

**Univerzita Karlova v Praze**

Přírodovědecká fakulta

Katedra antropologie a genetiky člověka



**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Testování embryotoxicity vybraných lidských  
teratogenů na zárodcích kuřete.**

*Testing of embryotoxicity of selected human teratogenes on chicken embryos.*

**Bc. Zuzana Pavlíková**

**Školitel: Doc. MUDr. Miroslav Peterka, DSc.**

**Květen 2012**

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svoji diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury.

Praha, 1. května 2012

.....

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli doc. MUDr. Miroslavu Peterkovi, DSc. za věnovaný čas, vedení a podporu při tvorbě této diplomové práce. Dále také Mgr. Petře Herlové a mnoha dalším kolegům z Oddělení teratologie Ústavu experimentální medicíny AV ČR za jejich pomoc a užitečné rady. Ráda bych poděkovala i své rodině, především svému manželovi, bez jejichž pochopení a podpory by tato práce nevznikla.

# Obsah:

<b>ABSTRAKT</b> .....	<b>6</b>
<b>KLÍČOVÁ SLOVA</b> .....	<b>7</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>8</b>
<b>KEY WORDS</b> .....	<b>9</b>
<b>SEZNAM ZKRATEK</b> .....	<b>10</b>
<b>1 ÚVOD</b> .....	<b>12</b>
1.1 ZÁKLADNÍ PRINCIPY TERATOLOGIE .....	12
1.1.1 Historie teratologie .....	12
1.1.2 Teratologie a její význam .....	13
1.1.3 Vymezení základních pojmů .....	14
1.1.4 Příčiny vzniku vrozených vad a jejich četnost .....	15
1.1.5 Podmínky vzniku vývojových vad .....	16
1.1.6 Principy teratogeneze .....	17
1.1.7 Teratogeny .....	18
1.1.8 Prevence vrozených vad .....	18
1.2 TESTOVÁNÍ EMBRYOTOXICITY A DETEKCE TERATOGENŮ .....	19
1.2.1 Pohled do historie .....	19
1.2.2 Doporučení OECD .....	20
1.2.3 Nedostatky současných oficiálních testů .....	21
1.2.4 Alternativní přístup .....	21
1.2.5 Metody využívající zárodků kuřete .....	22
1.2.6 Výhody využití kuřecího zárodku jako modelového organismu .....	23
1.2.7 Tradiční vs. alternativní přístup .....	23
1.3 VITAMINY .....	24
1.4 TERMINOLOGIE: RETINOIDY A VITAMIN A .....	24
1.5 VITAMIN A .....	24
1.6 KYSELINA RETINOVÁ .....	26
1.7 TOXICITA VITAMINU A .....	29
1.8 TERATOGENNÍ ÚČINEK RETINOIDŮ, HLAVNĚ PAK VITAMINU A .....	29
1.8.1 Teratogenní účinek hypovitaminózy A u člověka .....	29
1.8.2 Teratogenní účinek hypovitaminózy A u zvířat .....	30
1.8.3 Teratogenní účinek nadbytku vitamínu A, kyseliny retinové a jiných retinoidů u člověka .....	31
1.8.4 Teratogenní účinek nadbytku vitamínu A a kyseliny retinové u zvířat .....	33
1.9 DIMETHYL SULFOXID (DMSO) .....	36
1.9.1 Využití DMSO .....	37
1.9.2 Vedlejší účinky při užívání DMSO .....	38

1.9.3	<i>Toxický efekt DMSO u člověka</i> .....	39
1.9.4	<i>Toxický efekt DMSO u zvířat</i> .....	39
1.9.5	<i>Teratogenní účinek DMSO u zvířat</i> .....	40
1.10	MODELOVÝ ORGANISMUS .....	42
1.10.1	<i>Kuřecí zárodek</i> .....	42
1.11	ZÁMĚR DIPLOMOVÉ PRÁCE .....	45
<b>2</b>	<b>CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>46</b>
<b>3</b>	<b>MATERIÁL</b> .....	<b>47</b>
<b>4</b>	<b>METODY</b> .....	<b>48</b>
4.1	INKUBACE .....	48
4.2	SELEKCE ZÁRODKŮ - VSTUP DO EXPERIMENTU .....	48
4.3	CHEST (CHICK EMBRYOTOXICITY SCREENING TEST) .....	50
4.4	SANDWICH .....	54
4.5	HISTOLOGICKÉ ZPRACOVÁNÍ TKÁNĚ .....	58
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>61</b>
5.1	SANDWICH, ŽIVNÁ MÉDIA .....	61
5.2	SANDWICH, DMSO .....	61
5.2.1	<i>DMSO dose-response</i> .....	61
5.2.2	<i>Kontrolní skupina</i> .....	61
5.2.3	<i>Efekt jednotlivých testovaných koncentrací DMSO</i> .....	62
5.2.4	<i>Embryotoxický efekt DMSO na zárodek kuřete</i> .....	67
5.3	CHEST, DMSO .....	70
5.3.1	<i>DMSO dose-response</i> .....	70
5.3.2	<i>Efekt DMSO v závislosti na dni aplikace</i> .....	70
5.3.3	<i>Závislost počtu mrtvých a malformovaných zárodků na aplikované koncentraci DMSO</i> .....	73
5.3.4	<i>Závislost počtu mrtvých a malformovaných zárodků na dni aplikace DMSO</i> .....	75
5.4	SANDWICH, ATRA .....	77
5.4.1	<i>ATRA dose-response</i> .....	77
5.4.2	<i>Kontrolní skupiny</i> .....	77
5.4.3	<i>Efekt jednotlivých testovaných koncentrací ATRA</i> .....	78
5.4.4	<i>Embryotoxický efekt ATRA na zárodek kuřete</i> .....	82
5.5	CHEST, ATRA .....	83
5.5.1	<i>ATRA dose-response</i> .....	83
5.5.2	<i>Efekt ATRA v závislosti na dni aplikace</i> .....	83
5.5.3	<i>Závislost počtu mrtvých a malformovaných zárodků na aplikované dávce ATRA</i> ...	88
5.5.4	<i>Závislost počtu mrtvých a malformovaných zárodků na dni aplikace ATRA</i> .....	90
5.5.5	<i>Malformační spektrum</i> .....	92

5.6	POROVNÁNÍ METODY SANDWICH A CHEST NA ED2 .....	96
5.6.1	<i>Porovnání odhadu začátku pásma embryotoxicity DMSO, ED2</i> .....	96
5.6.2	<i>Porovnání odhadu začátku pásma embryotoxicity ATRA, ED2</i> .....	97
<b>6</b>	<b>DISKUZE</b> .....	<b>98</b>
6.1	VYPRACOVÁNÍ METODY SANDWICH A JEJÍ STANDARDIZACE .....	98
6.2	EMBRYOTOXICKÝ ÚČINEK DMSO.....	98
6.3	EMBRYOTOXICKÝ ÚČINEK ATRA .....	102
6.4	POROVNÁNÍ ODHADU ZAČÁTKU PÁSMO EMBRYOTOXICITY PRO ATRA I DMSO NA ED2 ZÍSKANÝCH METODOU CHEST A SANDWICH.....	103
6.5	CHEST vs. SANDWICH .....	104
6.6	CHEST vs. OSTATNÍ METODY VYUŽÍVAJÍCÍ KUŘECÍHO ZÁRODKU <i>IN OVO</i> .....	105
6.7	SANDWICH vs. OSTATNÍ METODY VYUŽÍVAJÍCÍ KUŘECÍHO ZÁRODKU <i>IN VITRO</i> .....	109
6.8	CHEST, SANDWICH A JEJICH VYUŽITÍ V KOMBINACI S KLASICKÝMI METODAMI .....	112
6.9	BUDOUCÍ SMĚR VÝZKUMU .....	113
<b>7</b>	<b>ZÁVĚRY</b> .....	<b>114</b>
<b>8</b>	<b>POUŽITÁ LITERATURA</b> .....	<b>115</b>
<b>9</b>	<b>SEZNAM PŘÍLOH</b> .....	<b>126</b>

## ABSTRAKT

Teratogeny jsou faktory zevního prostředí schopné vyvolat u exponovaných jedinců vývojovou či vrozenou vadu. Metody používané k odhalení embryotoxického účinku látek jsou buď klasické, využívající laboratorní savce, nebo alternativní, využívající systémů *in vitro* či *in ovo*. Alternativní metody testování se od klasických metod liší především tím, že jsou zbaveny metabolismu mateřského organismu, který do systému vnáší vysokou variabilitu výsledku.

V této diplomové práci byly použity dvě alternativní metody testování využívající kuřecího zárodku. První byla *in ovo* metoda CHEST (Jelínek, 1977), kterou lze použít k aplikaci testované látky od ED2 do ED6. Nevýhodou metody CHEST je výrazné naředění testované látky po její subgerminální aplikaci na ED2. Proto jsme vyvinuli *in vitro* metodu SANDWICH, při které k naředění testované látky nedochází.

Cílem práce bylo vypracovat *in vitro* metodu SANDWICH za použití prokázaného teratogenu (*all-trans* retinové kyseliny) a jeho rozpouštědla (dimethyl sulfoxidu), dále stanovit odhadovaný začátek pásma embryotoxicity obou testovaných látek pomocí metody SANDWICH a CHEST a výsledky z obou metod porovnat.

V této práci jsme potvrdili embryotoxický účinek *all-trans* kyseliny retinové jak pomocí metody CHEST, tak pomocí metody SANDWICH. Embryotoxický efekt dimethyl sulfoxidu jsme prokázali pouze pro nejvyšší testované koncentrace za využití metody CHEST. Překvapením pro nás bylo teratogenní působení nízkých koncentrací DMSO, kterým byly zárodky vystaveny *in vitro*. Porovnáním odhadovaného začátku pásma embryotoxicity získaného pro ATRA i DMSO pomocí metody SANDWICH a CHEST na ED2 bylo zjištěno, že metoda SANDWICH je senzitivnější a to o dva až tři dávkové řády.

Metoda SANDWICH je tedy poměrně rychlou a levnou metodou primární detekce začátku pásma embryotoxicity testované látky na časných stádiích embryonálního vývoje zárodku. Zárodek je po delší dobu vystaven působení testované látky, a proto je tato metoda vhodným doplněním metody CHEST na ED2.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

teratogeny, vitamin A, DMSO, *all-trans* retinová kyselina, CHEST, SANDWICH, *in ovo*, *in vitro*, zárodek kuřete, testování embryotoxicity



## ABSTRACT

Teratogenes are external environmental factors that can cause a developmental or a congenital defect in exposed individuals. The methods used for detecting the embryotoxic effect of substances are the classic when laboratory mammals are used and the alternative which use *in vitro* and *in ovo* systems. The main difference between these two is that the alternative methods lack metabolism of maternal organism. The metabolism of maternal organism brings a high variability of results to systems of the classic methods.

We used two alternative methods in this thesis, both using chicken embryo. The first of them was *in ovo* method called CHEST (Jelínek, 1977). CHEST method can be used for administration of tested substances from ED2 to ED6. The disadvantage of this method is due to the dilution of the tested substance after subgerminal application at ED2. Therefore we developed *in vitro* method called SANDWICH. No dilution occurs while using the SANDWICH method.

The aim of this study was to develop *in vitro* method SANDWICH while using proven teratogene (*all-trans* retinoic acid) and its solvent (dimethyl sulfoxide), to estimate beginning of the embryotoxicity dose range for both substances using CHEST and SANDWICH, and finally to compare obtained results.

We confirmed the embryotoxic effect of *all-trans* retinoic acid with method CHEST and SANDWICH. The embryotoxic effect of dimethyl sulfoxide was proven only for the highest concentration tested with CHEST. The teratogenic effect of low concentrations of dimethyl sulfoxide obtained by SANDWICH was surprising. When the results were compared, we found estimated beginning of the embryotoxicity dose range for both substances using CHEST and SANDWICH method differing by two to three dose ranges.

SANDWICH method is a relatively quick and cheap method for primary detection of the beginning of the embryotoxicity dose range of tested substance at early developmental stages of an embryo. The embryo is exposed to the tested substance for longer period of time. This makes the SANDWICH great completion to the CHEST method at ED2.

