména těch fází, jejichž úkolem je z velké části syntetizovat negenetický materiál buňky (= obě G fáze cyklu; během S fáze dochází k syntéze materiálu rovněž, ale nelze ji, jak již bylo řečeno, z důvodu probíhající replikace téměř vůbec krátit). Podíváme-li se v tomto ohledu na příklad kmenových a jim podobných prekurzorových buněk, nalzáme u nich v této souvislosti jev známý jako asymetrické dělení cytoplazmy. Jelikož při standardním dělení by se buněčný obsah vždy při dalším

dělení o polovinu zredukoval a brzy by byla nutná jeho nová masivní syntéza, rozdělují se tyto buňky na dvě nestejně velké buňky dceřiné. Obě sice mají stejný obsah DNA, avšak jedna z nich dostává pouze menší část obsahu cytoplazmy a organel, zatímco druhá si ho většinu ponechává (Lin a Schagat, 1997; Jan a Jan, 1998; Matsuzaki, 2000). Prvně jmenovaná buňka pak zpravidla nastupuje vývoj směrem k diferenciaci a druhá udržuje populaci prekurzorových rychle se dělících buněk, při jejichž dělení je tak v každém cyklu nutná mnohem menší míra syntézy potřebných buněčných organel.

Jelikož námi studované buňky vykazují výše uvedené vlastnosti, lze se domnívat, že se patrně jedná o buňky s krátkým buněčným cyklem (které by v rámci prekurzorové funkce mohly využívat také procesu asymetrického dělení). Tento aspekt bychom rádi hlouběji zkoumali v navazující práci realizací pozorování dynamiky buněčných procesů, a to jak za fyziologických podmínek, tak po zásahu pomocí hydrokortizonu.

5.2.3. Změny po aplikaci hydrokortizonu v GC populaci

Porovnáme-li vlastnosti GC populace u kontrolních vzorků a této populace u buněk po aplikaci hydrokortizonu, ukázala se GC populace oproti ostatním buňkám, které nevykazovaly oproti kontrole žádné rozdíly, jako na toto působení citlivá, neboť u ní byl zaznamenán nárůst podílu buněk v S fázi. Dle naší hypotézy hydrokortizon znesnadňuje průchod S fázi a brzdí zde buňky déle, než je běžné u buněk GC populace bez aplikace hydrokortizonu. Podíl buněk v S fázi je pak tudíž oproti ostatním fázím ještě vyšší, ačkoli to neznamená, že by tyto byly nutně zkráceny. Dá se proto předpokládat, že i podíl buněk v M fázi je v takovém případě proporcčně menší, přičemž tento fakt je konzistentní i s výsledky dřívějších pokusů.

Tento model účinku hydrokortizonu na rychle se dělící populaci by vzhledem k výše uvedeným skutečnostem vysvětlil i další nesrovnalost, která vyvstala s popřením naší původní hypotézy. Podle ní jsme očekávali hromadění buněk v G₂ fázi cyklu, neboť po uvolnění hydrokortizonu ze systému stoupl již za 45 minut výrazně podíl buněk v M fázi. Vyvstává zde tedy otázka, jak mohly v tehdejšímu pokusu (Peterka et al., 1997) analyzované buňky po odstranění hydrokortizonového bloku tak rychle dospět do M fáze, byly-li zbrzděny v S fázi. Doba trvání G₂ fáze, kterou by ještě musely projít, trvá u standardně se dělících buněk v řádu hodin (konkrétně výše citovaný Minkoff uvádí 2,5

hodiny), zatímco u výše popsaného modelu dospěly do M fáze již za méně než hodinu. Častá vlastnost rychle se dělících buněk, a sice výše uvedená schopnost G_2 fázi rapidně zkrátit až téměř přeskočit, nám v tomto ohledu poskytuje možné vysvětlení.

Další zaznamenaná změna kvalitativní povahy hydrokortizonované populace oproti kontrolní, a sice vyšší buněčná granularita, se dá logicky očekávat. Při desetiprocentním navýšení podílu buněk v S fázi, kdy jsou proti G_1 fázi cyklu buňky obecně granulárnější (přičemž G_2/M fáze má v této specifické populaci relativně malý podíl) musí stoupnout i celková průměrná granularita buněk.

5.2.4. Propojení získaných výsledků s dřívějšími studiemi

Co se týče výsledků ve studii Peterka et al., 1997, musela být v rámci výběžku provedena analýza právě námi nalezených specifických buněk GC populace (resp. oblasti, která je ve vysoké míře obsahuje). Pro metodickou náročnost byla v této práci opravdu analyzována pouze menší oblast výběžku (jak již bylo uvedeno výše), která byla vybrána pro svou vhodnou pozici naproti výběžku maxilárnímu, shodující se zároveň s dříve určenou oblastí postranního proliferačního centra. S ohledem na fakt, že tato centra byla určována jako místa se zvýšenou proliferací, tedy jako oblasti s výskytem rychleji cyklujících buněk, nabídla se zde možnost, zda námi hledané citlivé buňky nejsou právě populací buněk uvnitř proliferačních center. Dalším spojujícím faktem bylo, že v této studii z roku 1997 byla ve zkoumané oblasti po aplikaci hydrokortizonu také nalezena zvýšená proporce buněk v S fázi oproti kontrole. Vzhledem k tomu, že pro detekci této fáze bylo tehdy použito BrdU, které mělo samo o sobě i v interakci s hydrokortizonem vliv na cyklus (viz 4.4.1.), však nemohl být tento výsledek brán jako jistý účinek hydrokortizonu. V souvislosti s našimi současnými výsledky je ale pravděpodobné, že tento efekt s aplikací hydrokortizonu opravdu souvisel. Pro možnost ověření naší hypotézy ohledně distribuce buněk GC populace v rámci výběžku jsme se proto rozhodli dále zkoumat histologický kontext na řezech.

5.2.5. Rozbor výsledků imunohistochemie

Imunofluorescenční barvení na řezech ukázalo, že v oblasti frontonasálního výběžku lze skutečně pozorovat místa se zvýšeným výskytem S fáze (S-oblasti). Navíc jejich umístění vykazovalo vysokou korelaci s pozicemi dříve definovaných proliferačních center. Sledované oblasti se vyznačovaly poměrně velkou dynamikou – byly patrné změny umístění a intenzity v závislosti na vývoji, např. méně patrný až téměř úplně nezaznamatelný výskyt postranních center u části kontrol, které byly logicky vývojově dál než bržděné hydrokortizonované vzorky. Dále bylo na všech řezech patrné vyznívání výskytu S-oblastí směrem do hlubších vrstev. Pro analýzu byly proto vybrány vždy řezy s dobře viditelnými centry a na ekvivalentních oblastech sousedních řezů byl hodnocen podíl buněk v mitóze pomocí dobře kvantifikovatelného imunofluorescenčního barvení pomocí protilátky pH3 značící selektivně buňky v M fázi. U kontrolních vzorků je z těchto důvodů celkový počet analyzovaných buněk středové S-oblasti nižší než u hydrokortizonovaných – část vzorků již nemohla být pro slabou patrnost výskytu S-oblasti do studie zavzata. Problematika dynamických proměn a přemísťování S-oblastí (resp. pravděpodobných proliferačních center) je dalším námětem pro podrobnější výzkum, neboť mapování po 24 hodinách, které bylo provedeno v rámci studie Peterka a Jelínek, 1983 by zasloužilo podrobnější rozpracování a zhodnocení.

Následné vyhodnocení podílu buněk v M fázi v rámci center a mimo ně potvrdila, že rozdíly jsou pouze mezi S-oblastmi aplikovaných versus kontrolních vzorků, nikoli mezi zvolenými oblastmi bez zvýšeného výskytu S fáze. Tento poznatek tak propojil výsledky z průtokového cytometru i výsledky dřívějších pokusů, neboť jsme našli snížení mitotického indexu hydrokortizonovaných vzorků uvnitř proliferačního centra, které zároveň vykazovalo kvalitativně pozorovatelný zvýšený poměr buněk v S fázi. Oproti studii z roku 1997 jsme však zaznamenali jisté rozdíly – tehdy byly změny v postranním centru vyhodnocené jako signifikantní, přičemž u nás byl také zaznamenán pokles podílu buněk v M fázi, avšak nikoli signifikantní. Markantní rozdíl byl naopak nalezen ve středovém centru, které tehdy analyzováno nebylo. Vysvětlením může být výše zmíněná vysoká dynamika center - změny mohou souviset s rozdílem několika hodin ve vývoji v souvislosti s načasováním zpracování a fixace materiálu, či také s rozdíly použitého embryonálního materiálu jako takového (možná mírně odlišná rychlost vývoje). Je pravděpodobné, že náš nynější materiál již mohl být při odběru vývojově dál směrem

k šestému embryonálnímu dni (ED 6), čemuž by odpovídala vyšší intenzita středové S-oblasti i postupné mizení postranních center (na ED 6 je již přítomno pouze středové proliferační centrum, viz Obr.7). Na možnost takového rozdílu mezi skupinami použitých zpracovaných vzorků poukazuje i fakt, že hmotnosti zárodků ve studii určující umístění proliferačních center se na ED 5 pohybovaly průměrně kolem 150 mg, zatímco námi zpracované vzorky byly při odběru o 50mg těžší.

5.3. Rozdíly v senzitivitě mezi epitelem a mezenchymem

Určité parametry senzitivní GC populace jsme odhalily již ze stávajících dat. Ve studii Peterka et al., 1997, na kterou jsme primárně navazovali, byl efekt hydrokortizonu pozorován pouze v populaci mezenchymových buněk, což potvrdil i náš model S-oblastí, které byly zřetelně oddělené od epitelu. Nabízí se zde proto otázka, zda právě tato vlastnost není jedním z rysů buněk citlivých na hydrokortizon. V jiných studiích byl však v rámci variability pozorovaných změn po hydrokortizonu zaznamenán i významný efekt na buňky epitelu, velmi často v oblastech trávicího traktu (Gama et al., 2000; Lu et al., 2011).

Opět se zde tak potvrzuje, že citlivost na hydrokortizon není určována podle jednoduchých obecných pravidel (jako například histologický kontext buňky - epitel x mezenchym), nýbrž nastavením mnoha konkrétních vlastností. Jednou z podstatných vlastností by mohla být výše zmiňovaná rychlost dělení, která dobře koreluje i s citlivostí buněk trávicího traktu, který je modelem vysoce aktivně se dělícího systému (Savin et al., 2011).

Při diskuzi o této problematice nelze přehlédnout také důležitý systém epitel-mezenchymových interakcí. Ty hrají při utváření orofaciální oblasti velmi významnou roli zejména v podporování buněčné proliferace a migrace buněk neurální lišty, přičemž epitel zde tyto děje indukuje ve prospěch růstu a formování populace mezenchymu (Richman a Tickle, 1989). Kandidátní molekulou zprostředkovávající tyto děje je signální protein Shh, jenž je zde produkován epitelem. Jeho dysregulace proto může vést k poruchám vývoje orofaciální oblasti (Young et al., 2000). Efekt snížení exprese Shh byl pozorován v souvislosti s jiným teratogenem způsobujícím závažné orofaciální vady včetně rozštěpu rtu – vitamínem A (Helms et al., 1997).

Nabízí se zde proto otázka, zda hydrokortizon nemůže primárně ovlivňovat epitelové buňky a obdobným mechanismem jako vitamin A pak na dálku regulovat buňky mezenchymu. Tato možnost se však nejeví jako příliš pravděpodobná, neboť povaha působení hydrokortizonu a vitamínu A je rozdílná. Vitamin A patří mezi morfogeny, jeho vliv má tudíž vysokou potenci pro zásadní diferenciační změny (ve kterých jsou často zapojeny látky typu Shh), zatímco hydrokortizon působí na buňky lokálně a cíleně vyvoláváním změn v jejich fyziologii. U buněk patrových lišt se navíc glukokortikoidové receptory vyskytují převážně v mezenchymu a nikoli v epitelu (Pratt, 1985). Lze

předpokládat, že v sousedící oblasti frontonasálního výběžku by mohlo toto pravidlo platit také, což by vylučovalo možnost epitel-mezenchymové interakce.

I z tohoto ohledu je proto v zájmu komplexního pochopení buněčných pochodů žádoucí podrobnější studium orofaciální oblasti, zejména v souvislosti s přesnou lokalizací glukokortikoidových receptorů (viz 5.5.2.).

5.4. Apoptóza

Ačkoli jsme v našem systému na podkladě jeho vratné podstaty zvýšený výskyt apoptózy po aplikaci hydrokortizonu nepředpokládali, bylo nutné tuto naši hypotézu ověřit. Jak již bylo zmíněno v kapitole 1.4.4., ve většině případů hydrokortizon spíše nějakým způsobem zpomaluje průchod buněčným cyklem, jsou však známy i případy, kdy souvisí se zvýšenou mírou programované buněčné smrti. U spojování patrových plotének byl po hydrokortizonu sledován naopak pokles výskytu apoptózy, která je v této oblasti během spojování známým jevem (Goldman, 1981). Autoři to připisují přímo hydrokortizonu, je však možné, že se jedná pouze o vedlejší jev jeho negativního efektu na růst plotének a opoždění jejich kontaktu. Každopádně z těchto důvodů nebylo možné předem roli tohoto děje v etiopatogenezi rozštěpu způsobeného hydrokortizonem bez testování zcela vyloučit.

Výsledky potvrdily naši hypotézu, neboť u všech hydrokortizonovaných vzorků se apoptotické buňky vyskytovaly pouze řídce, difuzně a zcela nahodile, stejně jako u vzorků kontrolních. Výjimku z tohoto vzoru naopak tvořily některé řezy kontrolních vzorků z oblastí hlouběji pod povrchem výběžku (fronto-mediálním směrem), kde byly zaznamenány menší ostrůvky apoptotických buněk. Tento úkaz patrně souvisí v rámci fyziologického utváření orofaciální oblasti s počínajícím procesem spojování frontonasálních výběžků s výběžky maxilárními, který byl u těchto hlubších řezů již patrný. Toto téma s náplní naší práce souviselo pouze okrajově, podrobnější zkoumání proto nebylo dále provedeno. Jedná se nicméně o velice pozoruhodný a stále málo probádaný děj, jehož další zákonitosti by měly být na bázi této pilotní studie analyzovány podrobněji.

5.5. Etiopatogeneze rozštěpu rtu v souvislosti se získanými výsledky

5.5.1. Malá velikost senzitivní populace buněk

Na první pohled překvapivým zjištěním vycházejícím z našich výsledků je fakt, že tak markantní a relativně závažnou vadu jako rozštěp rtu způsobuje ovlivnění tak malé populace buněk. Zvážíme-li tento fenomén v širším kontextu, jedná se evidentně o velice citlivou oblast.

Podívejme se podrobněji kupříkladu na myší model – obecně se ve vztahu k rozštěpu rtu nepoužívá, neboť se tato vada u myši běžně nevyskytuje. Existují však určité mutantní kmeny, u kterých je možné vznik rozštěpu rtu indukovat teratogenem, či se u nich dokonce v různé míře vyskytují rozštěpy spontánní. Do této skupiny patří např. A/- kmeny (A/J, A/WySn) či kmen CL/Fr (Melnick et al., 1981; Juriloff, 1982; Millicovsky et al., 1982; Gritli-Linde, 2008). Při objasňování jejich susceptibility jsou zkoumány možné příčiny na podkladě genotypu (Juriloff et al., 2001; Erickson et al., 2008; Juriloff a Harris, 2008). Pozoruhodný je však také rozbor na úrovni fenotypu - co se týče morfologie obličejové oblasti, vykazují se k rozštěpům rtu náchylné kmeny především plošším středním obličejem, jehož rozměry jsou celkově podprůměrné (Wang a Diewert, 1992; Young et al., 2007; Parsons et al., 2008).

U lidí nalzáme k tomuto pravidlu jasnou paralelu – na podkladě porovnání a propojení mnoha studií z celého světa vyšlo najevo, že nejvíce náchylné k obličejovým rozštěpům jsou populace s asijskými (mongoloidními) rysy, tedy celkově plošším obličejovým habitusem, zatímco lidé negroidních populací (prominující obličejové rysy) trpí na rozštěpy zhruba o polovinu méně. Europoidní, bělošské populace leží v incidenci rozštěpů mezi oběma výše jmenovanými (Millard a McNeill, 1965; Vanderas, 1987; morfometrie - Burris a Harris, 2000; Farkas et al., 2005). Morfometrické markery pro plošší tvar obličeje byly navíc odhaleny také u nepostížených členů rodin se zátěží výskytu obličejových rozštěpů (Figalová a Šmahel, 1984; Ward et al., 1989).

Tato data naznačují, že v orofaciální oblasti je u člověka a dalších senzitivních druhů či kmenů evidentně velice tenká hranice mezi vznikem vady a normálním vývojem. Mohli bychom zde odvodit souvislost, že čím prominentnější oblast střední části obličeje (resp. prominence čumáku u myši), tím větší redundance buněčného materiálu na podkladě genetické predispozice a nižší citlivost na teratogenní vlivy. Pohybujeme se zde tedy na

prahu teratogeneze, kdy menší odchylky v rámci jednoho druhu podstatně mění potřebnou dávku akumulovaných negativních vnějších vlivů nutných pro vznik vady.

Z tohoto pohledu se tedy fakt, že nejsou zasaženy všechny buňky morfologicky postižené oblasti, nejeví až tak překvapivým. Je zde evidentně balancováno na tenké hranici, kde může chybění relativně malého počtu buněk způsobené lokálním snížením proliferace hrát významnou roli. Rozštěpy by tak mohly být z vývojového hlediska jakousi daní za změny naší lebky během encefalizace, kdy docházelo k postupné redukci oblasti splanchnokrania, jako jsou třeba obtížné porody daní za bipedii. Na základě těchto poznatků bychom tedy mohli formulovat hypotézu, že například Lucy a její příbuzní na rozštěpy rtu díky nižším predispozicím nijak významně netrpěli.

5.5.2. Senzitivita buněk na hydrokortizon v širším vývojovém kontextu

Molekulární podstata senzitivity nalezených buněk oproti zbytku je spolu s popisem hydrokortizonem vyvolené akce po aktivaci receptoru na úrovni DNA stěžejním bodem pro další výzkumy. Je nutné prověřit její možnou korelaci s distribucí glukokortikoidových receptorů, která se nabízí jako primární vysvětlení. Opačný výsledek by naznačil výše zmíněnou regulaci na dálku, kterou bychom však u tohoto systému spíše nepředpokládali. Velice zajímavé však mohou být i výsledky hledání obdobných efektů v kontextu celého organismu, neboť není pravděpodobné, že tak konzervovaný systém jako hydrokortizon a jeho receptor, by byl v rámci organismu aktivován náhodně.

Vzpomeňme druhou typickou vadu vyskytující se u kuřecího modelu - rozštěp stěny břišní. Pro tento druh je propojení valů stěny břišní evidentně druhým citlivým systémem, avšak jinde (např. u lidí či myši) tento efekt po působení hydrokortizonu pozorován není. Je možné, že u kuřete se i tato oblast vyznačuje hraničním množstvím pro spojení potřebného buněčného materiálu, jehož byt' relativně malá redukce má za následek selhání celého procesu.

Lze se tedy domnívat, že určité oblasti buněk na různých místech organismu jsou na hydrokortizon a další kortikoidy v určitém čase citlivé, a to patrně za účelem regulace jejich počtu. Proces brždění proliferace na úrovni DNA může být podle konkrétního buněčného kontextu různý, avšak dopad na buněčnou populaci je obdobný.

Již dříve si vědci povšimli, že buňky reagují na hydrokortizon selektivně. Například na modelu sleziny zpomaloval pouze rychle cyklující lymfocyty ve dřeni a nikoli pomalu cyklující buňky epitelu kůry (Laguhev a Golobova, 1974). Jeho efektu na rychle se dělicí buňky se využívá také v chemoterapii pro zpomalení nádorových buněk (Keith, 2008; Sakayama et al., 2008) (v tomto případě je však nutné rozlišovat jednotlivé typy nádorů, neboť u některých naopak potlačuje expresi tumor supresorových genů a má tak na nádor naopak povzbuzující vliv – Schechter a Feldman, 1977; Antonova a Mueller, 2008). Z těchto údajů i našich výsledků vyplývá, že citlivost populace rychle se dělicích buněk na působení hydrokortizonu může mít obecnější a univerzálnější charakter.

Jedním ze známých efektů působení hydrokortizonu je růstová retardace plodu (viz Úvod). Propojíme-li tento fakt s výše popsány mi skutečnosti, vyvstává nám teorie účinku hydrokortizonu fungujícího jako kontrola hmotnosti plodu v reakci na vnější podmínky ze strany matky. Jakožto stresový hormon se při této reakci vyplavuje v těle matky a jeho zvýšené hladiny tak redukuje velikost plodu regulací proliferace vhodných buněčných populací. U živočichů rozmnožujících se produkcí vajíček se tento proces může zdát nemožným, ale obdobného efektu by v tomto případě mohlo být dosahováno vložením maternálních hormonů do vejce již při kladení na základě aktuálních podmínek. U ryb byla schopnost přenášení hormonů do kladených vajíček jasně potvrzena (Eriksen et al., 2006; Mingist et al., 2007; Gagliano a McCormick, 2009). U ptáků to sice některé studie popírají (Rettenbacher et al., 2009), ale v mnohých je vystopována spojitost mezi stresem, zvýšeným výskytem kortikoidů ve vejci a dokonce i následnou menší velikostí vylíhnutých potomků (Hayward a Wingfield, 2004; Henriksen et al., 2011). Data z naší laboratoře, kde jsou odebrané zárodky vždy váženy, spojitost mezi hydrokortizonem a růstovou retardací také potvrzují – míra růstové retardace vykazuje závislost na dávce a především je patrná i u zárodků, které jinak po aplikaci hydrokortizonu nevykazovaly žádnou rozštěpovou vadu, což popírá možnost, že by zárodky měly menší hmotnost pouze z důvodu, že jsou postižené.