## **KEY WORDS**

teratogenes, vitamin A, DMSO, *all-trans* retinoic acid, CHEST, SANDWICH, *in ovo*, *in vitro*, chick embryo, testing of embryotoxicity

## SEZNAM ZKRATEK

ADH	<i>aldehyde dehydrogenase</i>	aldehyd dehydrogenáza
ADRRS	<i>Adverse Drug Reaction Reporting System</i>	Systém pro hlášení nežádoucího účinku léčivého přípravku
ATRA	<i>all-trans retinoic acid</i>	<i>all-trans</i> retinová kyselina
BPD	<i>biliopancreatic diversion</i>	biliopankreatická diverze
CB	<i>cleft beak</i>	rozštěp zobáku
CC	<i>cordocentesis</i>	odběr pupečnickové krve, kordocentéza
CL	<i>cleft lip</i>	rozštěp rtu
CNS	<i>central nervous system</i>	centrální nervová soustava
CP	<i>cleft palate</i>	rozštěp patra
CVS	<i>chorionic villus sampling</i>	odběr choriových klků
DK		dolní končetina
DMSO	<i>dimethyl sulfoxide</i>	dimethyl sulfoxid
DORV	<i>double outlet right ventricle</i>	dvojitýtoková pravá komora
EC	<i>Early Chick</i>	
ECVAM	<i>European Center for the Validation of Alternative Methods</i>	Evropské středisko pro validaci alternativních metod
ED	<i>embryonic day</i>	embryonální den
ETS	<i>European Teratology Society</i>	Evropská teratologická společnost
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>	Organizace pro výživu a zemědělství
FBS	<i>fetal bovine serum</i>	fetální hovězí sérum
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>	Správa potravin a léčiv
FETAX	<i>Frog Embryo Teratogenesis Assay Xenopus</i>	
HH		stádium dle Hamburgera a Hamiltona
HK		horní končetina
CHEST	<i>Chick Embryotoxicity Screening Test</i>	
IU	<i>International unit</i>	mezinárodní jednotka
KVS		kardiovaskulární soustava
LD <sub>50</sub>	<i>lethal dose</i>	smrtná dávka pro 50 % jedinců

OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>	Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj
ppm	<i>parts per million</i>	částic na milion
RA	<i>retinoic acid</i>	kyselina retinová
RALDH	<i>retinaldehyde dehydrogenase</i>	retinaldehydehydrogenáza
RANC	<i>retinoic acid nuclear complex</i>	
RAR	<i>retinoic acid receptor</i>	receptor pro kyselinu retinovou
RAREs	<i>retinoic acid response elements</i>	vazebná místa pro kyselinu retinovou
RE	<i>retinol equivalents</i>	ekvivalent retinolu
RS	<i>rumpleness</i>	chybění kostrče/ocasu
RXR	<i>retinoid receptor/ retinoid X receptor</i>	retinoidní receptor (X)
SCR	<i>syndrome of caudal regression</i>	syndrom kaudální regrese
TGA	<i>transposition of great arteries</i>	transpozice velkých cév
VSD	<i>ventricular septal defect</i>	defekt komorového septa
WHO	<i>World Health Organization</i>	Světová zdravotnická organizace

# 1 ÚVOD

## 1.1 Základní principy teratologie

### 1.1.1 Historie teratologie

Již od nejstarších dob byl člověk fascinován neobvyklými úkazy, mezi které patřilo například narození dítěte s nezvyklým vzhledem, tedy s vrozenou vadou. Zájem člověka o tyto úkazy byl nejprve dokumentován v podobě různých kamenných sošek, skalních maleb či bájí, později, s rozvojem písma, se objevily i záznamy na hliněných tabulkách, detailně popisující rozmanité malformace (Peterka a Novotná, 2010).

Vždy byl veliký zájem o jedince s abnormálním zjevem, tedy o zrůdy. Ty se vyskytovaly jako dekorace na císařských či knížecích dvorech, byly ukazovány v panoptících nebo na poutích, a některé z nich se dokonce dostaly do všeobecného povědomí jako např. siamská dvojčata: sestry Blažkovy (viz Obr. 1). Některé z nich vstoupily dokonce do bájí a pohádek jako například sirény či kyklopský obr Polyfém. Laická veřejnost viděla příčinu jejich vzniku v uřknutí, viděla v ní trest boží nebo následek soulože ženy s ďáblem nebo se zvířetem. Jen někteří ve zrůdách viděli pouhou hříčku přírody (Jedlička, 1954).



Obr. 1: Sestry Růžena a Josefina Blažkovy (URL 1).

Vrozenými vadami nebyla přitahována pouze laická veřejnost, ale i myslitelé a přírodovědci. Ti vrozeným vadám věnovali velkou pozornost - studovali jejich morfologii, popisovali je a dokonce se je i snažili systematicky třídit (Jedlička, 1954).

Tak například Aristotelovy (384-322 p.n.l.) znalosti o vývojových vadách byly překvapující a dokazovaly jeho hluboké vědomosti v oblasti anatomie a patologie (Peterka a Novotná, 2010). Významným pro rozvoj pozdější teratologie se stal William Harvey (1578-1657), který pozoroval rozštěp rtu u novorozených dětí, jenž blízce připomínal normální stav během časně embryogeneze (Moore a Persaud, 2002).

V 19. století vyšlo významné třísvazkové dílo Isidora Geoffroy Saint-Hilaira nazvané „*Histoire générale et particulière des anomalies de l'organisation chez l'homme et les animaux*“ („Obecná a konkrétní historie strukturních monstrosit u člověka a zvířat“), pojednávající o vzniku vrozených vad. Toto dílo se stalo významným základem pro současnou vědeckou teratologii především proto, že Geoffroy Saint-Hilaire spolu se svým synem uskutečnili studie abnormálního vývoje zvířat za účelem vyvolání vrozených vad (Moore a Persaud, 2002). Vrozená vada tak přestala být považována za náhodnou hříčku vývoje, která by nepodléhala zákonům přírody (Peterka a Novotná, 2010).

### **1.1.2 Teratologie a její význam**

Pojem teratologie je odvozen z řeckého *τερατολογία* (*teratologia*), které má původ ve slovech *τερας* (*teras*- zrůda, stvůra) a *λόγος* (*logos*- nauka). Teratologii lze tedy doslova chápat jako „nauku o zrůdách“, která zkoumá příčiny, mechanismy a projevy abnormálního vývoje. Pojem zrůda byl dlouho používán jako odborný termín. Důkazem toho je např. „*Embryopathie a některé problémy pokusné teratologie (jejich význam pro lékařskou praxi)*“ prof. MUDr. Václava Jedličky z roku 1954, ve které se používá pojmu zrůda pro označení postiženého jedince a pojem zrůdnost pro vrozenou vadu (viz Jedlička, 1954).

Moderní teratologie je interdisciplinární vědní obor, který v sobě snoubí poznatky jak z embryologie či patologie, tak z genetiky nebo farmacie. Využívá tři pracovní způsoby. První možný způsob je experimentální, který využívá laboratorních zvířat a opírá se o celou řadu známých a měřitelných prvků, jako je genotyp, typ a dávka aplikované látky a jiné. Tento přístup můžeme označit jako *experimentální teratologii*. Druhý přístup k teratologii je povahy klinické, resp. lékařské. *Klinická teratologie* pracuje s lidmi, u kterých se zaměřuje především na jejich fenotyp, z něhož usuzuje na možnou příčinu teratogeneze. Poslední přístup je epidemiologický. *Epidemiologická teratologie* hodnotí soubory abnormálních fenotypů vyskytujících se v prostoru a čase (Kučera, 1989).

Význam teratologie spočívá v odhalení faktorů ohrožujících vývoj organismů, především pak vývoj lidského zárodku, a v prevenci vzniku vývojových vad. Abychom mohli vývojovým vadám vzniklým působením vnějších faktorů předcházet, budeme potřebovat metody na detekci těchto teratogenů a zároveň budeme muset stanovit jejich účinek na člověka. Ke stanovení rizik pro člověka je nutné brát v úvahu expozici danému teratogenu, jeho povahu, způsob jeho metabolizování a jeho odstranění z organismu jak v modelovém systému, tak u člověka (Brown, 1997).

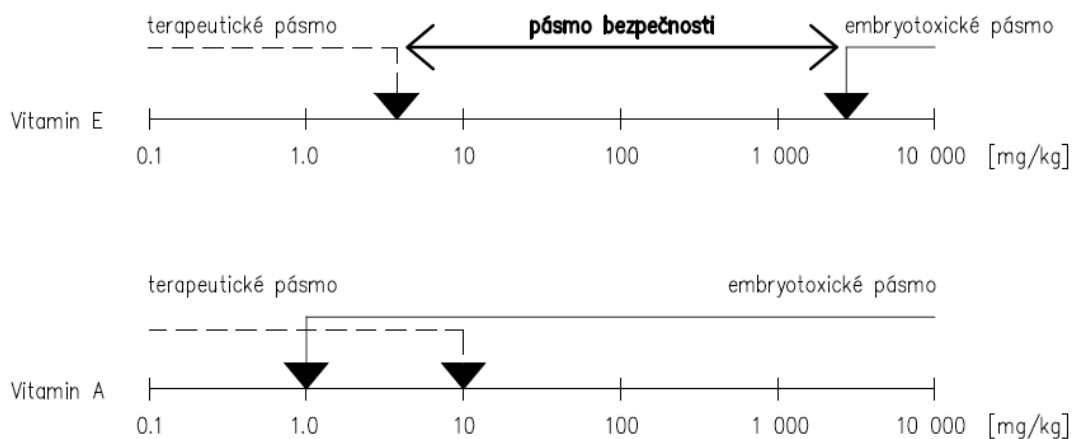
### 1.1.3 Vymezení základních pojmů

S teratologií, jakožto vědním oborem, souvisí některé základní pojmy. Pod pojmem *teratogeneze* rozumíme vznik a vývoj vrozené vady. *Vrozenou vadu* lze definovat jako trvalou odchylku struktury, funkce či biochemismu, která vznikla prenatálně, a to narušením vývojových procesů. Většina zárodků s vývojovou vadou prenatálně zaniká, ale pokud se nositelé vývojové vady narodí, pak se tato vývojová vada stává *vadou vrozenou*. Vrozené vady dělíme podle jejich příčiny na *strukturální*, *funkční* (včetně behaviorálních defektů) a *biochemické* (Jelínek et al., 1996).

*Teratogen* je takový faktor vnějšího prostředí, který je schopný vyvolat vývojovou vadu a zvýšit tak výskyt vrozených vad v populaci, avšak tato vrozená vada není dědičná. Teratogeny mohou být povahy biologické, chemické nebo fyzikální. Teratogeny nemůžeme hodnotit pouze z hlediska kvalitativního, tedy že faktor vnějšího prostředí vyvolá vývojovou vadu, ale je nutné brát v úvahu i hledisko kvantitativní, tj. výši dávky působícího faktoru (Peterka a Novotná, 2010). Platí, že kterýkoliv vnější faktor chemické povahy je schopný od určité dávky vyvolat některý z projevů embryotoxicity - teratogenitu, letalitu či růstovou retardaci. Vznik vývojové vady je tedy prahovým jevem, proto nelze látky dělit na látky teratogenní a bezpečné bez uvedení expoziční dávky. Jakýkoli vnější faktor je totiž v malých, podprahových dávkách neškodný (Jelínek et al., 1996).

Obecnou vlastností vnějších faktorů, teratogenů, je *embryotoxicita*. Embryotoxicita se na zárodku může projevit třemi možnými poškozeními. K těmto poškozením patří: *teratogenita* (vznik strukturální vady), *letalita* (smrt zárodku) a *růstová retardace*. Všechna tato poškození se mohou u zárodku vyskytovat buď samostatně, nebo v kombinaci. Minimální dávka teratogenu, která je schopná se projevit embryotoxickým efektem, ohraničuje tzv. *začátek pásma embryotoxicity*. Rozdíl mezi začátkem pásma

embryotoxicity a terapeutickou/expoziční dávkou určité látky se nazývá tzv. *pásma bezpečnosti* (Peterka a Novotná, 2010). Čím širší je pásmo bezpečnosti pro danou látku, tím bezpečnější je její použití během těhotenství. Naopak pokud se překrývá pásmo embryotoxicity s terapeutickým pásmem, pak hrozí nebezpečí teratogenního působení této látky na zárodek (viz Obr. 2).

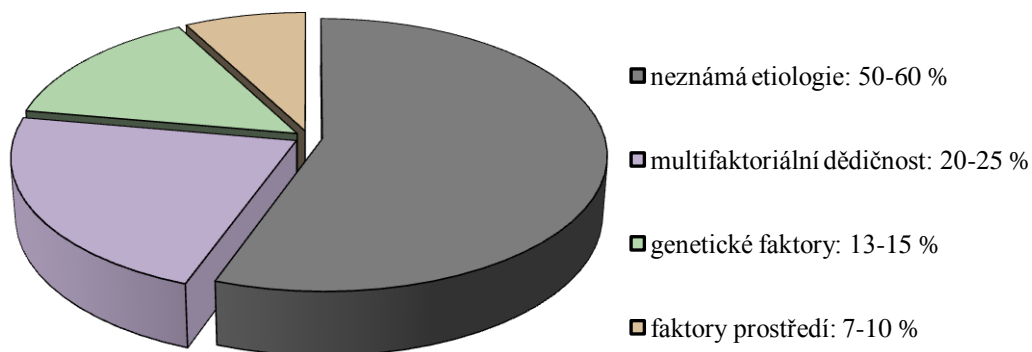


Obr. 2: Pásma bezpečnosti (upraveno podle Peterka a Fára, 1990).

#### 1.1.4 Příčiny vzniku vrozených vad a jejich četnost

Příčiny vzniku vrozených vad u člověka mohou být buď povahy genetické, nebo mohou být způsobeny faktory vnějšího prostředí. Velké množství vrozených vad však vzniká spolupůsobením genetických a zevních faktorů. V tomto případě mluvíme o multifaktoriální dědičnosti, která má na svědomí přibližně 20 až 25 % vrozených vad. Samotné genetické faktory způsobují přibližně 15 % vrozených vad, faktory vnějšího prostředí, tedy teratogeny, odpovídají za 7 až 10 % vad. U zbylých 50 až 60 % vrozených vad není jejich příčina známá (Moore a Persaud, 2002).





Obr. 3: Grafické znázornění kategorií příčin vzniku vrozených vad u člověka (upraveno podle Moore a Persaud, 2002).

I přes prenatální diagnostiku se u nás podle Ústavu zdravotnických informací a statistiky ČR ročně rodí přes 3 % novorozenců s vrozenou vadou (ÚZIS ČR, 2011), avšak ne všechny tyto vady jsou odhaleny hned po narození dítěte. Dalších asi 5 % vrozených vad je odhaleno později, v průběhu postnatálního vývoje dítěte (Kučera, 1989). K těmto později odhaleným vadám patří především poruchy metabolismu, vnitřních orgánů či chování.

U spontánních abortů lze nalézt vývojovou vadu v 19 % případů (Shepard et al., 1989). Za prenatální ztráty během prvního trimestru (hlavně pak během prvních dvou týdnů těhotenství) jsou z více jak 50 % odpovědné chromozomální aberace, které jsou tvořeny z 50 % trisomiemi, z 20 % monosomií X, z 15 % triploidii a 5 % tvoří tetraploidie (Verma a Thakur, 2007).