Propojením nashromážděných výše uvedených poznatků je tedy možné vyvodit teorii, že hydrokortizon jakožto stresový hormon reguluje za účelem kontroly růstu organismu populace rychle se dělicích buněk, které jsou v souvislosti s tímto dějem na rozdíl od ostatních na jeho působení citlivé. Výběr takovýchto populací buněk je výhodný, neboť právě pomocí rychle se dělicích buněk může být jeho vliv nejefektivnější. Přidáním vysokých dávek kortikoidů vnějšího původu a možnou kombinací s genetickými

predispozicemi, stresem či dalšími teratogeny tak může v některých citlivých systémech specifických pro každý konkrétní druh, jako je např. oblast srůstání obličejových výběžků u kuřete či člověka, dojít ke vzniku vady.

5.6. Směr dalšího výzkumu a uplatnění výsledků v klinické praxi

V naší studii se ukázalo, že hydrokortizon způsobuje selektivní zbrždění v S fázi cyklu u buněk specifické, patrně rychle cyklující populace, které jsou v rámci výběžku distribuovány v místech shodných s tzv. proliferačními centry. Zákonitosti a podmínky tohoto procesu by měly být pro komplexnější pochopení dále hlouběji studovány. Primární otázkou je distribuce glukokortikoidových receptorů v oblasti frontonasálního výběžku a její možná korelace s oblastmi proliferačních center. Dalším dějem, jenž zaslouží pozornost, je vysoká proměnlivost těchto center v čase. Podrobné zmapování jejich dynamiky ve vztahu ke stádiím vývoje by bylo spolu s poznatky o dalších parametrech na buněčné úrovni velice cennou informací. Co se týče přímo vlivu hydrokortizonu, je otázkou pro další výzkum, jakým přesným mechanismem na úrovni změn DNA ve frontonasální oblasti během kumulace buněk v S fázi působí. Zvláštním pochodem zasluhujícím podrobnější analýzu je také proces revitalizace při záchranném afektu natržení amniového vaku.

Tyto současné i budoucí výsledky, mohou napomoci pochopení složitého systému účinku hydrokortizonu a dalších kortikoidů při vzniku rozštěpů. Získané znalosti tak mohou v budoucnu najít uplatnění i v klinické praxi, například v případech, kdy je během těhotenství nutné kortikoidy předepisovat (závažné kožní potíže) či při IVF, kdy jsou kortikoidy v současné době ve velké míře používány.

Možnost selektivního bránění negativnímu vlivu v ohrožené frontonasální oblasti však vyžaduje velice podrobné znalosti tamních buněčných pochodů a jejich změn po vystavení působení hydrokortizonu. Již více let jsou zkoumány látky, které by fungovaly jako antagonisté kortikoidů. Pozitivní výsledky vykazují například některé vitaminy řady B (Yoneda a Pratt, 1982; He et al., 2010), do klinické praxe se však v této konkrétní souvislosti zatím nedostaly. Podle známých studií fungují na bázi snižování exprese vyvolané aktivovaným glukokortikoidovým receptorem, přičemž se nejedná o kompetici o receptor jako takovou, nýbrž o variaci podmínek (interakce s transkripčními faktory), za kterých tento děj probíhá (Allgood et al., 1990; Allgood et al., 1993). Příмым antagonistou hydrokortizonu, jenž s ním kompetuje o receptor, je v praxi k tomuto účelu užívaný mifepriston (RU-486), který však nemůže být v těhotenství indikován pro své známé abortivní účinky (Bourgeois et al., 1984). Všechny výše zmíněné látky navíc svou příliš obecnou povahou interakce na úrovni receptoru nejsou schopny selektivního zásahu.

Odhalíme-li však jedinečnost podstaty účinku hydrokortizonu v námi studované oblasti, přičemž víme a naše studie to potvrdila, jak různorodé efekty hydrokortizonu na buněčný cyklus mohou být, může se nám v budoucnu podařit tento negativní efekt zvrátit i při současně fungující nutné medikaci. Výsledky získané v základním výzkumu tak mohou tímto způsobem vedle informací o výskytu a potenci různých teratogenů přispět k dosažení snížení počtu vznikajících rozených vad, což stále zůstává hlavním a nejdůležitějším cílem teratologie.

6. Závěry

1a. V této práci jsme pomocí průtokové cytometrie vyvrátily naši původní hypotézu, že efektem působení hydrokortizonu na buňky frontonasálního výběžku je jejich zbrzdění a hromadění v G₂ fázi. Měření ukázala překvapivý fakt, že většina buněk frontonasálního výběžku nejeví po aplikaci hydrokortizonu žádné patrné změny v buněčném cyklu oproti kontrolním vzorkům. Nalezli jsme však minoritní senzitivní populaci buněk s vysokou granularitou a specifickým buněčným cyklem. Tato populace se obecně vyznačovala vysokým podílem buněk v S fázi, který byl působením hydrokortizonu ještě navýšen. Z toho lze vyvozovat, že hydrokortizon v této populaci způsobuje zbrzdění buněk v S fázi buněčného cyklu.

1b. Pomocí imunofluorescenčního barvení se nám podařilo detekovat tuto senzitivní populaci také na řezech ve formě výrazné středové a dvou menších postranních na S fázi bohatých oblastí. Pozičně tyto oblasti odpovídaly již dříve určeným proliferačním centrům frontonasálního výběžku. Určení podílu buněk v M fázi ukázalo, že po aplikaci hydrokortizonu dochází ve středovém centru k signifikantnímu poklesu mitotického indexu oproti kontrole. Tento jev může být dobře vysvětlen navýšením podílu buněk v S fázi, které odhalila cytometrická analýza. S těmito výsledky byl konzistentní i fakt, že oblasti mimo na S fázi bohatá centra nevykazovaly při porovnání mezi kontrolními a hydrokortizonovanými vzorky žádné rozdíly.

2. Vizualizace apoptózy metodou TUNEL neodhalila žádná apoptotická centra na řezech frontonasálních výběžků po aplikaci hydrokortizonu, přičemž hustota ojediněle se vyskytujících pozitivních buněk byla stejná jako u kontrolních vzorků. Naše hypotéza, že negativní efekt hydrokortizonu v této oblasti nezahrnuje indukci apoptózy, tak byla potvrzena.

7. Seznam použité literatury

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Science (4th edition), pp. 1-1463.
- Allgood VE, Powell-Oliver FE, Cidlowski JA. 1990. Vitamin B6 influences glucocorticoid receptor-dependent gene expression. *J Biol Chem* 265:12424-12433.
- Allgood VE, Oakley RH, Cidlowski JA. 1993. Modulation by vitamin B6 of glucocorticoid receptor-mediated gene expression requires transcription factors in addition to the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 268:20870-20876.
- Ando T, Suganuma N, Furuhashi M, Asada Y, Kondo I, Tomoda Y. 1996. Successful glucocorticoid treatment for patients with abnormal autoimmunity on in vitro fertilization and embryo transfer. *J Assist Reprod Genet* 13:776-781.
- Antonova L, Mueller CR. 2008. Hydrocortisone down-regulates the tumor suppressor gene BRCA1 in mammary cells: a possible molecular link between stress and breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 47:341-352.
- Bamberger CM, Schulte HM, Chrousos GP. 1996. Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocr Rev* 17:245–261.
- Becker KA, Ghule PN, Therrien JA, Lian JB, Stein JL, van Wijnen AJ, Stein GS. 2006. Self-renewal of human embryonic stem cells is supported by a shortened G1 cell cycle phase. *J Cell Physiol* 209:883-893.
- Beppu T, Ishida Y, Arai H, Wada T, Uesugi N, Sasaki K. 1994. Identification of S-phase cells with PC10 antibody to proliferating cell nuclear antigen (PCNA) by flow cytometric analysis. *J Histochem Cytochem* 42:1177-1782.
- Boomsma CM, Keay SD, Macklon NS. 2007. Peri-implantation glucocorticoid administration for assisted reproductive technology cycles. *Cochrane Database Syst Rev* 24:CD005996.
- Bourgeois S, Pfahl M, Baulieu EE. 1984. DNA binding properties of glucocorticosteroid receptors bound to the steroid antagonist RU-486. *EMBO J* 3:751–755.
- Bravo R, MacDonald-Bravo H. 1987. Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. *J. Cell Biol* 105: 1549-1554.

- Burris BG, Harris EF. 2000. Maxillary arch size and shape in American blacks and whites. *Angle Orthod* 70:297-302.
- Cai X, Ye T, Liu C, Lu W, Lu M, Zhang J, Wang M, Cao P. 2011. Luteolin induced G2 phase cell cycle arrest and apoptosis on non-small cell lung cancer cells. *Toxicol In Vitro* 25:1385-1391.
- Carmichael SL, Shaw GM. 1999. Maternal corticosteroid use and risk of selected congenital anomalies. *Am J Med Genet* 86:242-244.
- Cohlan SQ. 1953. Excessive intakes of vitamin A as a cause of congenital anomalies in the rat. *Science* 117: 535–536.
- Courtney KD, Moore JA. 1971. Teratology studies with 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol Appl Pharmacol* 20:396-403.
- De Souza SW, Adlard BP. 1973. Growth of suckling rats after treatment with dexamethasone or cortisol. Implications for steroid therapy in human infants. *Arch Dis Child* 48:519-522.
- Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC. 2011. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet* 12:167-178.
- Dostál M. 1971. Morphogenesis of cleft palate induced by exogenous factors. 3. Intraamniotic application of hydrocortisone in mice. *Teratology* 4:63-68.
- Duma D, Jewell CM, Cidlowski JA. 2006. Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification. *J Steroid Biochem Mol Biol* 102:11–21.
- Edwards MJ, Agho K, Attia J, Diaz P, Hayes T, Illingworth A, Roddick LG. 2003. Case-control study of cleft lip or palate after maternal use of topical corticosteroids during pregnancy. *Am J Med Genet A* 120:459-463.
- Eigler N, Saccà L, Sherwin RS. 1979. Synergistic interactions of physiologic increments of glucagon, epinephrine, and cortisol in the dog: a model for stress-induced hyperglycemia. *J Clin Invest* 63:114-123.
- Eigsti OJ, Dustin P Jr, Gay-Winn N. 1949. On the discovery of the action of colchicine on mitosis in 1889. *Science* 110:692.
- Ellis L, Cole-Harding S. 2001. The effects of prenatal stress, and of prenatal alcohol and nicotine exposure, on human sexual orientation. *Physiol Behav* 74:213-226.

- Erickson RP, Cao W, Acuña DK, Strnatka DW, Hunter RJ, Chau BT, Wakefield LV, Sim E, McQueen CA. 2008. Confirmation of the role of N-acetyltransferase 2 in teratogen-induced cleft palate using transgenics and knockouts. *Mol Reprod Dev* 75:1071-1076.
- Eriksen MS, Bakken M, Espmark Å, Braastad BO, Salte R. 2006. Prespawning stress in farmed Atlantic salmon *Salmo salar*: maternal cortisol exposure and hyperthermia during embryonic development affect offspring survival, growth and incidence of malformations. *J Fish Biol* 69:114–129.
- Fagerlund UH. 1967. Plasma cortisol concentration in relation to stress in adult sockeye salmon during the freshwater stages of their life cycle. *Gen Comp Endocrinol* 8:197-207.
- Farkas LG, Katic MJ, Forrest CR, Alt KW, Bagic I, Baltadjiev G, Cunha E, Cvicelová M, Davies S, Erasmus I, Gillett-Netting R, Hajnis K, Kemkes-Grottenthaler A, Khomyakova I, Kumi A, Kgampe JS, Kayo-daigo N, Le T, Malinowski A, Negasheva M, Manolis S, Ogetürk M, Parvizrad R, Rösing F, Sahu P, Sforza C, Sivkov S, Sultanova N, Tomazo-Ravnik T, Tóth G, Uzun A, Yahia E. 2005. International anthropometric study of facial morphology in various ethnic groups/races. *J Craniofac Surg* 16:615-646.
- Fenske M. 1997. Role of cortisol in the ACTH-induced suppression of testicular steroidogenesis in guinea pigs. *J Endocrinol* 154:407-414.
- Ferguson MWJ. 1991. The orofacial region. In: *Textbook of fetal and perinatal pathology*. Wigglesworth JS, Singer DB, editors. Oxford: Blackwell, pp. 843–880.
- Figalová P, Šmahel Z. 1974. Cephalometric study of families with clefts. *Acta Chir Plast* 16:247-255.
- Fraser FC, Fainstat TD. 1951. Production of congenital defects in the off-spring of pregnant mice treated with cortisone; progress report. *Pediatrics* 8:527-533.
- Fritz H, Hess R. 1971. Effects of cyclophosphamide on embryonic development in the rabbit. *Agents Actions* 2:83-86.
- Funakoshi Y, Shiono H, Inoue M, Kadota Y, Ohta M, Matsuda H, Okumura M, Eimoto T. 2005. Glucocorticoids induce G1 cell cycle arrest in human neoplastic thymic epithelial cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 131:314-322.
- Gagliano M, McCormick MI. 2009. Hormonally mediated maternal effects shape offspring survival potential in stressful environments. *Oecologia* 160:657-665.

- Gama P, Goldfeder EM, de Moraes JC, Alvares EP. 2000. Cell proliferation and death in the gastric epithelium of developing rats after glucocorticoid treatments. *Anat Rec* 260:213-221.
- Geoffroy Saint-Hilaire I. 1832. Histoire générale et particulière des anomalies de l'organisation chez l'homme et les animaux. Paris: J.-B. Baillière, pp. 1-746.
- Gigant B, Cormier A, Dorléans A, Ravelli RBG, Knossow M. 2009. Microtubule-destabilizing agents: Structural and mechanistic insights from the interaction of colchicine and vinblastine with tubulin. *Top Curr Chem* 286:259-278.
- Glucksmann A. 1951. Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol Rev* 26:59-86. *Proc*
- Goldman AS, Herold R, Piddington R. 1981. Inhibition of programmed cell death in the fetal palate by cortisol. *Soc Exp Biol Med* 166:418-424.
- Gottlicher M, Heck S, Herrlich P. 1998. Transcriptional crosstalk, the second mode of steroid hormone receptor action. *J Mol Med* 76:480-489.
- Greenwood FC, Landon J, Stamp TC. 1966. The plasma sugar, free fatty acid, cortisol, and growth hormone response to insulin. I. In control subjects. *J Clin Invest* 45:429-436.
- Gregg NM. 1941. Congenital cataract following German measles in the mother. *Aust NZ J Ophthalmol* 3:35-46.
- Gregor V, Šípek A. 2009. Efektivita prenatalní diagnostiky v České republice. *Actual Gyn* 1:25-29.
- Gritli-Linde A. 2008. The etiopathogenesis of cleft lip and cleft palate: usefulness and caveats of mouse models. *Curr Top Dev Biol* 84:37-138.
- Hamburger V, Hamilton HL. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* 88:49-92.
- Hauser J, Knapman A, Zürcher NR, Pilloud S, Maier C, Diaz-Heijtz R, Forssberg H, Dettling A, Feldon J, Pryce CR. 2008. Effects of prenatal dexamethasone treatment on physical growth, pituitary-adrenal hormones, and performance of motor, motivational, and cognitive tasks in juvenile and adolescent common marmoset monkeys. *Endocrinology* 149:6343-6355.
- Hayward LS, Wingfield JC. 2004. Maternal corticosterone is transferred to avian yolk and may alter offspring growth and adult phenotype. *Gen Comp Endocrinol* 135:365-371.
- He W, Meng T, Lu SJ, Zheng Q, Li CH, Wu M, Shi B. 2010. Vitamin B12 counteracts dexamethasone-induced proliferation and apoptosis during key periods of palatogenesis in mice. *Ann Plast Surg* 64:466-470.

- Helms JA, Kim CH, Hu D, Minkoff R, Thaller C, Eichele G. 1997. Sonic hedgehog participates in craniofacial morphogenesis and is down-regulated by teratogenic doses of retinoic acid. *Dev Biol* 187:25-35.
- Hemm RD, Arslanoglou L, Pollock JJ. 1977. Cleft palate following prenatal food restriction in mice: association with elevated maternal corticosteroids. *Teratology* 15:243-248.
- Henriksen R, Rettenbacher S, Groothuis TG. 2011. Prenatal stress in birds: pathways, effects, function and perspectives. *Neurosci Biobehav Rev* 35:1484-1501.
- Hirobe T. 1996. Hydrocortisone is involved in regulating the proliferation and differentiation of mouse epidermal melanoblasts in serum-free culture in the presence of keratinocytes. *Eur J Cell Biol* 71:387-394.
- Holstein TW, David CN. 1990. Cell cycle length, cell size, and proliferation rate in hydra stem cells. *Dev Biol* 142:392-400.
- Hovořáková M, Lesot H, Peterková R, Peterka M. 2006. Origin of the deciduous upper laterál incisor and its clinical aspects. *J Dent Res* 85:167-171.
- Hviid A, Mølgaard-Nielsen D. 2011. Corticosteroid use during pregnancy and risk of orofacial clefts. *CMAJ* 183:796-804.
- Cha HH, Cram EJ, Wang EC, Huang AJ, Kasler HG, Firestone GL. 1998. Glucocorticoids stimulate p21 gene expression by targeting multiple transcriptional elements within a steroid responsive region of the p21waf1/cip1 promoter in rat hepatoma cells. *J Biol Chem* 273:1998-2007.
- Cho JH, Lee JG, Yang YI, Kim JH, Ahn JH, Baek NI, Lee KT, Choi JH. 2011. Eupatilin, a dietary flavonoid, induces G2/M cell cycle arrest in human endometrial cancer cells. *Food Chem Toxicol* 49:1737-1744.
- Jan YN, Jan LY. 1998. Asymmetric cell division. *Nature* 392:775-778.
- Jedlička V. 1954. Embryopathie a některé problémy pokusné teratologie (jejich význam pro lékařskou praxi). Praha: Státní zdravotnické nakladatelství, pp. 1-64.
- Jelínek R, Peterka M. 1977. The role of the mandible in mouse palatal development revisited. *Cleft Palate J* 14:211-221.
- Jelínek R, Rychter Z, Peterka M. 1979. Method for testing of embryotoxicity on chicken embryo. United States Patent 4153676.
- Jelínek R, Pavlík A, Peterka M. 1983. Glucocorticoid receptor-mediated teratogenesis in the chick embryo. *Teratog Carcinog Mutagen* 3:1-7.

- Jensen BL, Kreiborg S, Dahl E, Fogh-Andersen P. 1988. Cleft lip and palate in Denmark, 1976-1981: epidemiology, variability, and early somatic development. *Cleft Palate J* 25:258-269.
- Jobe AH, Wada N, Berry LM, Ikegami M, Ervin MG. 1998. Single and repetitive glucocorticoid exposure reduce fetal growth in sheep. *Am J Obstet Gynecol* 178: 880-885.
- Joe AK, Liu H, Suzui M, Vural ME, Xiao D, Weinstein IB. 2002. Resveratrol induces growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis, and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 8:893-903.
- Jones KL. 1997. *Smith's Recognizable Patterns of Human Malformation*. Philadelphia: WB Saunders, pp. 1-954.
- Juriloff DM. 1982. Differences in frequency of cleft lip among the A strains of mice. *Teratology* 25:361-368.
- Juriloff DM, Harris MJ, Brown CJ. 2001. Unravelling the complex genetics of cleft lip in the mouse model. *Mamm Genome* 12:426-435.
- Juriloff DM, Harris MJ. 2008. Mouse genetic models of cleft lip with or without cleft palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 82:63-77.
- Kaufman MH. 1991. New insights into triploidy and tetraploidy, from an analysis of model systems for these conditions. *Hum Reprod* 6:8-16.
- Kaufmann WK, Kaufman DG, Rice JM, Wenk ML. 1981. Reversible inhibition of rat hepatocyte proliferation by hydrocortisone and its effect on cell cycle-dependent hepatocarcinogenesis by N-methyl-N-nitrosourea. *Cancer Res* 41:4653-4660.
- Kasuya M, Sawaki Y, Ohno Y, Ueda M. 2000. Psychological study of cleft palate children with or without cleft lip by kinetic family drawing. *J Craniomaxillofac Surg* 28:373-379.
- Keith BD. 2008. Systematic review of the clinical effect of glucocorticoids on nonhematologic malignancy. *BMC Cancer* 8:84.
- Kino T, Manoli I, Kelkar S, Wang Y, Su YA, Chrousos GP. 2009. Glucocorticoid receptor (GR) has intrinsic, GR-independent transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun* 381:671-675.
- Komiyama J, Nishimura R, Lee HY, Sakumoto R, Tetsuka M, Acosta TJ, Skarzynski DJ, Okuda K. 2008. Cortisol is a suppressor of apoptosis in bovine corpus luteum. *Biol Reprod* 78:888-895.