### 1.1.5 Podmínky vzniku vývojových vad

Průběh teratogeneze je ovlivněn značným množstvím proměnných. S teratogenezí úzce souvisí pojmy kritická perioda, senzitivní perioda, dávka a genotyp zárodku (Moore a Persaud, 2002). Jako *kritickou periodu* označujeme takovou fázi vývoje, kdy lze vyvolat vývojovou vadu orgánu (viz Tab. 1). Dosáhne-li kritická perioda určitého orgánu svého prahu, tzv. *terminačního bodu*, pak již nelze během dalšího vývoje vadu tohoto orgánu

vyvolat. Fázi vývoje, při které se diferencující se buňky stávají senzitivními vůči působení určitého agens, označujeme jako *periodu senzitivní*. Podmínkou vzniku vývojové vady je překryv obou výše zmíněných period (Peterka a Novotná, 2010). Další podmínkou pro vznik vývojové vady je, aby teratogen působil v dostatečně vysoké *dávce*, tedy za hranicí začátku pásma embryotoxicity (Jelínek et al., 1996). V neposlední řadě se na celkovém postižení zárodku podílí i jeho genotyp (Moore a Persaud, 2002).

Tab. 1: Morfogenetické kritické periody lidského plodu (upraveno podle Jelínek et al., 1996).

systém	dny
CNS	16 - 37
KVS	20 - 40
končetiny	24 - 36
oko	22 - 40
obličej	28 - 57
zevní genitálie	45 - 63

Vývojové vady mohou být důsledkem mnohočetného těhotenství. Pro jednočetná těhotenství je pravděpodobnost vzniku vývojové vady asi 1.32 %, pro dvojčata 4.60 % a pro trojčetná těhotenství je to 10.34 %. Platí tedy, že čím četnější těhotenství, tím větší pravděpodobnost možného poškození zárodku (Onyskowová et al., 1970).

Vrozené vady dělíme na izolované, nebo mnohočetné. Z hlediska klinické závažnosti mohou být rozděleny na vrozené vady významné či nepodstatné a na velké a malé. *Velké vrozené vady* neboli monstrosity vznikají během embryonální a časně fetální fáze vývoje. Projevují se na úrovni orgánů, orgánových soustav či organismu. Velké vrozené vady jsou strukturálními defekty, které jsou zřejmé na první pohled. *Malé vrozené vady* vznikají přibližně od 9. týdne těhotenství, projevují se na úrovni tkáňové, buněčné či subbuněčné. Tyto vady nejsou na první pohled viditelné (Peterka a Novotná, 2010).

### 1.1.6 Principy teratogeneze

U savců je expozice zárodku plně závislá na farmakokinetice, hlavně pak na biotransformaci (biologická přeměna, metabolismus) dané látky mateřským organismem. Farmakokinetika látky vykazuje značné individuální, vnitrodruhové i mezidruhové rozdíly,

kteřé jsou podmíněné především genotypem mateřského organismu. Látká se tedy k cílovému orgánu nemusí dostat jen ve své původní podobě, ale i jako specifický metabolit této látky, který vznikl v mateřském organismu, v placentě nebo v samotném zárodku (Jelínek et al., 1996).

Incidence a stupeň poškození zárodku v závislosti na zvyšující se dávce nejprve stoupají, avšak po dosažení určitého limitu (maxima) jejich absolutní počet klesá. Znamená to, že embrya s vývojovou vadou menšího stupně jsou nahrazována embryi s těžším stupněm poškození a že malformovaná embrya jsou postupně nahrazena embryi mrtvými. Tedy, s dávkou přibývá těžce malformovaných zárodků na úkor lehce malformovaných a po dosažení maxima začíná výskyt malformovaných zárodků klesat v souvislosti s jejich vymíráním. Z tohoto plyne, že počet jedinců s vrozenou vadou při narození není vhodným ukazatelem embryotoxicity dané látky. Tam, kde působí teratogenní agens ve vysoké dávce, se nemusí narodit žádní malformovaní jedinci, protože prenatalně zaniknou (Jelínek et al., 1996).

### **1.1.7 Teratogeny**

Jak již bylo popsáno výše, teratogeny jsou faktory vnějšího prostředí, které jsou schopné vyvolat vývojovou vadu a zvýšit tak výskyt vrozených vad v populaci. Teratogeny mohou být povahy biologické, chemické či fyzikální.

K nejdéle známým teratogenům biologické povahy patří virus zarděnek. Tento virus prostupuje placentou a postihuje plod. Typické pro jedince postižené prenatalně virem rubeoly jsou srdeční vady a šedý zákal (Gregg, 1941).

Mezi významné chemické teratogeny lze počítat thalidomid postihující především vývoj končetin (Lenz, 1961; McBride 1961) nebo vitamin A způsobující hlavně kraniofaciální anomálie (Cohlan, 1953; Lammer et al., 1985).

Známým teratogenem fyzikální povahy je například ionizující záření, které má na svědomí zvýšené množství spontánních abortů (Fucic et al., 2008) či zvýšený výskyt rakoviny u dětí, které byly *in utero* tomuto záření vystaveny (Stewart et al., 1956).

### **1.1.8 Prevence vrozených vad**

Preventivní metody bývají často klasifikovány jako *primární* (aktivní) a *sekundární* (pasivní). Cílem primárních preventivních metod je zabránit vzniku vývojové vady. Jejich důležitou součástí je plánované těhotenství, jehož smyslem je snaha o snížení

rizika narození jedince s vrozenou vadou na minimum. Sekundární preventivní metody slouží k časně detekci vývojových vad. Po tom, co byla vývojová odhalena, je snaha navrhnout léčbu, která by kompenzovala efekt vývojové vady na organismus. Není-li možné využít léčebných postupů, může dojít v indikovaných případech k zabránění narození těchto plodů. Je důležité si uvědomit, že devět z deseti zárodků, které jsou postiženy vývojovou vadou, jsou spontánně potraceny. Přirozená selekce je tedy prozatím nejúčinnějším přírodním nástrojem prevence vzniku vrozených vad (Czeizel et al., 1993; Jelínek et al., 1996).

Metody prenatalní diagnostiky (sekundární prevence) mohou být *neinvazivní*, kam patří například vyšetření ultrazvukem, jehož cílem je odhalit strukturální vady, a *invazivní*, kam zahrnujeme např. injekční techniky. Cílem injekčních metod je získat vzorek amniové tekutiny (amniocentéza), placenty (odběr choriových klků, tzv. CVS) či fetální krve (kordocentéza, tzv. CC). Současné invazivní metody představují nízké riziko pro plod, přesto někdy může dojít k jeho poškození nebo dokonce k potratu. Prenatální diagnostika slouží k informování a připravení rodičů na to, že se jim může narodit postižené dítě. Dále umožňuje i léčbu *in utero* (Bewley, 2003), např. vrozené brániční kýly (Harrison et al., 1998) či vrozeného srdečního bloku (Copel et al., 1995), a nakonec umožňuje ukončení těhotenství s ohledem na postižení plodu (Bewley, 2003) a přání rodičů.

## 1.2 Testování embryotoxicity a detekce teratogenů

V současné době musí každý nový lék projít sérií preklinických i klinických testů. Součástí preklinických testů jsou i testy toxikologické, které zahrnují tzv. speciální toxikologické zkoušky, ty zkoumají účinky nového preparátu na reprodukci, karcinogenitu a mutagenitu. Pod testy na reprodukční toxicitu spadá i testování embryotoxicity léku (Jelínek et al., 1996).

### 1.2.1 Pohled do historie

Historie teratologických testů není příliš dlouhá a lze ji v podstatě rozdělit na dvě období, a to na období před a po zkušenostech s thalidomidem. Sledování působení vnějších faktorů na březí samice, s cílem zjistit embryotoxický účinek, začalo již na počátku minulého století, kdy byl zjištěn negativní vliv radiace či malnutrice na vyvíjející se zárodek. Tyto testy představovaly první teratologické zkušenosti v experimentu na laboratorních savcích. V roce 1949 ve Spojených státech amerických vydalo oddělení

farmakologie *Food and Drug Administration* (FDA) předpis o testování embryotoxicity. Týkal se především detekce vlivu látek na fertilitu a reprodukční orgány po tři následující generace zvířat. Tomuto testování po tři následující generace se dodnes říká „třígenerační reprodukční studie“ (Jelínek et al., 1996).

V roce 1962, opět ve Spojených státech amerických, byla založena *Commission on Drug Safety*, která ustanovila teratologickou komisi. Jejím záměrem bylo zajištění rychlého a spolehlivého testu na zvířeti, schopného odhalit teratogenní efekt látek (Jelínek et al., 1996). Jako reakci na thalidomidovou aféru uspořádala *Commission on Drug Safety* v roce 1963 konferenci v USA, jejímž účelem bylo diskutovat prenatální efekt léků. Neustálý dialog mezi *Commission on Drug Safety* a experty v oblasti reprodukční biologie a teratologie vyvrcholil v roce 1966 ve vydání tzv. FDA Guidelines, resp. *Guidelines for Reproduction Studies for Safety Evaluation of Drugs for Human Use*, které obsahovaly oficiální návod na testování (Schardein, 1985). Tyto předpisy se sice do současnosti značně pozměnily, avšak stále slouží jako prototyp oficiálních testů (Jelínek et al., 1996).

Doporučení WHO (*World Health Organization*) z roku 1967 uvádí, že teratogenní efekt látek je vhodné testovat na myších, krysách, králících, ale i prasatech, psech, kočkách a opicích, nedoporučuje však testování na kuřecích zárodcích, protože zárodky kuřete jsou příliš senzitivní vůči velkému množství látek a nenabízí ani anatomickou, ani fyziologickou paralelu s vyvíjejícím se savčím zárodkem. Testovaná látka by měla být pokud možno aplikována stejnou cestou, jaká je uvažována pro klinickou praxi, a to ve vysoké, střední a nízké dávce, zhruba odpovídající zamýšlené terapeutické dávce. Hodnotí se počty resorpcí, mrtvých i živých plodů, dále jejich hmotnost, abnormality zevně viditelné i ty zjistitelné z histologických řezů. K detekci teratogenních látek a k ověřování testů na laboratorních savcích se využívají i data z epidemiologických studií lidské populace. Výsledky těchto dvou přístupů se navzájem konfrontují (WHO, 1967).

### **1.2.2 Doporučení OECD**

Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (OECD) přijala roku 2001 směrnice týkající se prenatálních toxikologických studií. Testování by mělo probíhat na jednom hlodavci (nejlépe na kryse) a jednom ne-hlodavci (nejlépe králíkovi). Látka by měla být testována nejméně ve třech dávkách. Nejvyšší dávka by měla mít za následek buď vývojovou toxicitu, nebo by měla mít toxický efekt na mateřský organismus, ale neměla by způsobit smrt. Střední dávka by měla mít minimální toxický efekt a nejnižší dávka by

neměla mít ani toxický efekt na matku, ani by neměla způsobit vývojovou toxicitu. Testovaná látka by měla být podávána orálně v dávce, která je přizpůsobena aktuální tělesné hmotnosti testovaného zvířete (OECD, 2001).

### 1.2.3 Nedostatky současných oficiálních testů

Hlavní nedostatky současných oficiálních testů na laboratorních savcích jsou v podstatě dva. Prvním nedostatkem je, že tyto testy neuvažují teratogenezi jako prahový jev a tím popírají existenci neúčinného dávkového pásma. Ve výsledku to znamená, že za teratogen může být považována jakákoli látka, u níž byl při pokusech na laboratorních zvířatech prokázán teratogenní efekt, přestože účinné dávky dalece přesáhly maximální možnou expozici u člověka. Druhým nedostatkem je, že výsledky získané z testování na laboratorních savcích nelze spolehlivě přenášet na člověka, což je způsobeno tím, že farmakokinetika i biotransformace látky vykazuje značné individuální, vnitrodruhové i mezidruhové rozdíly. Látka se tedy k zárodku nemusí dostat jen ve své původní podobě, ale i jako specifický metabolit této látky, který je charakteristický pro daný živočišný druh, a u člověka tento metabolit buď nevzniká, nebo vzniká v nižší či vyšší míře (Jelínek et al., 1996). Kvůli tomu, že je mateřský organismus prokázaným zdrojem mezidruhové variability při testování potenciálních teratogenů, začaly být využívány alternativní metody.

### 1.2.4 Alternativní přístup

K těmto alternativním metodám patří různé *in vitro* testy nebo metody aplikace testované látky *in ovo* (Peterka a Novotná, 2010). Systémy *in vitro* lze dělit do několika kategorií podle použitého modelu, a to na: (1) buněčné linie, (2) kultury primárních buněk, (3) kultivace neplacentálních embryí obratlovců i bezobratlých a (4) kultivace savčích embryí a primordií. Podle *European Center for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM) a *European Teratology Society* (ETS) jsou dobře zavedenými alternativními metodami schopnými detekovat efekt mnohých látek s možností aplikace poznatků na tělesný vývoj embrya čtyři systémy. Mezi tyto systémy patří metoda FETAX využívající embryí drápatek (*Xenopus*), kultivace buněčných mikromas, kultivace celých savčích embryí a také metoda CHEST (*Chick Embryotoxicity Screening Test*) (Brown et al., 1995).

### 1.2.5 Metody využívající zárodků kuřete

Metody využívající testování na zárodcích kuřete můžeme obecně rozdělit do dvou skupin, a to na metody *in vitro* a *in ovo*.