- Kučera J. 1989. Populační teratologie. Praha: Avicenum, pp. 1-325.
- Laguchev SS, Gololobova MT. 1974. Effect of hydrocortisone on duration of periods of the mitotic cycle in cells with a relatively short or long cycle. *Bull Exp Biol Med* 76:1347-1349.
- Lammer EJ, Chen DT, Hoar RM, Agnish ND, Benke PJ, Braun JT, Curry CJ, Fernhoff PM, Grix AW Jr, Lott IT. 1985. Retinoic acid embryopathy. *N Engl J Med.* 313:837-841.
- Landberg G, Roos G. 1991. Antibodies to proliferating cell nuclear antigen as S-phase probes in flow cytometric cell cycle analysis. *Cancer Res* 51:4570-4574.
- Leite IC, Koifman S. 2009. Oral clefts, consanguinity, parental tobacco and alcohol use: a case-control study in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz Oral Res.* 23:31-37.
- Lenz W, Knapp K. 1962. Foetal malformations due to thalidomide. *Ger Med Mon* 7:253-258.
- Lenz W. 1988. A Short History of Thalidomide Embryopathy. *Teratology* 38:203-215.
- Lin H, Schagat T. 1997. Neuroblasts: a model for the asymmetric division of stem cells. *Trends Genet* 13:33-39.
- Liskay RM. 1977. Absence of a measurable G2 phase in two Chinese hamster cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:1622-1625.
- Loffredo L de C, De Souza JM, Yunes J, Freitas JA, Spiri WC. 1994. Cleft lip and palate: Case control study. *Rev Saude Publica* 28:213-217.
- Lu NZ, Cidlowski JA. 2005. Translational regulatory mechanisms generate Nterminal glucocorticoid receptor isoforms with unique transcriptional target genes. *Mol Cell* 18:331-342.
- Lu L, Li T, Williams G, Petit E, Borowsky M, Walker WA. 2011. Hydrocortisone induces changes in gene expression and differentiation in immature human enterocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300:G425-432.
- Malawista SE, Sato H, Bensch KG. 1968. Vinblastine and griseofulvin reversibly disrupt the living mitotic spindle. *Science* 160:770-772.
- Matějček Z. 1991. Lehké mozkové dysfunkce: možnosti screeningu a prevence. Praha: Knižní podnikatelský klub, pp. 1-104.
- Matsuzaki F. 2000. Asymmetric division of *Drosophila* neural stem cells: a basis for neural diversity. *Curr Opin Neurobiol* 10:38-44.
- McBride WG. 1961. Thalidomide and congenital abnormalities. *The Lancet.* 2:1358.

- McClure HM, Wilk AL, Horigan EA, Pratt RM. 1979. Induction of craniofacial malformations in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) with cyclophosphamide. *Cleft Palate J* 16:248-256.
- Melnick M, Jaskoll T, Slavkin HC. 1981. Corticosteroid-induced cleft lip in mice: a teratologic, topographic, and histologic investigation. *Am J Med Genet* 10:333-350.
- Millard DR Jr, McNeill KA. 1965. The incidence of cleft lip and palate in Jamaica. *Cleft Palate J* 2:384-388.
- Millicovsky G, Ambrose LJ, Johnston MC. 1982. Developmental alterations associated with spontaneous cleft lip and palate in CL/Fr mice. *Am J Anat* 164:29-44.
- Mingist M, Kitani T, Koide N, Ueda H. 2007. Relationship between eyed-egg percentage and levels of cortisol and thyroid hormone in masu salmon *Oncorhynchus masou*. *J of Fish Biol* 70:1045-1056.
- Minkoff R. 1984. Cell cycle analysis of facial mesenchyme in the chick embryo. I. Labelled mitoses and continuous labelling studies. *J Embryol Exp Morphol* 81:49-59.
- Montenegro MA, Palomino H, Palomino HM. 1995. The influence of earthquake-induced stress on human facial clefting and its simulation in mice. *Arch Oral Biol* 40:33-37.
- Moore K, Persaud TVN. 2002. Zrození člověka – Embryologie s klinickým zaměřením. Praha: ISV nakladatelství, pp. 1-564.
- Moosavi MA, Yazdanparast R, Lotfi A. 2006. GTP induces S-phase cell-cycle arrest and inhibits DNA synthesis in K562 cells but not in normal human peripheral lymphocytes. *J Biochem Mol Biol* 39:492-501.
- Murphy KE, Hannah ME, Willan AR, Hewson SA, Ohlsson A, Kelly EN, Matthews SG, Saigal S, Asztalos E, Ross S, Delisle MF, Amankwah K, Guselle P, Gafni A, Lee SK, Armson BA; MACS Collaborative Group. 2008. Multiple courses of antenatal corticosteroids for preterm birth (MACS): a randomised controlled trial. *Lancet* 372:2143-2151.
- Nair MPN, Mahajan S, Hou J, Sweet AM, Schwartz SA. 2000. The stress hormone, cortisol, synergizes with HIV-1 gp-120 to induce apoptosis of normal human peripheral blood mononuclear cells. *Cell Mol Biol* 46:1227-1238.

- Naryzhny SN, Lee H. 2004. The post-translational modifications of proliferating cell nuclear antigen: acetylation, not phosphorylation, plays an important role in the regulation of its function. *J Biol Chem* 279:20194-20199.
- Nicolaides NC, Galata Z, Kino T, Chrousos GP, Charmandari E. 2010. The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function. *Steroids* 75:1-12.
- Palacios R, Sugawara I. 1982. Hydrocortisone abrogates proliferation of T cells in autologous mixed lymphocyte reaction by rendering the interleukin-2 Producer T cells unresponsive to interleukin-1 and unable to synthesize the T-cell growth factor. *Scand J Immunol* 15:25-31.
- Park-Wyllie L, Mazzotta P, Pastuszak A, Moretti ME, Beique L, Hunnisett L, Friesen MH, Jacobson S, Kasapinovic S, Chang D, Diav-Citrin O, Chitayat D, Nulman I, Einarson TR, Koren G. 2000. Birth defects after maternal exposure to corticosteroids: Prospective cohort study and meta-analysis of epidemiological studies. *Teratology* 62:385-392.
- Parker RM, Hendrickx AG. 1983. Craniofacial and central nervous system malformations induced by triamcinolone acetonide in nonhuman primates:II. Craniofacial pathogenesis. *Teratology* 28:35-44.
- Parsons TE, Kristensen E, Hornung L, Diewert VM, Boyd SK, German RZ, Hallgrímsson B. 2008. Phenotypic variability and craniofacial dysmorphology: increased shape variance in a mouse model for cleft lip. *J Anat* 212:135-143.
- Perez SA, Mahaira LG, Demirtzoglou FJ, Sotiropoulou PA, Ioannidis P, Iliopoulou EG, Gritzapis AD, Sotiriadou NN, Baxevanis CN, Papamichail M. 2005. A potential role for hydrocortisone in the positive regulation of IL-15-activated NK-cell proliferation and survival. *Blood* 106:158-166.
- Peterka M, Dostál M. 1977. Influence of cleft palate on growth of the maxilla in mouse embryos. *Cleft Palate J* 14:206-210.
- Peterka M, Jelínek R. 1978. A paradoxical model - cleft palate in the chick embryo. *Folia Morphol* 26:173-175.
- Peterka M, Jelínek R. 1983. Origin of hydrocortisone induced orofacial clefts in the chick embryo. *Cleft Palate J* 20:35-46.
- Peterka M, Jelínek R, Fára M. 1985. Rozbor příčin vzniku vrozených vad z pohledu teratologa. *Cesk Gynekol* 50:363-368.
- Peterka M, Fára M. 1990. Jsou vitamíny embryotoxické? *Prakt lékař* 70:567-569.

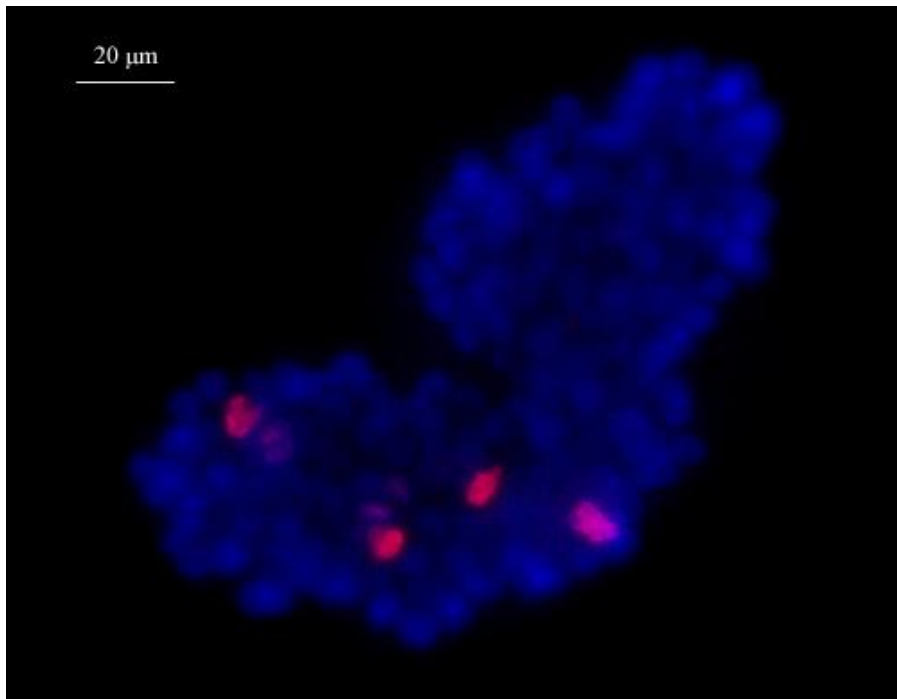
- Peterka M, Peterková R, Likovský Z, Tvrdek M, Fára M. 1995. Incidence of orofacial clefts in Bohemia (Czech Republic) in 1964-1992. *Acta Chir Plast* 37:122-126.
- Peterka M, Peterková R, Likovský Z. 1997. Cleft beak induced by hydrocortisone in the chick is prevented by increased cell division after experimental reduction of amniotic fluid. *Anat Embryol* 195:387-391.
- Peterka M, Mandys V, Viale M, Cafaggi S, Peterková R, Esposito M. 2002. Embryotoxicity of cisplatin and a cisplatin-procaine complex (DPR) studied in chick embryo. *Neoplasma* 49:394-400.
- Peterka M, Peterková R, Likovský Z. 2006. The lack of isolated palatal clefts in Czech Gypsies. *Acta Chir Plast* 48:97-102.
- Piffer RC, Garcia PC, Pereira OC. 2009. Adult partner preference and sexual behavior of male rats exposed prenatally to betamethasone. *Physiol Behav* 98:163-167.
- Poradowska W, Jaworska M. 1963. Etiology of bilateral cleft lip and palate. *Acta Chir Plast* 5:175-180.
- Pratt RM, Dencker L, Diewert VM. 1984. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced cleft palate in the mouse: evidence for alterations in palatal shelf fusion. *Teratog Carcinog Mutagen* 4:427-436.
- Pratt RM. 1985. Receptor-dependent mechanisms of glucocorticoid and dioxin-induced cleft palate. *Environ Health Perspect* 61:35-40.
- Pratt WB. 1993. The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 268:21455–21458.
- Proszkowiec-Weglarz M, Porter TE. 2010. Functional characterization of chicken glucocorticoid and mineralocorticoid receptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298:1257-1268.
- Reddy SG, Reddy RR, Bronkhorst EM, Prasad R, Ettema AM, Sailer HF, Bergé SJ. 2010. Incidence of cleft Lip and palate in the state of Andhra Pradesh, South India. *Indian J Plast Surg* 43:184-189.
- Rettenbacher S, Möstl E, Groothuis TG. 2009. Gestagens and glucocorticoids in chicken eggs. *Gen Comp Endocrinol* 164:125-129.
- Reznikov AG, Nosenko ND, Tarasenko LV. 1999. Prenatal stress and glucocorticoid effects on the developing gender-related brain. *J Steroid Biochem Mol Biol* 69:109-115.