*In vitro* metody využívající kuřecího zárodku mají více jak stoletou historii. (Stern a Bachvarova, 1997). Nejjednodušší metody kultivace kuřecích zárodků *in vitro* vycházely z toho, že byl celý obsah vejce vylit do vhodné nádoby, která byla zajištěna proti přílišnému odpařování jejího obsahu a proti průniku patogenních agens víčkem (např. Assheton, 1896; Auerbach et al., 1974). Jednou z nejúspěšnějších metod počátku 30. let minulého století byla metoda podle Waddingtona (1932), která vychází z metody kultivace tkání vyvinuté Fellem a Robinsonem (1929). Waddington (1932) přenesl kuřecí blastoderm s částí vitelinní membrány na hodinové sklíčko a zárodek inkuboval. Dá se říci, že revoluci v kultivaci kuřecích zárodků *in vitro* přinesla metoda podle New (1955), která se pak stala inspirací pro řadu dalších metod (např. Kučera a Burnand, 1987; Chapman et al., 2001). Rozdíly mezi jednotlivými *in vitro* metodami souvisí nejvíce se třemi faktory. Mezi tyto faktory patří způsob přenosu zárodku na hodinové sklíčko či Petriho misku, složení kultivačního prostředí (sraženina krevní plazmy, bílek, zcela syntetická živná média, atd.) a také délka inkubace zárodku. Většina *in vitro* metod zahrnuje pouze inkubaci časných stádií vývoje zárodku (např. New, 1955), ale byla snaha vyvinout i metody, které by pokryly delší úsek inkubace zárodku (např. Auerbach et al., 1974), nebo dokonce celý její rozsah (Perry, 1988).

V rámci teratologických *in vitro* metod se nejčastěji využívá několika způsobů vystavení zárodku kuřete testované látce. Ta může být součástí živného média (např. Kučera a Burnand, 1987) nebo „soaked bead“. Účinek látky může být také testován za využití transplantace tkání (*grafting*) (např. Chapman et al., 2001).

Vedle *in vitro* metod existuje i celá řada metod *in ovo*, které využívají kultivace kuřecích zárodků ve svém přirozeném prostředí. *In ovo* metody se liší způsobem aplikace testované látky. Testovaná látka je aplikována např. do žloutku (např. McLaughlin, 1963), do bílku (např. Phelps a Gildersleeve, 1995), do vzduchové bubliny (např. Henshel et al., 2002), na skořápku vejce nebo skrze okénko ve vejci. V případě okénkových metod může být testovaná látka aplikována celou řadou způsobů, a to přímo na povrch vitelinní (žloutkové) membrány či na vitelinní cévy, alantois (např. Caujolle et al., 1967) nebo na chorioalantoidní membránu (např. Ringway a Karnofsky, 1952), do subblastodermálního

(subgerminální) prostoru (např. Van Dongen, 1964; Jelínek, 1977; Griffith a Wiley, 1991) a také do prostoru amnia (např. Jelínek, 1977).

V této diplomové práci byly použity dvě alternativní metody, obě využívající kuřecího zárodku. První z nich byla již zmíněna a běžně používaná *in ovo* metoda CHEST a druhou byla nová, námi vyvinutá *in vitro* metoda SANDWICH, která umožňuje vývoj zárodku na živném médiu v přítomnosti testované látky. Obě tyto alternativní metody budou blíže popsány v kapitole „Metody“.

### **1.2.6 Výhody využití kuřecího zárodku jako modelového organismu**

Využití zárodku kuřete jako modelového organismu pro testování embryotoxicity látek má několik výhod: (1) kuřecí zárodky jsou snadno dostupné; (2) poměrně levné v porovnání s jinými obratlovci (savci); (3) zárodky kuřete se snadno vystavují působení potenciálního teratogenu, snadno se inkubují a jednoduše se s nimi manipuluje; (4) každý kuřecí zárodek reprezentuje jednu testovanou jednotku; (5) každému zárodku je látka aplikována individuálně a nakonec (6) zárodky jsou izolovány od mateřského organismu (Henshel et al., 2002).

### **1.2.7 Tradiční vs. alternativní přístup**

Jsou tedy lepší tradiční metody, využívající laboratorní savce, nebo alternativní metody, které eliminují vliv mateřského organismu při působení potenciálního teratogenu? Každá metoda, využívající aplikace látky cestou mateřského organismu, vnáší do systému neznámý faktor, jenž ovlivňuje výsledek rozhodujícím způsobem. Pokud však využijeme testovacího postupu, který využívá přímé aplikace látky do bezprostředního okolí zárodku, pak zanedbáváme možnost modifikace tohoto teratogenního faktoru (Rychter a Jelínek, 1978).

Ač mají metody testování embryotoxicity na laboratorních zvířatech své nedostatky, je důležité si uvědomit, že většina prokázaných lidských teratogenů měla teratogenní efekt alespoň na jednom laboratorním zvířeti. Tím pádem lze říci, že na základě pozitivních výsledků získaných ze studií na zvířatech, lze usuzovat na jeho potenciální efekt u člověka. Jak již bylo zmíněno výše, je nutné, při vyhodnocování rizik pro člověka, brát v úvahu nejen genetickou heterogenitu, variabilitu v příjmu potravy a velikost daného organismu, ale i minulá nebo současná onemocnění či variabilitu v transportu přes placentu (Schardein, 1985).



## 1.3 Vitaminy

Vitaminy jsou látky, které jsou v nízkých dávkách nezbytné pro správný růst, vývoj a činnost celého organismu. Vitaminy jsou látky chemicky velmi rozdílné, jimž je společné, že buď nejsou organismem syntetizovány vůbec, nebo jen v nedostačujícím množství. Proto je lidský organismus musí přijímat jako součást potravy nebo jako doplňky stravy. Vitaminy můžeme rozdělit do dvou skupin, na vitaminy *v tucích rozpustné*, kam patří vitaminy A, D, E, K, a na vitaminy *rozpustné ve vodě*. Mezi ve vodě rozpustné vitaminy počítáme vitamin B a C. Funkce vitaminů je různá, ale nejčastěji se účastní katalyckých reakcí jako koenzymy, ale mají význam např. i v procesu vidění či srážení krve. Nedostatek vitamínu je označován jako *hypovitaminóza*, úplné chybění vitamínu jako *avitaminóza*. Je-li vitamínu v těle jedince nadbytek, hovoříme o tzv. *hypervitaminóze* (Wilhelm, 1988; Vokurka et al., 2004).

## 1.4 Terminologie: retinoidy a vitamin A

Existuje celá řada poměrně odlišných definic toho, co jsou retinoidy a vitamin A. V této diplomové práci budeme pod pojmem *retinoidy* rozumět skupinu látek, která zahrnuje přirozeně se vyskytující deriváty vitamínu A, jako jsou retinol, retinal či kyselina retinová, ale také celou řadu syntetických analogů bez ohledu na to, zda vykazují biologickou aktivitu (Sporn a Roberts, 1985).

Pod termínem *vitamin A* se v této diplomové práci rozumí všechny  $\beta$ -jonové deriváty (kromě karotenoidů), které vykazují biologickou aktivitu retinolu, tedy retinol, retinal a estery retinolu (Bendlich a Langseth, 1989).

## 1.5 Vitamin A

Jak bylo uvedeno výše, *vitamin A* zahrnuje všechny  $\beta$ -jonové deriváty (kromě karotenoidů), které vykazují biologickou aktivitu retinolu, tedy retinol, retinal a estery retinolu (Bendlich a Langseth, 1989).

Základní molekulou nejen retinoidů, ale i vitamínu A je *all-trans retinol* neboli vitamin A1, což je primární alkohol, jehož sumární vzorec je  $C_{20}H_{30}O$  a molární hmotnost je 286.45 g/mol. Retinol je přítomný v potravě i ve tkáních především jako ester. Ester je tvořen retinolem a mastnou kyselinou, hlavně pak kyselinou palmitovou (Bates, 1995). Retinol je téměř bezbarvý, v tucích rozpustný, nenasycený alkohol s pěti dvojnými

vazbami. Díky přítomnosti dvojných vazeb může retinol existovat v různých izomerních formách (*cis* a *trans*). Biologicky nejaktivnějším izomerem je *all-trans* retinol. Strukturální změny v molekule jsou důsledkem působení vlhkosti, tepla, světla a katalyzátorů. Jako vitamin A2 se označuje *3-dehydroretinol*, který byl izolován z ryb. Oproti vitaminu A1 má o jednu dvojnou vazbu v  $\beta$ -jonovém kruhu navíc a pouze 40 % jeho biologické účinnosti (McDowell, 2000).

Nahrazením alkoholové skupiny retinolu za aldehydovou skupinou vznikne *retinal*, nahrazením za karboxylovou skupinu vznikne *kyselina retinová*. Retinol spolu s mastnými kyselinami vytváří estery, tzv. *estery retinolu*, které se typicky nachází v živočišné stravě. V rostlinné stravě se vitamin A sám o sobě nenachází, ale je zde přítomný jako jeho prekurzor, provitamin A (McDowell, 2000).

Je důležité si uvědomit, že retinol, retinal a další metabolity, které z nich lze vratně získat, mají významnou funkci především při vidění, reprodukci, ale i při růstu. Zato kyselina retinová, vznikající nevratně z retinalu, se vidění, a u většiny druhů ani reprodukce neúčastní (Olson, 1996), je však zodpovědná hlavně za růst a diferenciaci většiny buněk (Obr. 4). Fakt, že se kyselina retinová neúčastní procesů jako je vidění či reprodukce, může být vysvětlen tím, že vznik kyseliny retinové z retinalu je nevratným dějem (Ross, 1993).

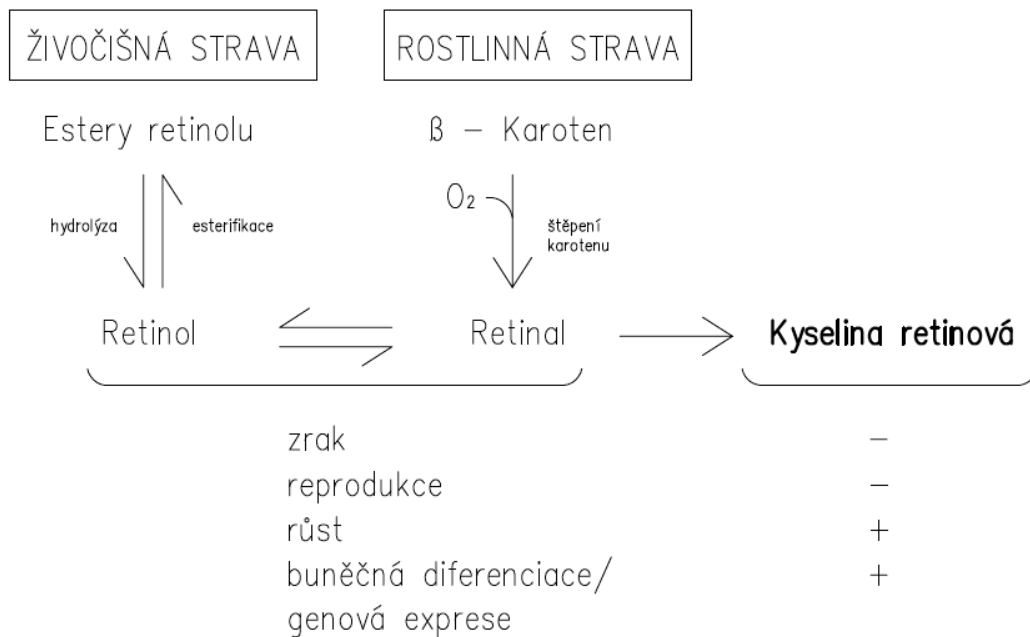
Vitamin A je důležitou látkou pro všechny živočišné druhy, protože má v organismu podstatnou roli. Všechny funkce vitaminu A jsou kritické především během proliferace, růstu a vývoje tkání, tedy v období prenatalním a v období dětství. V časném embryonálním vývoji musí být množství vitaminu A přísně regulováno tak, aby nebyl vyvíjející se zárodek vystaven ani příliš nízkým, ani příliš vysokým dávkám vitaminu, protože oba tyto stavy mohou mít teratogenní účinek (Underwood, 1994). Správné množství vitaminu A je důležité také v postnatálním období, protože jeho nedostatek i nadbytek způsobuje vážné zdravotní potíže. Deficit vitaminu A je typický především pro rozvojové země, kde je také nejčastější příčinou dětské slepoty (McDowell, 2000).

Vitamin A je pro člověka esenciální a musí ho tedy přijímat v potravě buď jako vitamin, nebo jako prekurzor vitaminu - provitamin, protože jej neumí sám syntetizovat. Vitamin A, který je přijímán ve vyšší míře, než je denní potřeba organismu, je ukládán v játrech. Vitamin A takto uložený umožňuje člověku uspokojit svou denní potřebu i v době, kdy nepřijímá z potravy jeho dostatečné množství. Zásoba vitaminu A v játrech

může organismu, za nedostatku jeho přijímání z potravy, posloužit na dobu i několika měsíců (Bauernfeind, 1980).

Běžnými zdroji vitamínu A jsou mléčné výrobky jako mléko, sýr či máslo, dále pak vejce a vnitřnosti, především pak játra. Důležitý zdroj vitamínu A nalezneme i v rybách (sleď, tuňák, atd.) (Olson, 2001).

Hlavními reakcemi metabolismu vitamínu A jsou esterifikace, oxidace, konjugace, izomerace a odštěpení uhlovodíkového řetězce (McDowell, 2000).



Obr. 4: Biochemické vztahy mezi retinoidy přijímanými v živočišné a rostlinné potravě a mezi retinoidy působícími uvnitř buňky (upraveno podle Ross, 1993)

## 1.6 Kyselina retinová

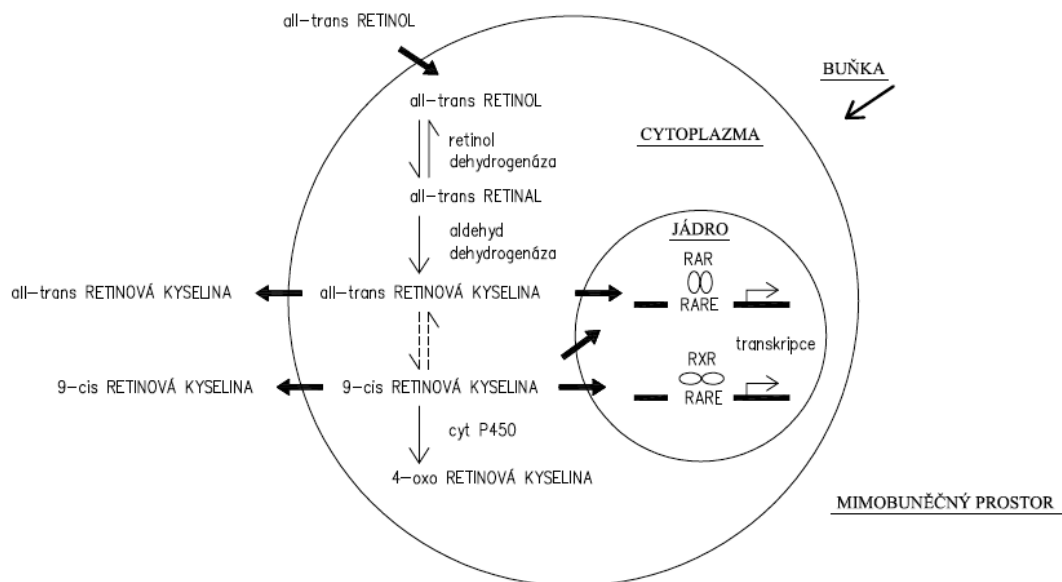
Kyselina retinová (*retinoic acid*, RA) je látka patřící mezi retinoidy, jejíž sumární vzorec je  $C_{20}H_{28}O_2$  a molární hmotnost 300.4 g/mol. Kyselina retinová je tvořena nažloutlým práškem, který je rozpustný v tucích.

Kyselina retinová má schopnost působit jako morfogen. Morfogen je lokálně produkovaná signální molekula, která účinkuje na dálku tak, že určuje uspořádání okolních buněk v závislosti na své koncentraci. Morfogen musí být schopný difúze z místa, ve kterém je produkován, aby tak mohl vytvořit koncentrační gradient (Blomhoff a Blomhoff,

2006). Kyselina retinová je tedy velmi důležitý modulátor buněčného přežití, proliferace, diferenciaci, regionalizace a organogeneze ve vyvíjejícím se embryu (Campo-Paysaa et al., 2008).

Kyselina retinová se vyskytuje v několika stereoizomerních formách. Nejběžnější formou je *all-trans* retinová kyselina (*retinoin*, ATRA), ale existují i méně stabilní isomery, jako je *13-cis* (*isotretinoin*) a *9-cis* (*alitretinoin*) retinová kyselina. Všechny tyto formy kyseliny retinové ochotně podléhají oxidaci nebo izomeraci v přítomnosti světla nebo nadměrného tepla (Armstrong et al., 2005).

Vznik kyseliny retinové probíhá ve dvou krocích. V prvním kroku vznikne z transkripčně inaktivního prekurzor kyseliny retinové, retinolu, oxidací retinal (*retinaldehyd*). Enzym, který katalyzuje tuto reakci, se nazývá *dehydrogenáza*. Ve druhém kroku dochází k oxidaci retinalu na kyselinu retinovou. Tato oxidace je zajištěna dvěma typy enzymů, buď *aldehyd dehydrogenázou* (ADH či RALDH) nebo *aldehyd* či *xantin oxidázou*. Katabolismus kyseliny retinové je zajišťován jedním členem z rodiny cytochromů P450, a to konkrétně *CYP26* (viz Obr. 5). Funkcí tohoto enzymu je utlumení signalizace kyseliny retinové v buňkách poté, co tyto buňky obdržely signál a náležitě na něj odpověděly (McCaffery a Dräger, 2000).



Obr. 5: Shrnutí procesu vzniku a působení kyseliny retinové (upraveno podle McCaffery a Dräger, 2000).

Uvnitř buňky se kyselina retinová váže na cRABP (*cellular retinoic acid binding protein*). V prvním případě putuje komplex RA-cRABP k jádru, v jeho blízkosti se kyselina retinová přesune z cRABP na jeden ze dvou typů jaderných receptorů (RA receptory) označovaných jako RAR nebo RXR. Vazba kyseliny retinové na jaderný receptor ovlivní genovou expresi a nakonec vede i ke změně proteinové produkce. Ve druhém případě se komplex RA-cRABP pohybuje směrem k mikrozomu, kde je z kyseliny retinové vytvořen retinoyl-CoA, který je následně přenesen na protein. Tento proces přenesení kyseliny retinové na protein se nazývá retinoylace (*retinoylation*), jedná se o acylaci proteinu kyselinou retinovou. Tento acylovaný protein se poté přesune do jádra, kde, stejně jako v prvním případě, ovlivňuje expresi genů (Takahashi, 2010).

cRABPs jsou buněčné vazbené protiny, jejichž obecnou funkcí je zpřístupnit retinoidy buněčným enzymům/proteinům, které zajistí jejich specifickou metabolickou transformaci a nakonec odpovídají i za regulaci koncentrace volně se vyskytujících retinoidů (Fiorella et al., 1993). Specifickou funkcí cRABP-I je, že ovlivňuje vnitrobuněčnou koncentraci kyseliny retinové usnadněním jejího metabolismu, a zároveň má také schopnost měnit jak typ, tak množství jejich metabolitů přítomných v buňce (Boylan a Gudas, 1992). Naopak funkce cRABP-II se zdá být taková, že interaguje s RARs a podílí se na tvorbě RANC (*retinoic acid nuclear complex*), který zprostředkovává aktivaci vybraných genů. cRABP-II je tedy regulátor transkripce, který se účastní signalizace využívající kyseliny retinové (Delva et al., 1999).

Velké množství biologické aktivity vitamínu A je zprostředkováno pomocí *all-trans* nebo *9-cis* retinové kyseliny. Aktivita kyseliny retinové je zajišťována díky dvěma třídám jaderných receptorů (Desvergne, 2007). Obě třídy receptorů patří do steroid/thyroidní rodiny a receptory obou těchto tříd se vyskytují ve třech subtypech, tedy jako  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$  (Mey a McCaffery, 2004). RAR (*retinoic acid receptors*) vážou jak *all-trans*, tak *9-cis* retinovou kyselinu. Funkce RAR je dominantní především v období embryogeneze a organogeneze. Druhá třída receptorů, tzv. RXR (*retinoid receptors*), váže výhradně *9-cis* kyselinu retinovou. RAR i RXR patří do rodiny jaderných receptorů, která představuje největší skupinu transkripčních faktorů. Pro jaderné receptory sloužící jako transkripční faktory je typické, že jsou aktivovány vazbou specifického ligandu (v tomto případě kyselinou retinovou) a že se vážou na specifické vazebné místo (*specific response elements*), které je lokalizováno převážně v promotorech cílových genů.

V případě kyseliny retinové a jejích receptorů se specifická vazebná místa nazývají RAREs (*retinoic acid response elements*) (Desvergne, 2007).

## 1.7 Toxicita vitamínu A

Rozlišujeme dva, resp. tři typy toxicity vitamínu A, a to toxicitu *akutní* a *chronickou* u dětí a dospělých, a toxicitu *teratogenní* u těhotných žen, která negativně ovlivňuje vývoj zárodku. *Akutní toxicita* je důsledkem jedné nebo několika vysokých dávek vitamínu během krátkého časového období. *Chronická toxicita* je naopak důsledkem středně vysokých dávek, které jsou brány pravidelně, většinou denně, po dobu několika měsíců či let. *Teratogenní* účinek je důsledkem konzumace středních až vysokých dávek vitamínu A (v důsledku akutního i chronického příjmu) během prvního trimestru těhotenství (Olson, 2001).

## 1.8 Teratogenní účinek retinoidů, hlavně pak vitamínu A

Teratogenní účinek retinoidů, hlavně pak vitamínu A, může být důsledkem jejich nepřiměřeného (nadměrného) užívání během prvního trimestru těhotenství (Olson, 2001). Negativně však může v době těhotenství na zárodek působit i deficit vitamínu A (např. Smets et al., 2006). Teratogenní účinek nadbytku i nedostatku retinoidů, především vitamínu A, v době gravidity byl prokázán nejen na laboratorních zvířatech, ale i na člověku.

### 1.8.1 Teratogenní účinek hypovitaminózy A u člověka

Teratogenní účinek nedostatku vitamínu A během těhotenství byl popsán u ženy, u které se v důsledku deficitu vitamínu A rozvinula slepota. Tato žena porodila dítě před termínem. Dítě se narodilo s mikrocefalií a anoftalmií a zemřelo 24 hodin po porodu (Sarma, 1959). Další zaznamenaný případ se týkal ženy, která porodila dítě s očními defekty, konkrétně s mikroftalmií a kolobomem. Tyto vady byly důsledkem nedostatku vitamínu A během těhotenství (Lamba a Sood, 1968).

V současné době, ve vyspělých zemích, souvisí deficit vitamínu A během těhotenství především s léčbou morbidní obezity pomocí biliopankreatické diverze (BPD), která vede k intestinální malabsorpci. V souvislosti s intestinální malabsorpcí dochází často k rozvoji deficitu mikronutrient, jako jsou právě vitamíny. Smets et al. (2006) zaznamenali

případ ženy trpící nedostatkem vitamínu A v důsledku provedení BPD osm let před otěhotněním. Tato žena porodila dítě, které vykazovalo bilaterální mikroftalmii s cystickým kolobomem (Smets et al., 2006). Nejen bilaterální mikroftalmie, ale i mikrokornea, jizvy ve spodní části rohovky, malformované oční duhovky a hypoplázie optického nervu byly identifikovány u dítěte, jehož matka měla nedostatek vitamínů v tučných rozpustných, protože podstoupila BPD. Nejvýznamnější deficit se týkal vitamínu A, jehož hladina v séru byla navzdory jeho suplementaci během těhotenství kriticky nízká (Gilchrist et al., 2010). Hypovitaminóza A nezpůsobuje jen strukturální vady, ale souvisí také s vyšší pravděpodobností předčasného porodu dětí (Radhika et al., 2002).

### **1.8.2 Teratogenní účinek hypovitaminózy A u zvířat**

Historie zkoumání důsledků působení nedostatku vitamínu A na vyvíjející se zvířecí zárodek sahá až do 30. let minulého století. Hale publikoval v roce 1933 výsledky získané studiem potomků prasnice, která byla krmena potravou neobsahující vitamín A. Samice vrhla 11 mlád'at, z nichž všechna byla slepá. Deset z jedenácti mlád'at se narodilo živých, avšak většina z nich zemřela do několika minut po porodu (Hale, 1933). Teratogenní vliv hypovitaminózy A na vyvíjející se zvířecí zárodky se zjišťoval i u králíků. U mlád'at králíků, jejichž matky byly krmeny potravou neobsahující vitamín A, se vyskytoval hydrocefalus a často, spolu s ním, také stenóza Sylviova kanálku, dále pak křeče, paralýza a retrakce hlavy (Lamming et al., 1954). Publikace, která byla vydána o dva roky později, dokazuje, že procento hydrocefalických mlád'at, jejichž matky byly krmeny potravou neobsahující vitamín A po dobu delší dobu (24 až 28 týdnů), je vyšší než v případě mlád'at matek, které byly na této stravě po kratší dobu (12 až 15 týdnů) (Millen a Woollam, 1956). V další práci týkající se hypovitaminózy A a jejího teratogenního účinku na králíky se ukázalo, že jedinci s hydrocefalií mají zvýšený tlak cerebrospinální tekutiny (Millen a Dickson, 1957). Efekt nedostatku vitamínu A na plod se studoval také na kryších. Analýza vlivu mírného deficitu vitamínu A ukázala, že přísun vitamínu A pro plod je kritickým faktorem určujícím počet nefronů v ledvině. Počet nefronů plodu je tedy přímo závislý na vitaminovém stavu matky (Lelièvre-Pégorier et al., 1998). Další publikace týkající se krysu, ukázala, že chronický mírný nedostatek vitamínu A během březosti má za následek poškození růstu plic a vývoje celého organismu během posledních několika dnů gestace a také snížený počet potomků žijících při porodu (Antipatis et al., 2000).