- Richman JM, Tickle C. 1989. Epithelia are interchangeable between facial primordia of chick embryos and morphogenesis is controlled by the mesenchyme. *Dev Biol* 136:201-210.
- Rintala A, Pönkä A, Sarna S, Stegars T. 1983. Cleft lip and palate in Finland in 1948-75: correlations to infections, seasonal and yearly variations. *Scand J Plast Reconstr Surg* 17:197-201.
- Rodriguez-Pinilla E, Martinez-Frias ML. 1998. Corticosteroids during pregnancy and oral clefts: A case-control study. *Teratology* 58:2-5.
- Rosa FW. 1983. Teratogenicity of isotretinoin. *Lancet* 2:513.
- Rosenzweig S. 1966. Psychological stress in cleft palate etiology. *J Dent Res* 45:1585-1593.
- Rowland JM, Hendrickx AG. 1983. Comparative teratogenicity of triamcinolone acetonide, triamcinolone, and cortisol in the rat. *Teratog Carcinog Mutagen* 3:313-319.
- Rychter Z, Jelínek R. 1978. *Základy experimentální teratologie*. Praha: Avicenum, pp. 1-159.
- Sakayama K, Mashima N, Kidani T, Miyazaki T, Yamamoto H, Masuno H. 2008. Effect of cortisol on cell proliferation and the expression of lipoprotein lipase and vascular endothelial growth factor in a human osteosarcoma cell line. *Cancer Chemother Pharmacol* 61:471-479.
- Salamanca CM, Maines-Bandiera SL, Leung PC, Hu YL, Auersperg N. 2004. Effects of epidermal growth factor/hydrocortisone on the growth and differentiation of human ovarian surface epithelium. *J Soc Gynecol Investig* 11:241-251.
- Saunders JW, Gasseling MT, Saunders LC . 1962. Cellular death in morphogenesis of the avian wing. *Dev Biol* 5:147-178.
- Savin T, Kurpios NA, Shyer AE, Florescu P, Liang H, Mahadevan L, Tabin CJ. 2011. On the growth and form of the gut. *Nature* 476:57-62.
- Shah RM, Travill AA. 1976. The teratogenic effects of hydrocortisone on palatal development in the hamster. *J Embryol Exp Morphol* 35:213-224.
- Shepard TH, Fantel AG, Fitzsimmons J. 1989. Congenital defect rates among spontaneous abortuses: twenty years of monitoring. *Teratology*. 39:325-331.
- Schaaf MJ, Cidlowski JA. 2002. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and resistance. *J Steroid Biochem Mol Biol* 83:37-48.
- Schardein JL. 2000. *Chemically induced birth*. Nex York: Marcel Dekker, Inc. pp. 1-1109.

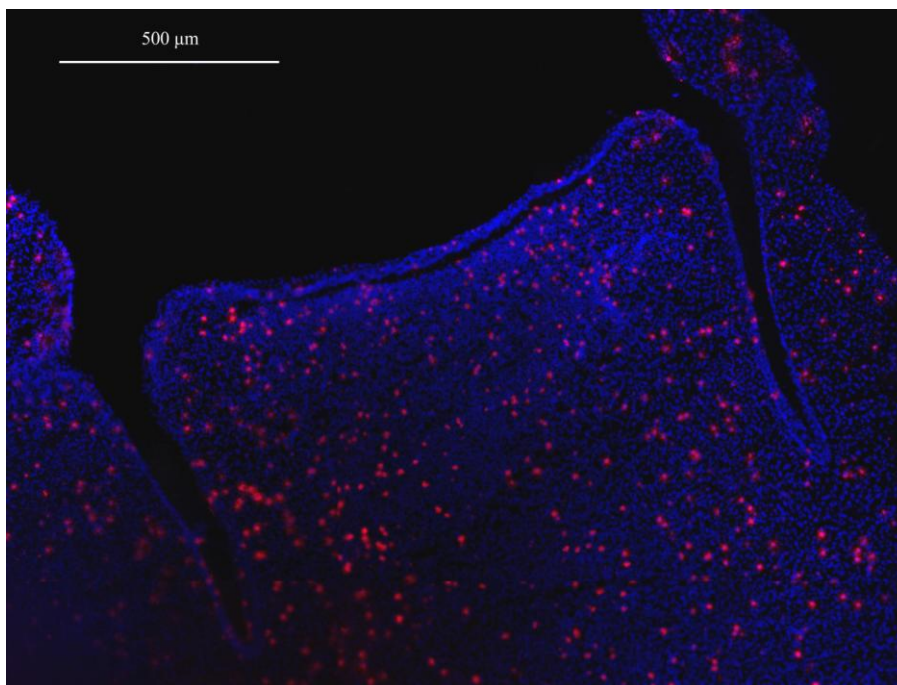
- Schechter B, Feldman M. 1977. Hydrocortisone affects tumor growth by eliminating precursors of suppressor cells. *J Immunol* 119:1563-1568.
- Scheinman RI, Gualberto A, Jewell CM, Cidlowski JA, Baldwin Jr AS. 1995. Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF- κ B by activated glucocorticoid receptors. *Mol Cell Biol* 15:943–953.
- Schutte BC, Murray JC. 1999. The many faces and factors of orofacial clefts. *Hum Mol Genet* 8:1853-1859.
- Silbermann M, Levitan S. 1979. Corticosteroid-induced mandibular growth retardation and palatal malformation in the ICR mouse fetus. *J Anat* 128:747-765.
- Smith FA, Schwetz BA, Nitschke KD. 1976. Teratogenicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in CF-1 mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 38:517-523.
- Smith DW. 1981. Fetal alcohol syndrome and fetal alcohol effects. *Neurobehav Toxicol Teratology* 3:127.
- Smith AG. 2001. Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:435-462.
- Spain KM, Kisielleski W, Wood NK. 1975. Cleft palate induction: quantitative studies of 3H corticoids in A/Jax mouse tissues after maternal injections of 3H cortisol. *J Dent Res* 54:1069-1077.
- Thomas DB. 1995 Cleft palate, mortality and morbidity in infants of substance abusing mothers. *J Paediatr Child Health.* 31:457-460.
- Tsigos C, Chrousos GP. 2002. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res* 53:865-871.
- Tyl J, Dytrych Z, Helclová H, Schüller V, Matějček Z, Beránková A. 1990. Psychický a sociální stres dětí s rozštěpem rtu a patra. *Cesk Pediatr* 45:532-536.
- Ubaldi F, Rienzi L, Ferrero S, Anniballo R, Iacobelli M, Cobellis L, Greco E. 2002. Low dose prednisolone administration in routine ICSI patients does not improve pregnancy and implantation rates. *Hum Reprod* 17:1544-1547.
- Vanderas AP. 1987. Incidence of cleft lip, cleft palate, and cleft lip and palate among races: a review. *Cleft Palate J* 24:216-225.
- Vento R, Taibi G, D'Ancona G, Giuliano M, Fardello G. 1985. Growth-inhibitory response elicited by hydrocortisone in Chin embryo hepatocytes. *IRCS Med Sci* 13:1012-1013.
- Wallace GH, Arellano JM, Gruner TM. 2011. Non-syndromic cleft lip and palate: could stress be a causal factor? *Women Birth* 24:40-46.

- Wang KY, Diewert VM. 1992. A morphometric analysis of craniofacial growth in cleft lip and noncleft mice. *J Craniofac Genet Dev Biol* 12:141-154.
- Wapner RJ, Sorokin Y, Thom EA, Johnson F, Dudley DJ, Spong CY, Peaceman AM, Leveno KJ, Harper M, Caritis SN, Miodovnik M, Mercer B, Thorp JM, Moawad A, O'Sullivan MJ, Ramin S, Carpenter MW, Rouse DJ, Sibai B, Gabbe SG; National Institute of Child Health and Human Development Maternal Fetal Medicine Units Network. 2006. Single versus weekly courses of antenatal corticosteroids: evaluation of safety and efficacy. *Am J Obstet Gynecol* 195:633-642.
- Ward RE, Bixler D, Raywood ER. 1989. A study of cephalometric features in cleft lip-cleft palate families. I: Phenotypic heterogeneity and genetic predisposition in parents of sporadic cases. *Cleft Palate J* 26:318-325.
- Webster WS, Walsh DA, Lipson AH, McEwen SE. 1980. Teratogenesis after acute alcohol exposure in inbred and outbred mice. *Neurobehav Toxicol Teratol* 2:227-234.
- Whitehouse MW. 2011. Anti-inflammatory glucocorticoid drugs: reflections after 60 years. *Inflammopharmacology* 19:1-19.
- Yan K, Zhang C, Feng J, Hou L, Yan L, Zhou Z, Liu Z, Liu C, Fan Y, Zheng B, Xu Z. 2011. Induction of G1 cell cycle arrest and apoptosis by berberine in bladder cancer cells. *Eur J Pharmacol* 661:1-7.
- Yoneda T, Pratt RM. 1982. Vitamin B6 reduces cortisone-induced cleft palate in the mouse. *Teratology* 26:255-258.
- Young DL, Schneider RA, Hu D, Helms JA. 2000. Genetic and teratogenic approaches to craniofacial development. *Crit Rev Oral Biol Med* 11:304-317.
- Young NM, Wat S, Diewert VM, Browder LW, Hallgrímsson B. 2007. Comparative morphometrics of embryonic facial morphogenesis: implications for cleft-lip etiology. *Anat Rec* 290:123-139.
- Yucel S, Desouza A, Baskin LS. 2004. In utero prednisone exposure affects genital development. *J Urol* 172:1725-1730.
- Zhou J, Cidlowski JA. 2005. The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses. *Steroids* 70:407-417.
- Zhu H, Zhang L, Wu S, Teraishi F, Davis JJ, Jacob D, Fang B. 2004. Induction of S-phase arrest and p21 overexpression by a small molecule 2[[3-(2,3-dichlorophenoxy)propyl] amino]ethanol in correlation with activation of ERK. *Oncogene* 23:4984-4992.

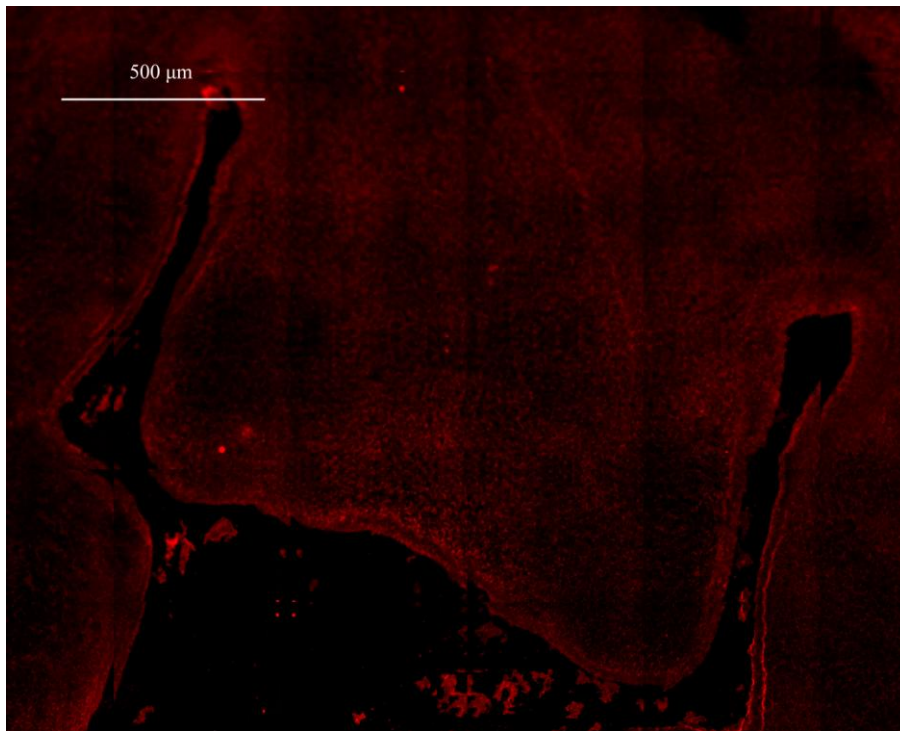
8. Přílohy



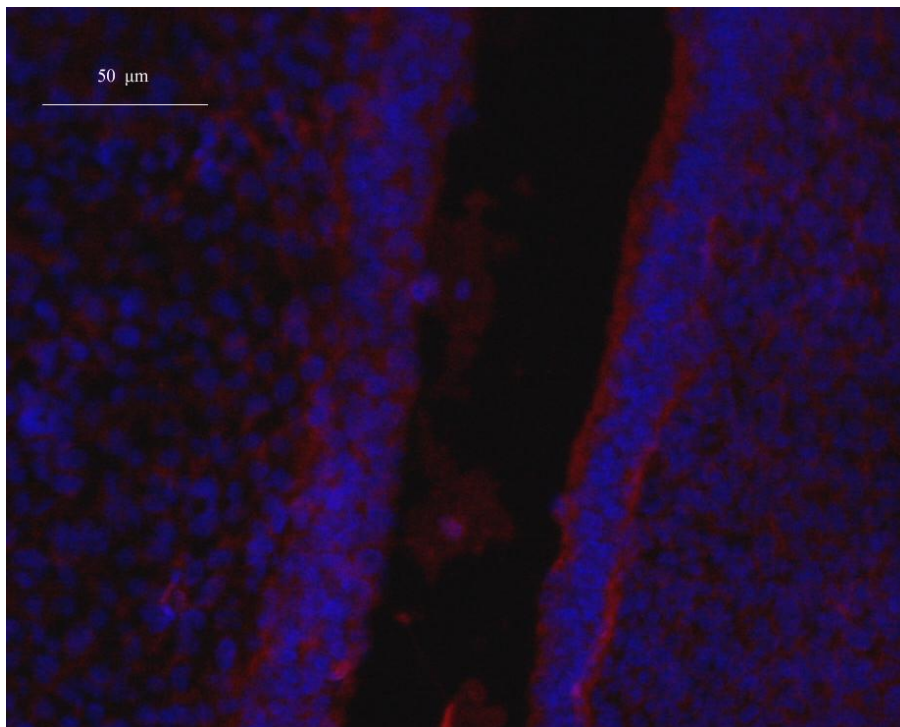
Obr. A. Imunofluorescenční barvení pH3 (červeně) v koncentraci 1:400 + jaderné barvení DAPI (modře). Foceno při zvětšení 200x.



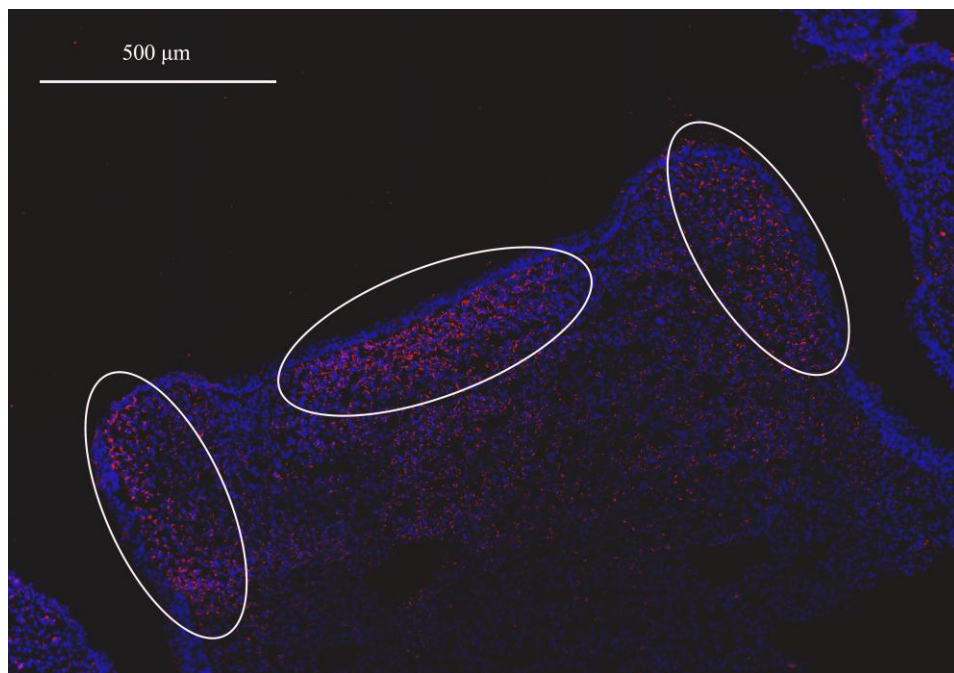
Obr. B. Imunofluorescenční barvení pH3 (červeně) + DAPI (modře) na řezu frontonasálního výběžku. Foceno při zvětšení 200x.



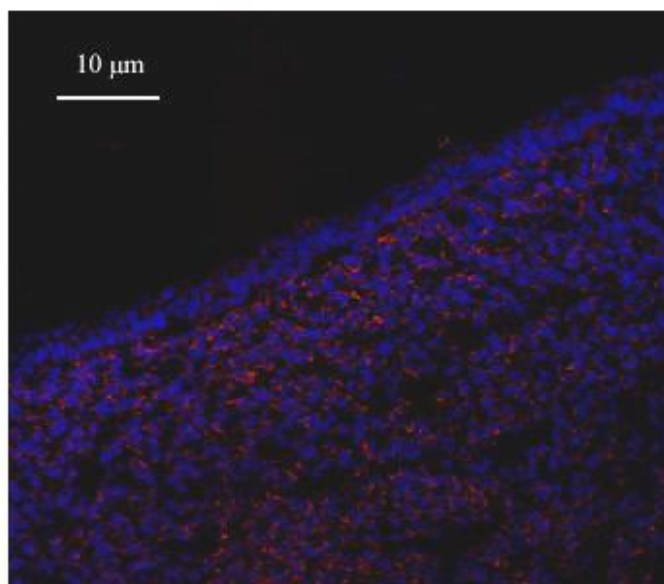
Obr. C. Imunofluorescenční barvení PCNA (červeně) bez permeabilizace membrán znázorňující proliferující buňky. Foceno při zvětšení 200x.



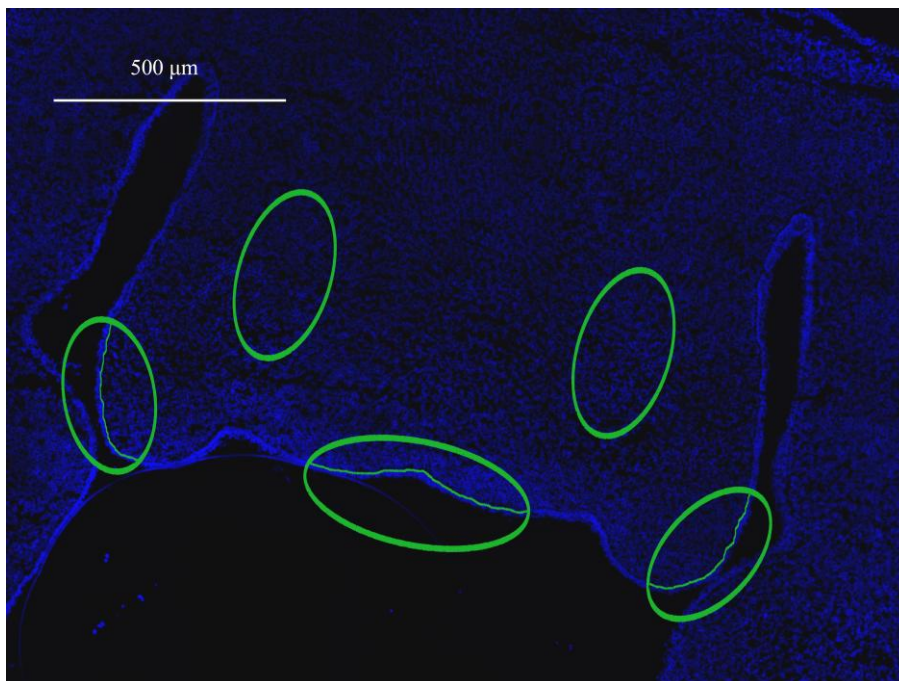
Obr. D. Detail imunofluorescenčního PCNA barvení (červeně) bez permeabilizace membrán v kombinaci s jaderným barvením DAPI (modře). Foceno při zvětšení 200x.