### 1.8.3 Teratogenní účinek nadbytku vitamínu A, kyseliny retinové a jiných retinoidů u člověka

Isotretinoin (*13-cis* kyselina retinová, Accutane, Roaccutane®) je látkou s výrazným teratogenním účinkem, který se u člověka projevuje při terapeutických dávkách od 0.5 až 1.5 mg/kg/den (Adams a Lammer, 1993). Asi nejobsáhlejší publikace obsahuje analýzu 154 těhotenství, při kterých byl plod vystaven isotretinoinu. Důsledkem jeho působení v prvním trimestru došlo ke zvýšenému počtu spontánních abortů (12/154) a malformací plodu (21/154), mezi něž počítáme malformace lebky a obličeje, brzlíku, srdce a centrální nervové soustavy. Typickými kraniofaciálními malformacemi byly malé, nízko posazené uši s malým nebo zcela chybějícím boltcem, ageneze nebo stenóza vnějšího zvukovodu, mikrognácie, plochý vpáčený kořen nosu, rozštěp sekundárního patra a nenormálně vyvinuté kosti obličeje a kalvy. Mezi nejčastější vady srdce patřily konotrunkální defekty (Fallotova tetralogie, *truncus arteriosus persistens*, transpozice velkých cév, atd.). Především hydrocefalie, ale i mikrocefalie reprezentovaly nejfrekventovanější postižení centrálního nervového systému. Ne všem matkám vystaveným během těhotenství isotretinoinu se však narodilo postižené dítě. Ze 154 analyzovaných těhotenství bylo 36 těhotenství sledováno prospektivně. Z těchto 36 těhotenství skončilo osm spontánním abortem, jedno mrtvě rozeným malformovaným dítětem, čtyři narozením malformovaného dítěte a ve 23 případech se narodilo dítě zdravé. Zdravé děti tedy tvořily 64 procent případů (Lammer et al., 1985). V další publikaci se uvádí, že procento malformovaných jedinců, kteří byli vystaveni působení *13-cis* kyseliny retinové v prvním trimestru těhotenství, se pohybuje okolo 40 % (Koren et al., 2004). Podle ADRRS (*The Adverse Drug Reaction Reporting System*) bylo mezi lety 1982 až 1985 zaznamenáno 11 žen, které braly isotretinoin během těhotenství. Z těchto 11 těhotenství došlo k šesti spontánním abortům (jeden byl důsledkem fetoskopie), v jednom případě se narodilo dítě bez ušních boltců, se srdečním šelestem a se syndromem dechové tísně. U jednoho dalšího těhotenství došlo k terapeutickému potratu a tři těhotenství skončila narozením zdravého dítěte (Bigby a Stern, 1988). Výsledky této studie, týkající se spontánních potratů, jsou v souladu s publikovanými výsledky Lammera et al. z roku 1985. V souladu s touto publikací z roku 1985 jsou i malformace popsány Fernhoffem a Lammerem (1984) nebo také Sternem et al. (1984). Ti uvádějí, že nejčastějšími závažnými malformacemi centrálního nervového systému jsou mikrocefalie a hydrocefalus, nejčastějšími kardiovaskulárními vadami jsou anomálie velkých cév a v neposlední řadě se



velmi často vyskytují také vrozené vady uší, a to především mikrocie nebo absence vnějšího ucha (Stern et al., 1984). Výše zmíněné spektrum anomálií popsal také Lott et al. (1984). Ženě, která brala 40 mg isotretinoinu po dobu prvních 130 dní těhotenství, se narodilo dítě s hydrocefalií a s malformacemi uší (Lott et al., 1984). K dalším popsaným patří případ ženy, která potratila ve 32. týdnu těhotenství. Plod vykazoval malformace související s teratogenním působením isotretinoinu (hydrocefalie, anotie, ageneze *vermis cerebelli*, rozštěp patra, aplázie brzlíku, transpozice velkých cév a dextrokardie). Protože plod trpěl *isotretinoinovým syndromem*, byla matka tázána ohledně užívání léků během těhotenství. Matka potvrdila, že jí byl předepsán isotretinoin na léčbu akné. Žena brala denně 10 mg isotretinoinu od prvního do šedesátého dne těhotenství (Ayme et al., 1988). Zdá se, že isotretinoin může způsobit i malformace končetin. McBride (1985) popsal případ ženy, která užívala 40 mg isotretinoinu každý den, a to od 26. do 40. dne těhotenství. Dítě se narodilo s redukčními deformitami všech čtyř končetin, jejich postižení však bylo různého rozsahu. Oproti thalidomidovému syndromu se tento případ lišil tím, že nebyly postiženy palce u rukou, které jsou v případě thalidomidového syndromu postižené vždy (McBride, 1985). Co se isotretinoinu týče, tak ten nezpůsobuje pouze vady strukturální, ale i behaviorální. Podle výsledků Adamse a Lammera (1993) se snížený intelekt vyskytoval u 47 % dětí, které byly vystaveny *in utero* působení isotretinoinu během prvních šedesáti dnů těhotenství (Adams a Lammer, 1993).

V příbalové informaci k Roaccutane® (10 mg tobolka obsahuje 10 mg isotretinoinu) se píše, že žena musí používat efektivní antikoncepci nejméně jeden měsíc před zahájením léčby, po celou dobu léčby a jeden měsíc po jejím skončení. Pokud žena otěhotní, měla by okamžitě přestat lék užívat a neprodleně tuto situaci oznámit doktorovi, protože Roaccutane® může způsobit vývojové vady. V příbalové informaci se také uvádí, že není známo žádné riziko pro muže užívající Roaccutane®, kteří si přejí mít děti (Roche, 2010).

Vysoký teratogenní potenciál isotretinoinu je dán jeho poměrně pomalou eliminací z těla, jeho biologický poločas je u člověka zhruba 10 až 20 hodin, jeho izomerací na *all-trans* retinovou kyselinu, která snadno prochází přes placentu a která významně ovlivňuje řadu tkání (Nau, 2001).

Instrukce k užívání isotretinoinu uvádějí, že by mělo dojít k přerušování užívání tohoto léku nejméně 4 týdny před otěhotněním, i když se tělo této látky zbaví do deseti dnů od poslední dávky (Običan a Scialli, 2011). Oproti isotretinoinu má etretinát, což je derivát

vitaminu A určený např. k léčbě psoriázy, mnohem vyšší nároky na svou eliminaci z těla. Katalogový list (*data sheet*) pro etretinát z roku 1987 pro Spojené království doporučuje, aby byla používána antikoncepce ještě nejméně dva roky po ukončení etretinátové léčby (Greaves, 1988). Toto doporučení není dobré brát na lehkou váhu, protože Grote et al. (1985) popsali případ matky, která měla poslední dávku etretinátu 4 měsíce před otěhotněním. Toto těhotenství bylo ukončeno 10. gestační týden. Plod vykazoval skeletální deformity. Levá dolní končetina byla o polovinu kratší než pravá dolní končetina. Levá noha byla rudimentární, pouze s jedním prstem, tibie a fibula zcela chyběly a femur byl hypoplastický (Grote et al., 1985). Lammer (1988) zase zdokumentoval případ ženy, které se narodilo dítě s defekty připomínajícími postižení způsobená retinoidy (Fallotova tetralogie, mikrocefalie, malá mandibula, abnormální uši, atd.), i když tato žena přestala užívat etretinát přibližně jeden rok před otěhotněním (Lammer, 1988). Teratogenní potenciál etretinátu je zhruba sedmkrát vyšší než v případě isotretinoinu (Howard a Willhite, 1986) a 99 % etretinátu je z těla eliminováno až po zhruba 700 dnech (Geiger et al., 1994).

#### **1.8.4 Teratogenní účinek nadbytku vitaminu A a kyseliny retinové u zvířat**

Teratogenní účinky vitaminu A byly studovány na celé řadě laboratorních zvířat, jako jsou např. křečci, myši, krysy, kočky, drápatky, opice a řada dalších.

Teratogenní vliv vysokých dávek vitaminu A je znám již od roku 1953, kdy Cohlan prokázal, že jeho vysoké dávky jsou nebezpečné pro vyvíjející se krysí zárodek. 35 000 IU vitaminu A (vztahy mezi IU a [mg] viz Příloha 1) bylo denně podáváno pomocí žaludeční sondy 100 experimentálním zvířatům, a to od 2., 3. nebo 4. dne do 16. dne od kopulace. 50 kontrolních zvířat denně dostávalo pouze rozpouštědlo. Nadbytek vitaminu A vyvolal snížené počty mláďat ve vrzích. Oproti kontrolní skupině, jejíž úspěšnost zabřeznutí (*pregnancy rate*) dosáhla 88 %, byla úspěšnost u testované skupiny pouze 10 %. Typickými malformacemi mezi potomky vystavenými vysokým dávkám vitaminu A byly anomálie ve vývoji lebky a mozku, k dalším postižením lze počítat postižení oka, patra (CP), rtu (CL), jazyka (makroglosie) a pysků (Cohlan, 1953). Rozštěp patra, jakožto typický důsledek administrace vitaminu A březím krysám, byl popsán i Kochlarem a Johnsonem (1965). Březí samice dostávaly 60 000 IU vitaminu A acetátu denně, počínaje 9., resp. 10. dnem a konče 11., resp. 12. dnem gestace. Zvířata byla zabita buď 15., 16., 17., nebo 20. den gravidity. Minimálně 80 % všech potomků samic, které byly krmeny

vitaminem A, vykazovalo rozštěp patra. Dalšími projevy teratogenního účinku vitaminu A byly defekty oka, jako mikroftalmie, anoftalmie či exoftalmie. Exencefalie se vyskytovala pouze u potomků samic, které obdržely první dávku vitaminu A již 9. den gestace. Intrauterinní mortalita byla vyšší mezi potomky samic, kteří byli vystaveni vitaminu A již 9. gravidity (Kochhar a Johnson, 1965). Vysokou frekvenci rozštěpů patra potvrzují i další studie. Více jak 90 % zastoupení rozštěpů patra, způsobené třemi následnými dávkami kyseliny retinové (18.9 mg/den) podávanými od ED13 do ED15, bylo popsáno v práci Lorenteho a Millera (1978). Postižení mozku vitaminem A potvrzují i výsledky Geelena (1973), který záměrně podával samicím krys 50 000 IU vitamin A palmitátu denně od 7. do 9. dne nebo od 7. až do 10. dne březosti, aby vyvolal vznik exencefalie u jejich potomků. Autor u těchto exencefalických potomků následně sledoval utváření baze lební (Geelen, 1973). Opět, stejně jako u lidí, nemá vitamin A efekt jen na vývoj struktur, ale ovlivňuje i kognitivní schopnosti. Studie publikovaná v roce 1978 ukazuje, že potomci samic, které dostávaly 8 000 IU vitaminu A/kg od 8. do 10. dne gestace byli oproti kontrolním jedincům hyperaktivní, ale pomalejší při průchodu vodním bludištěm (*water maze*). Ti jedinci, kteří byli vystaveni působení vitaminu A *in utero* od 11. do 13 dne, byli lehčí než kontroly, a byli také pomalejší jak při překonávání vodního bludiště, tak v T-bludišti (*T-maze*). Tato studie prokazuje, že v období střední gestace (*mid-gestation*), je centrální nervová soustava nejnáchylnější ke vzniku dysfunkce (Vorhees et al., 1978). K velmi zajímavým patří práce Leea et al. (1991), kteří na zárodcích krys ukázali, že *all-trans* retinová kyselina, *13-cis* retinová kyselina a retinol vyvolávají stejný dysmorfogenní efekt. Ale *all-trans* retinová kyselina vede k dysmorfogenezi při nejnižších koncentracích. Zato *13-cis* retinová kyselina potřebuje k dosažení stejného efektu 6 až 7krát vyšší koncentraci a retinol dokonce 16krát vyšší koncentraci než *all-trans* retinová kyselina. Autoři uvádějí, že vyšší koncentrace isotretinoinu nebo retinolu potřebná k vyvolání stejného efektu může být důsledkem toho, že jejich teratogenní efekt je zajištěn přes jejich konverzi na *all-trans* kyselinu retinovou (Lee et al., 1991).

Dalším významným savcem, na kterém byl testován teratogenní efekt vitaminu A nebo jeho metabolitu, je myš. Kyselina retinová byla podána březím myším v jedné dávce (80 mg/kg) a v jednom z následujících dní od 10. do 16. dne od oplození. Žádné malformace končetin se neobjevily u jedinců, kteří byli vystaveni kyselině retinové buď 10., nebo 11. den *in utero*. Nejvíce malformací končetin jako je fokomélie či mikromélie bylo u potomků vystavených kyselině retinové 12. den v případě horních končetin. Situace

byla opačná v případě dolních končetin, kdy bylo postiženo nejvíce jedinců 13. den. Žádné malformace končetin se nevyskytovaly u mláďat, která byla vystavena vitaminu A 14. až 16. den gestace. Končetinové vady nebyly doprovázeny růstovou retardací ani dalšími skeletálními vadami, kromě rozštěpu patra. Ten byl důsledkem administrace kyseliny retinové bez ohledu na dobu podání (Kochhar, 1973). Další studie popisuje vliv 10 000 IU vitaminu A administrovaného 8.3 den nebo 9.3 den gestace myším samicím. Jejich potomci vykazovali rozličné malformace úst a obličeje. K nejčastějším vadám patřila mikrostomie, mikrognácie, rozštěp patra nebo rtu, popř. střední rozštěp mandibuly. Vzácné nebyly ani anomálie zubů (Kalter, 1960). Malformace obličeje a úst, ale i uši jsou popsány také Frenzem et al. (1996). Ti podali myším vitamin A buď 7., 8., 9. nebo 10. den gestace. Pro jedince vystavené 20 mg vitaminu A/kg během ED8 byly typické vady jako mikrocie, mikroftalmie, rozštěp patra a redukce druhého žaberního oblouku. Pro jedince, kteří byli vystaveni působení dvojité dávky (2krát 25 mg/kg) vitaminu A 9. gestační den, byla typická *spina bifida*, chybění ocasu, absence prvního či druhého žaberního oblouku, absence končetinových pupenů, exencefalie, zmenšený boltec a rozštěp maxily. Vitamin A podaný 7., 8. nebo 10. den březosti nevyvolal žádné poškození ušní morfogeneze. Malformace vnitřního ucha byly typické pouze pro 9. embryonální den (Frenz et al., 1996). Výskyt *spina bifida*, jako důsledku administrace 80 mg/kg kyseliny retinové 9. gestační den, byl popsán i Tibblesem a Wileym (1988). Je prokázáno, že vitamin A ovlivňuje také vývoj temporomandibulárního kloubu u myši (Kay, 1987). Kyselina retinová podaná samicím myši ve třech dávkách (78 mg/kg) během ED9, ED9.5 a ED 10 narušila vývoj jejich srdce. U mláďat byly časté transpozice velkých cév (TGA), defekty komorového septa (VSD) či dvojvýtoková pravá komora (DORV) (Davis a Sadler, 1981).

K dalším savcům, na nichž byly testovány teratogenní účinky vitaminu A nebo kyseliny retinové, počítáme např. křečky (např. Shenefelt, 1972; Taylor et al., 1980; Wiley, 1983), kočky (např. Freytag et al., 2003) nebo opice (např. Fantel et al., 1977; Newell-Morris et al., 1980; Yip et al., 1980).

Teratogenní účinek kyseliny retinové byl kromě laboratorních savců testován i na ptácích, především na kuřecích zárodcích. Vliv kyseliny retinové na zárodky kuřete byl popsán např. Larsenem a Jannersem (1987). Ti zaznamenali defekty končetin po její lokální aplikaci na pravý horní končetinový pupen zárodků stádia 17 až 23 HH. Více jak polovina přeživších embryí (ED10), kterým byla aplikována kyselina retinová ve stádiu 17 HH vykazovala kostní defekty pravého křídla. Procento malformací pravého křídla

klesalo až do stádia 20 HH. Žádné malformace křídla nebyly pozorovány od stádia 21 HH do stádia 23 HH (Larsen a Janners, 1987). Další studie prokázala, že subblastodermální injekce kyseliny retinové v různých dávkách zárodkům kuřete ve vývojovém stádiu 13 HH a časného 14 HH má velký efekt na vývoj kaudální oblasti těla. Spektrum malformací zahrnovalo jak pouhé zkrácení ocasu, tak kompletní kaudální regresi. Kromě postižení kaudy bylo viditelné i postižení páteře (skolióza), dolních končetin (malpozice) a zadního neuroporu (neuzavření). Efekt kyseliny retinové byl závislý na dávce (Griffith a Wiley, 1991). Vliv kyseliny retinové na srdce byl prokázán např. Dickmanem a Smithem (1996), ti umístili na levý Hensenův uzel embryí ve stádiu 10 HH „soaked bead“ nasáklý různě koncentrovanou kyselinou retinovou a embrya nechali vyvinout do stádia 11 až 12 HH. Důsledkem aplikace kyseliny retinové byla nejen smrt, ale i specifické srdeční malformace v závislosti na dávce. K typickým abnormalitám srdce patřila abnormální klička, *situs invertus*, shluklá srdeční tkáň a *cardia bifida* (Dickman a Smith, 1996). V souladu s výsledky předešlých studií jsou i výsledky popsané Peterkou et al. (1997), kteří k testování efektu kyseliny retinové využili metodu CHEST. Autoři této studie uvádějí, že embryotoxický efekt kyseliny retinové je závislý nejen na dávce, která je zárodku aplikována, ale i na vývojovém stádiu zárodku. Kyselina retinová měla u zárodků kuřete obecně za následek nejen smrt, ale i vývojové vady srdce, centrální nervové soustavy, končetin, očí, zobáku, břišní stěny (*gastroschisis*) a kostrče/ocasu (*rumpleness*) (Peterka et al., 1997). Na zárodcích kuřete byl studován i teratogenní účinek isotretinoinu. Isotretinoin byl aplikován kuřecím zárodkům injekcí skrze žlutkový vak v různých koncentracích a na různých stádiích vývoje (ED2 až ED6). Zárodky byly odebrány 14. den inkubace. Efekt isotretinoinu byl závislý jak na dávce, tak na vývojovém stádiu zárodku. Kraniofaciální a kardiovaskulární malformace, viditelné na zárodcích kuřete, byly analogické s malformacemi viditelnými u lidských zárodků vystavených působení isotretinoinu *in utero* (Hart et al., 1990).

## 1.9 Dimethyl sulfoxid (DMSO)

První, kdo uměle připravil sulfoxidy, byl Aleksandr M. Zaitsev (1841-1910), ruský chemik, který tyto sloučeniny objevil při studiu oxidace thioetherů (Lewis, 1995). Molekulový vzorec sulfoxidů se dá obecně vyjádřit jako  $R_2S-O$  (Vokurka et al., 2004).

Dimethyl sulfoxid (DMSO) je organosírovou sloučeninou o molární hmotnosti 78.13 g/mol a molekulovém vzorci  $(CH_3)_2SO$ . DMSO je bezbarvou, vysoce polární,

hydroskopickou, aprotickou kapalinou, která má vysoký bod varu a je v podstatě bez zápachu.

DMSO je mísitelné s vodou, ale také s většinou organických rozpouštědel, jako jsou např. alkoholy, estery, ketony, nižší ethery, chlorovaná rozpouštědla a aromáty (Gaylord Chemical Company, 2005).

DMSO se vyskytuje všude kolem nás na hladinách okolo 3 ppm nebo méně. Najdeme ho tedy běžně ve vodě (dešťové i mořské), v ozonu, v zelenině i ovoci (kukuřice, cibule, rajčata, okurka, maliny), ale také v kávě, čaji, mléce a pivu (Gaylord Chemical Company, 2005). V současné době se DMSO běžně uměle syntetizuje, protože má široké laboratorní i klinické využití.

Mezi užitečné vlastnosti DMSO patří jeho schopnost procházet přes membrány v různých koncentracích. Tento proces je vratný a integrita většiny membrán zůstává nedotčená, až na případy, kdy je použito velmi koncentrované DMSO (90-100 %), které se dostane do přímého kontaktu s membránou. DMSO je schopné rychlého přechodu přes většinu membrán, výjimku však tvoří nehty a zuby (Wood a Wood, 1975). Další vlastností DMSO je jeho protizánětlivé působení. DMSO působí protizánětlivě díky tomu, že čistí organismus od volných vnitrobuněčných radikálů, jako je např.  $\text{OH}^-$ , které je primárním spouštěčem zánětlivého procesu. Dimethyl sulfoxid má dále schopnost chránit mitochondrie, ale i jiné buněčné komponenty proti letálním změnám, které jsou důsledkem hypoxie (Jacob a Herschler, 1983). DMSO také dokáže spolu se sebou samým transportovat i jiné látky, resp. má schopnost usnadňovat jejich transport (Sulzberger et al., 1967). Těchto vlastností a schopností DMSO se hojně využívá v lékařství.

### **1.9.1 Využití DMSO**

DMSO je všestranné a velmi účinné rozpouštědlo, které je schopné rozpustit většinu aromatických a nenasycených uhlovodíků, dále pak organické sloučeniny dusíku nebo síry a v neposlední řadě také mnohé anorganické soli. Všestrannost využití DMSO jako rozpouštědla plyne z jeho vlastností, jako jsou např. vysoká polarita, aprotický charakter a jeho schopnost solvatace kationtů (Gaylord Chemical Company, 2005).

Kryobiologie je disciplínou, která by bez dimethyl sulfoxidu nemohla existovat. Biologická bezpečnost, schopnost prostupovat skrze tkáň a cytoplazmu a také výjimečná schopnost asociovat se s vodou, to všechno jsou charakteristiky DMSO, které mění mrznoucí vlastnosti biologických systémů, a umožňují tak úspěšné uchování jak

subbuněčných jednotek, tak celých embryí (Jacob a Herschler, 1983). DMSO je tedy široce užíváno jak k uchování orgánů, které jsou určeny k transplantaci (Shlafer, 1983), tak k uchování pupečnickové krve (Stanworth et al., 2001; Skoric et al., 2007) či krevních destiček (Valeri et al., 2005).

Dimethyl sulfoxid má další klinické využití, a to třeba v dermatologii, kde je využíván buď jako lék sám o sobě, nebo jako prostředek pro aplikaci jiných léčiv (Goldman et al., 1967). DMSO bylo úspěšně použito např. při léčení lipoidní proteinózy (*lipoid proteinosis*) (Wong a Lin, 1988), také při léčbě ztráty a šedivění vlasů v důsledku kožní amyloidózy (*lichen amyloidosis*) (Hsieh et al., 1987) a v neposlední řadě v kombinaci s  $\alpha$ -interferonem při léčbě genitálního oparu (Shupack et al., 1992). Protizánětlivé účinky byly prokázány např. v případě zánětlivých onemocnění močopohlavního traktu (Shirley et al., 1978). Tím, že je DMSO schopné procházet přes hematoencefalickou bariéru, bylo úspěšně využito i u mentálních onemocnění jako jsou schizofrenie a maniodepresivní psychóza (Ramírez a Luza, 1967). Dimethyl sulfoxid má také schopnost ulevit od bolestí hlavy, krku a kraniální neuralgie, stejně jako od bolesti svalů zad, ale také od bolestí v důsledku vymknutých či zlomených kostí (Blumenthal a Fuchs, 1967). Zdá se, že dimethyl sulfoxid je účinný i v případě revmatoidních a kolagenních onemocnění (Alyabyeva a Muravyev, 1983) a možná najde své využití i u pacientů se sklerodermií (Scherbel et al., 1967).

### **1.9.2 Vedlejší účinky při užívání DMSO**

Léčba pomocí dimethyl sulfoxidu se v některých případech neobejde bez vedlejších účinků. Častými vedlejšími účinky působení DMSO jsou vyrážka (Scherbel et al., 1967), pálení (Scherbel et al., 1967), bolest (Ramírez a Luza, 1967), pocit píchání (Scherbel et al., 1967) či tepla v místě aplikace DMSO (Ramírez a Luza, 1967), ale také nechutenství, nevolnost a ztráta na váze (Scherbel et al., 1967). U některých jedinců se objevila i nespavost (Ramírez a Luza, 1967), bolest svalů (Scherbel et al., 1967; Blumenthal a Fuchs, 1967) a hlavy (Blumenthal a Fuchs, 1967) a angioneurotický edém (Scherbel et al., 1967). Velmi častý je také po česneku zapáchající dech (Scherbel et al., 1967).

### 1.9.3 Toxický efekt DMSO u člověka

Toxický efekt dermální aplikace 80 % DMSO v množství 1 g/kg/den byl studován v experimentu trvajícím 14 dní a ve druhém, trvajícím tři měsíce. V případě 14denní studie byla u jedinců užívajících DMSO častá eosinofilie, to ale nebylo neočekávané, protože jednou z vlastností DMSO je schopnost uvolňovat histamin. U těchto jedinců nebyly odhaleny žádné změny na očích. Typické bylo podráždění pokožky. Pokožka byla často suchá, až šupinatá a zarudlá. Podráždění pokožky většinou do tří týdnů od ukončení experimentu odeznělo. Dalšími důsledky užívání DMSO byly především bolesti hlavy, nevolnost a závratě, ale i pocit klidu. Jedinci podrobení 90denní studii dostávali stejné dávky dimethyl sulfoxidu, jako jedinci z předešlého experimentu. Stejně jako u 14denní studie byla typickým důsledkem užívání DMSO eosinofilie, podráždění pokožky a pocit klidu, ale také zápach z úst, nespavost, nevolnost, závratě, a jiné. Autor této toxikologické studie, kde byly užívány dávky 3 až 30krát vyšší, než které se u člověka normálně používají, se domnívá, že DMSO se zdá být velmi bezpečnou látkou a také tvrdí, že změny čochky v důsledku používání DMSO, které byly popsány u některých savců (např. Rubin a Barnett, 1967), u člověka ani při dlouhém užívání nenastávají (Brobyn, 1975).

### 1.9.4 Toxický efekt DMSO u zvířat

Akutní toxický efekt různých způsobů podání DMSO byl studován na myších, krysách, králících a psech. Jedincům bylo podáváno 50 % DMSO naředěné fyziologickým roztokem, a to buď intravenózně, intraperitoneálně, podkožně či orálně. V případě myši a krysy účinkoval dimethyl sulfoxid výrazně rychleji v případech, kdy nebyl podán orálně. Toxický efekt v případě 50 % DMSO byl okamžitý, ale mírný. Typickými symptomy byla katatonie ocasu, hypotermie a výrazná produkce slinných žláz. Avšak tyto projevy se objevily až při subletálních dávkách. V případě myši a krysy byl zaznamenán i diuretický efekt DMSO. V případě králíků, kterým bylo podáváno 40 % DMSO intravenózně v množství 90 ml/hod, byla průměrná doba přežití 92 minut a celková dávka zhruba 19.2 g/kg. Během pokusu byla pozorována zvýšená srdeční aktivita a pomalý, ale za to výrazný vzestup tlaku. Následně se aktivita srdce zklidnila, ale tlak stále stoupal. A nakonec, asi tak 5 až 10 minut před smrtí, začal tlak pomalu klesat, až nakonec došlo ke kompletnímu kolapsu. Dalším testovaným zvířetem byl pes. Intravenózní aplikace 50 % DMSO způsobila smrt psům pouze tehdy, pokud jim byly podávány vysoké dávky v rozmezí mezi 30 až 40 g/kg. Ve stejné studii byly zkoumány i důsledky chronického užívání DMSO.



Úbytek na váze byl pozorován pouze u těch myší, které denně dostávaly 100 % DMSO v množství 5 g/kg orální cestou. Tento efekt byl patrný po 20 dnech trvání experimentu. Pokud bylo DMSO opakovaně podáváno intraperitoneálně v dávkách 2.5 g/kg, došlo v místě aplikace k nekróze intraperitoneálních orgánů. U krysu byl patrný úbytek na váze u dávek 5 g/kg podávaných orálně až po 45 dnech pokusu. Mikroskopické vyšetření odhalilo nekrózu jaterních buněk a zánět v portálním systému. Autoři této studie shrnuli své výsledky tak, že akutní toxicita u testových jedinců není velká, a i poměrně vysoké dávky DMSO jsou dobře tolerovány, ale to nic nemění na tom, že DMSO má toxický potenciál (Caujolle et al., 1967). Další studie publikovaná ve stejném roce se zabývala tím, jaké má orální a dermální podání DMSO vliv na oči u psů, králíků a sviní. Orální podání DMSO mladým psům a dermální aplikace DMSO sviním a králíkům měla za následek změny oční čočky související s postižením jejího kortexu. Změny čočky byly viditelné po 9 týdnech u psů, kteří denně dostávali 5 mg 50 % DMSO/kg. U nižších dávek se tyto změny projeví až po delší době. U králíků byly změny oční čočky pozorovatelné po 90 dnech dermální aplikace 8 ml 50 % DMSO/kg/den nebo 4 a více ml 100 % DMSO/kg/den. Změny na čočce se u sviní, které dostávaly 4.5 ml 90 % DMSO/kg dvakrát denně, taktéž projeví až po devadesáti dnech trvání experimentu. U psů s postiženými čočkami, kterým se DMSO přestalo podávat, došlo k viditelnému, ale ne kompletnímu vymizení změn (Rubin a Barnett, 1967). Smith et al. (1967) ve svém review shrnuli toxické působení DMSO tak, že DMSO má vysokou lokální toxicitu, ale zato nízkou systémovou toxicitu, protože dávky, které způsobují LD<sub>50</sub> se pohybují v gramech na kilogram tělesné váhy. Dále, DMSO je dobře absorbováno během všech cest podání a v neposlední řadě, DMSO způsobuje stejné toxické projevy u všech druhů zkoumaných živočichů (jedinou možnou výjimkou by snad mohla být lokální dermální aplikace DMSO) (Smith et al., 1967).