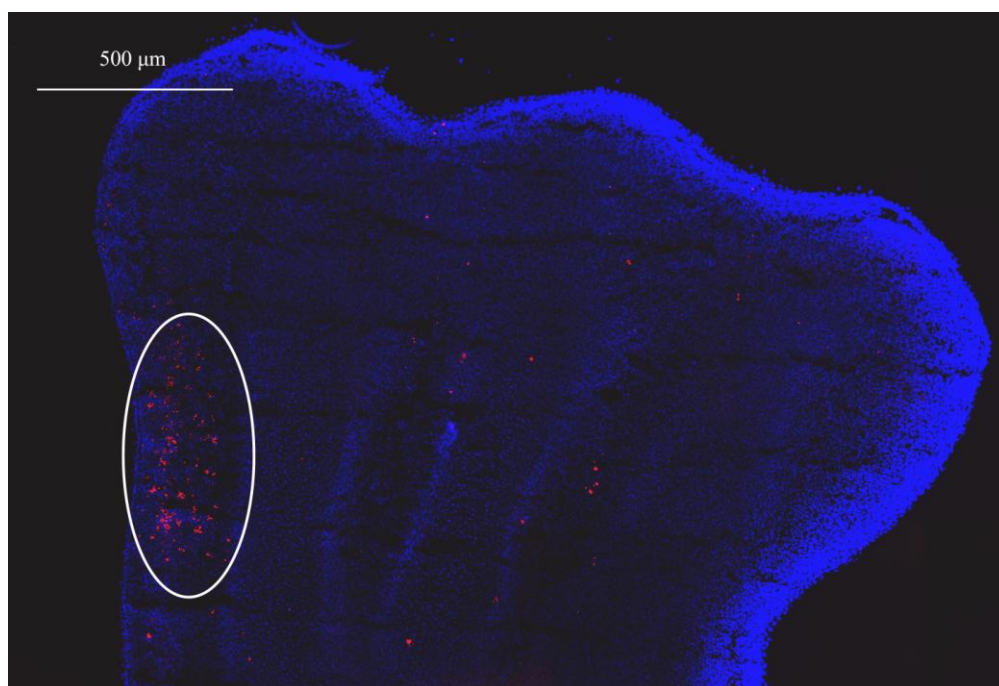
Obr. E. Imunofluorescenční barvení PCNA (červeně) s permeabilizací membrán (+DAPI modře) - postranní a středová S-oblast (označené bílými ovály). Foceno při zvětšení 200x.



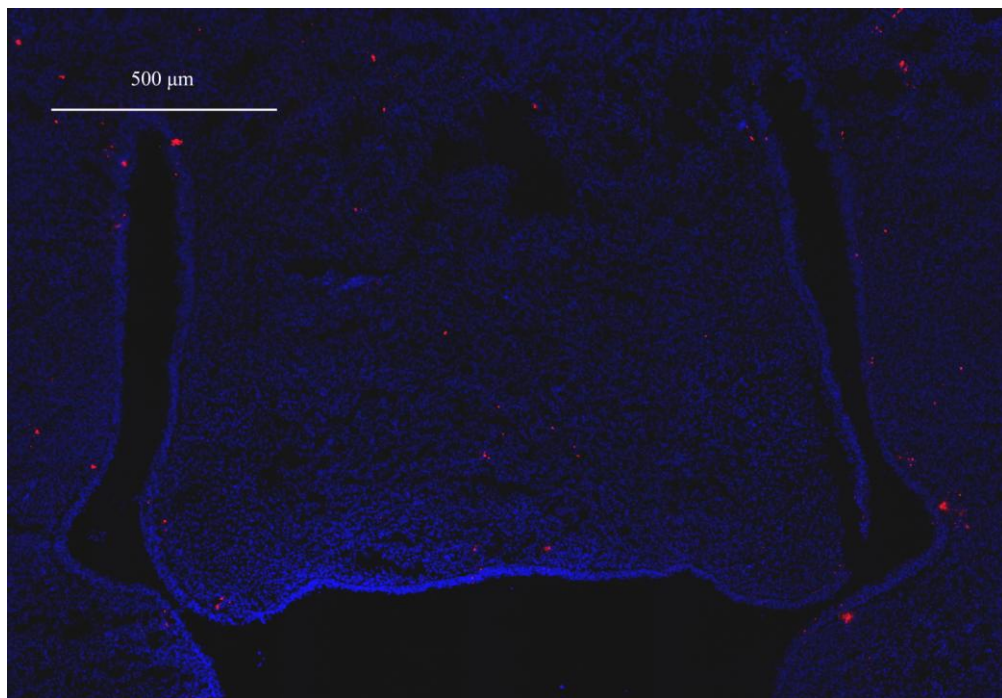
Obr. F. Detail barvení PCNA (červeně) s permeabilizací membrán (+DAPI modře) - oblast středové S-oblasti. Foceno při zvětšení 200x.



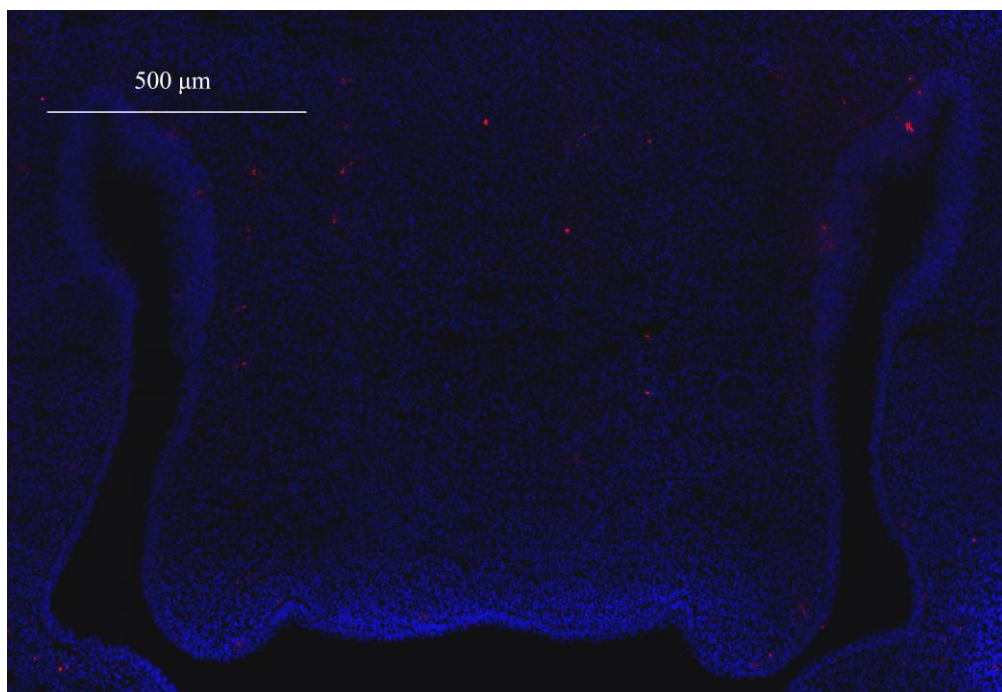
Obr. G. Ukázka vyznačení pozic analyzovaných oblastí frontonasálního výběžku (DAPI modře) – zelené ovály: dvě postranní S-oblasti, jedna středová S-oblast (všechny u krajů výběžku – slaběji vyznačena hranice epitel-mezenchym); dvě oblasti uvnitř výběžku nacházející se mimo S-oblasti. Foceno při zvětšení 200x.



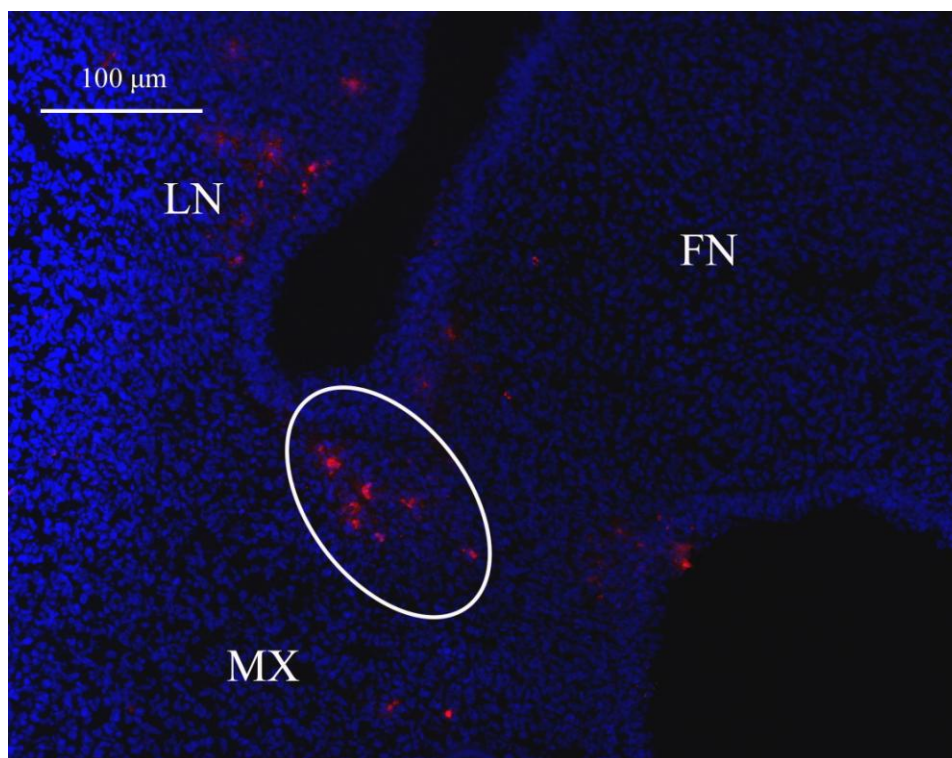
Obr. H. Dolní končetina zárodka kuřete (ED 6,5) s oblastí zvýšené apoptózy (bílý ovál) – barvení TUNEL (červeně) + DAPI (modře). Foceno při zvětšení 200x.



Obr. I. Výskyt apoptózy vizualizovaný barvením TUNEL (červeně) + DAPI (modře) na řezu kontrolního frontonasálního výběžku kuřete. Foceno při zvětšení 200x.



Obr. J. Výskyt apoptózy vizualizovaný barvením TUNEL (červeně) + DAPI (modře) na řezu hydrokortizonovaného frontonasálního výběžku kuřete. Foceno při zvětšení 200x.



Obr. K. Detail spojování výběžků s vizualizací apoptózy barvením TUNEL (červeně) + DAPI (modře) u kontrolního řezu. Bílý ovál označuje shluk apoptotických buněk v místě spojení frontonasálního a maxilárního výběžku. FN = frontonasální výběžek; MX = maxilární výběžek; LN = lateronasální výběžek.