#### **1.9.5 Teratogenní účinek DMSO u zvířat**

Teratogenní účinek DMSO byl studován např. na křečcích. Samicím křečka bylo osmý den gravidity injekčně aplikováno DMSO v rozmezí od 50 do 8 250 mg/kg. Samice dostaly DMSO v objemu 0.5 ml (v případě 5 500 mg/kg v 1 ml) na 100 g tělesné váhy. Aplikace v rozmezí 50 až 5 500 mg/kg probíhala intravenózně, u vyšších dávek pak intraperitoneálně. Tři dny po aplikaci DMSO byly samice usmrceny a embrya byla odebrána. Nízké dávky DMSO nevyvolaly žádnou významnou odezvu. Avšak od dávek

2 500 mg/kg se embryotoxický efekt stal statisticky významným. Typické pro postižená embrya bylo neuzavření anteriorního neuroporu, mikroftalmie, rozštěp rtu a patra, abnormality končetin a žeber a v neposlední řadě také exencefalie, která byla nejčastější malformací (Ferm, 1966).

Dalšími testovanými savci byla myš a krysa. Testování jedinci dostávali denně od 6. do 12. dne gestace 50 % DMSO buď orálně, nebo intraperitoneálně. Pouze DMSO podané myším intraperitoneálně způsobilo u 7 % exponovaných jedinců malformace. Postiženy byly končetiny, CNS (anencefalie) a břišní stěna (celosomie). V případě krysy nebyly shledány žádné rozdíly v procentu potracených zárodků mezi jedinci, kteří dostali 8 až 10 g/kg, a mezi kontrolní skupinou. Ze 729 mlád'at, která byla *in utero* vystavena DMSO, bylo malformováno pouze 11 jedinců. Postižena byla hlavně CNS, končetiny a břišní stěna (Caujolle et al., 1967).

Negativní vliv DMSO byl testován i na králících. Samice dostávaly denně od 6. do 14. dne gestace roztok 50 % DMSO v dávce 5 g/kg (orálně), nebo 4 g/kg (podkožně). Avšak v tomto případě byla odhalena u 83 zárodků pouze jedna jediná malformace, a to břišní stěny (celosomie) (Caujolle et al., 1967).

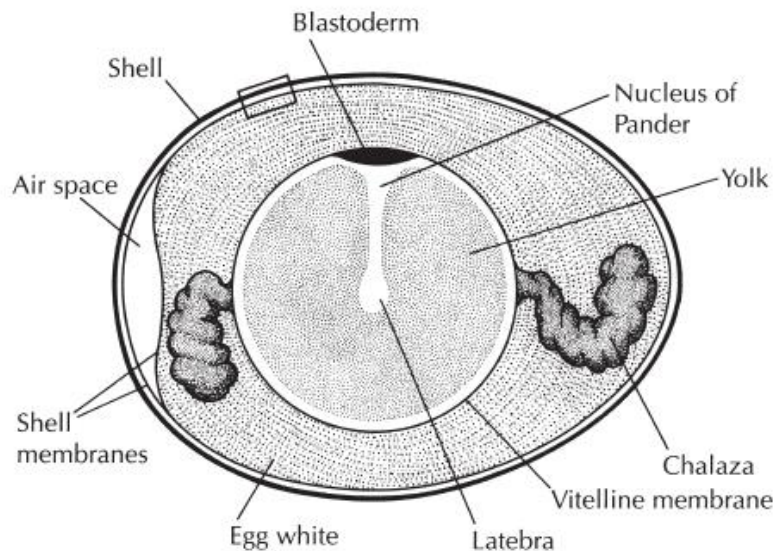
Účinky DMSO byly studovány i na kuřecích zárodcích. 50 % DMSO naředěné ve fyziologickém roztoku bylo aplikováno kuřecím zárodkům na ED3 (17 až 18 HH) a ED4 (22 až 24 HH). Maximální dávka, která nebyla nikdy letální, byla 1 mg na embryo u ED3 a 2.5 mg u ED4. LD<sub>50</sub> byla pro ED3 10.3 mg a pro ED4 12.2 mg na embryo. Minimální dávka, která smrtila vždy, byla více jak 32.5 mg v případě aplikace jak na ED3, tak ED4. Z těchto pozorování se zdá, že toxicita DMSO vůči kuřecím zárodkům je nízká. Největší množství malformovaných jedinců se nacházelo v případě dávek, které odpovídaly LD<sub>50</sub>. Nejčastějšími malformacemi v případě aplikace na ED3 byly anoftalmie levého oka a levostranná torze zobáku spojená s redukcí horního zobáku a výjimečně i malformace končetin. Pro zárodky aplikované na ED4 bylo typické poškození končetin související s narušením vývoje cévního systému končetinového pupenu, protože již 4 hodiny po aplikaci se na končetinách objevila krvácivá místa, puchýře. Kromě končetin byl postižen i zobák, oči, ocas a stěna tělní (celosomie) (Caujolle et al., 1967).

## 1.10 Modelový organismus

### 1.10.1 Kuřecí zárodek

Ptačí vejce je největším jednobuněčným živočišným útvarem, je to dáno především tím, že během pobytu vajíčka (*ovum*) v ovariu, dochází k depozitu živin, které budou později využity vyvíjejícím se zárodkem, do cytoplasmy. Velké množství zásobních živin umožňuje poměrně rychlý vývoj zárodku. Depozit živin je znám jako žloutek (*deutoplasma*), obsahuje vazkou tekutinu s různě velkými suspendovanými granuly a kapénkami. Se zvětšující se zásobou živin dochází k posunu jádra a cytoplasmy směrem na povrch a žloutek začíná zaujímat většinu vajíčka. Oblast vajíčka tvořená jádrem a aktivní cytoplasmou je známá jako tzv. *animální pól vajíčka*. Oblast nacházející se na protější straně vajíčka se nazývá *vegetativní pól*, je poměrně inaktivní, jsou z něj pouze čerpány živiny zárodkem (Pateen, 1920).

Žloutek má v průměru asi 2 až 3 cm, obsahuje především lipidy a proteiny a na svém povrchu má tenkou transparentní blanku, která ho obklopuje. Tato blanka se nazývá *membrana vitellina* a je tvořena dvěma vrstvami. Další obal, který obklopuje žloutek se nazývá bílek (*albumen*). Žloutek je s bílkem propojen dvěma tzv. chalazami (*chalazae*), což jsou šroubovitě stočené struktury, které umožňují žloutku v tekutém bílku plavat. Na povrchu bílku leží další dvě vrstvy, tzv. vnitřní a vnější papírová blána, které jsou navzájem propojeny až na jedno místo, kde jsou tyto blány odděleny a prostor mezi nimi je vyplněn vzduchem. Tento prostor se nazývá vzduchová komůrka a je důležitý při líhnutí. Na povrchu se nachází vápenatá skořápka (Bellairs a Osmond, 2005).



Obr. 6: Sagitální řez ptačím vejcem (Bellairs a Osmond, 2005).

Ovaria slepice obsahují mnoho folikulů, které se liší velikostí, což je dáno přítomností žloutku a jeho velikostí. Největší oocyty mají v průměru kolem 3 cm a jsou připraveny k ovulaci. V ovariu je vytvořena vnější vrstva vitelinní membrány, její vnitřní vrstva je pak vytvořena až ve vejcovodu. Po ovulaci dojde k oplození vajíčka v nálevce vejcovodu, kde již dochází k počáteční tvorbě bílku, hlavní část bílku je však sekretována až z bílkotvorných klíček vejcovodu (*pars albuminifera magnum*). V úžině děložní (*isthmus*) dochází k tvorbě vaječných blan. Skořápka se vytváří v děloze, díky činnosti drobných žlázek. Skořápka je tvořena převážně uhličitanem vápenatým, v menší míře pak uhličitanem hořečnatým, forforečnanem vápenatým, bílkovinami a vodou. Z dělohy putuje vejce do vagíny a z ní do kloaky (Bellairs a Osmond, 2005). Celkový čas, který uplyne od ovulace do chvíle, kdy je vejce připravené ke snesení, je přibližně 22 hodin (Pateen, 1920).

Normální inkubační teplota vejce je zajišťována tělem slepice. Pokud jsou vejce umístěna do inkubátoru, využívá se teploty kolem 37 °C. Při této teplotě je kuře připraveno k líhnutí po 21 dnech. Vývoj může probíhat i při nižší teplotě, ale jeho rychlost je značně zpomalena. Při teplotě 21 °C se vývoj zcela zastavuje (Pateen, 1920).

Normální vývoj zárodka kuřete od inkubace k líhnutí byl popsán a ilustrován Hamburgerem a Hamiltonem již v roce 1951. Hamburger a Hamilton (1951) ve své studii upozorňují na řadu faktorů, které mohou mít na svědomí nedostatek korelace mezi

chronologickým věkem a věkem strukturálním. K těmto faktorům patří např. genetické odlišnosti v rychlosti vývoje různých plemen slepic, dále pak sezónní rozdíly v životaschopnosti embryí či čas, který uplyne od snesení vejce k jeho inkubaci. Na nedostatečnou závislost mezi chronologickým a strukturálním věkem má dále vliv nejen velikost každého vejce, teplota, při které jsou vejce inkubována, ale i typ a velikost inkubátoru. Proto cílem studie Hamburgera a Hamiltona bylo vytvořit systém pro identifikování kuřecích embryí na základě vnějších morfologických charakteristik, nikoli na základě chronologického věku či velikosti embrya. Během různých fází vývoje jsou nápadné odlišné struktury. Pro druhý a třetí inkubační den je typický počet somitů, od počtu 22 somitů, tedy od stádia 14 HH, je typický výrazný růst končetin. Mezi čtvrtým a devátým inkubačním dnem jsou pro zárodek charakteristické změny končetin, křídel a žaberních oblouků. Nejužitečnějšími ukazateli mezi osmým a dvanáctým dnem jsou oční víčka a vyvíjející se peří. Pro zbytek vývoje kuřecího zárodka jsou pro určení vývojových stádií využívány především délka zobáku a prstů, protože se už v tomto období neobjevují v podstatě žádné nové struktury a zárodek „jen“ roste (Hamburger a Hamilton, 1951).

## 1.11 Záměr diplomové práce

Předmětem této práce bude využití dvou alternativních metod testování embryotoxicity látek na zárodku kuřete. První z nich bude dlouhodobě používaná *in ovo* metoda CHEST, která se využívá k aplikaci testovaných látek od ED2 do ED6. Druhý den je látka injikována subgerminálně, od třetího do šestého dne pak intraamniálně. Nevýhodou subgerminální aplikace testované látky na ED2 je její výrazné naředění žloutkem. Proto se pokusíme vyvinout metodu SANDWICH, která by tuto nevýhodu eliminovala. Kuřecí zárodek bude přenesen ze systému *in ovo* do systému *in vitro*, kde se bude po celou dobu kultivace vyvíjet na živném médiu v přítomnosti testované látky.

Budeme testovat hypotézu, kde očekáváme zvýšenou senzitivitu *in vitro* systému vůči působení testované látky. Předpokládáme totiž, že v tomto *in vitro* systému zajistíme působení testované látky po celou dobu kultivace zárodku, a to ve vyšší koncentraci, než je tomu při testování na ED2 v systému *in ovo*, protože nebude docházet k jejímu naředění. K vypracování metody SANDWICH záměrně použijeme vitamin A, resp. jeho metabolit *all-trans* retinovou kyselinu, jehož teratogenita byla prokázána snad na všech laboratorních zvířatech i na člověku, a jeho běžně používané rozpouštědlo – dimethyl sulfoxid. Očekáváme, že *all-trans* retinová kyselina bude působit embryotoxicky jak na zárodky *in ovo*, tak *in vitro*. Teratogenní účinek dimethyl sulfoxidu neočekáváme, letální efekt by však mohl být způsoben jeho nejvyššími testovanými koncentracemi.

## 2 CÍLE PRÁCE

1. Vypracování *in vitro* metody SANDWICH za využití kuřecího zárodku zbaveného žloutku a kultivovaného na živném médiu, za použití prokázaného teratogenu (*all-trans* retinové kyseliny) a jeho rozpouštědla (dimethyl sulfoxidu).
2. Stanovení odhadu začátku pásma embryotoxicity prokázaného teratogenu (*all-trans* kyseliny retinové) a běžného rozpouštědla (dimethyl sulfoxidu) pomocí *in vitro* metody SANDWICH a *in ovo* metody CHEST za použití kuřecího zárodku.
3. Porovnání výsledků testování *all-trans* kyseliny retinové a dimethyl sulfoxidu získaných pomocí metody SANDWICH a CHEST na ED2.

### 3 MATERIÁL

Základním materiálem pro všechny experimenty byly zárodky kuřete (*Gallus gallus domesticus*) plemene COBB 500. Tyto zárodky byly získány ve formě tzv. *násadových vajec*, tedy oplozených vajec, z chovů firmy Xavergen a.s., z líhni v Habrech. Násadová vejce byla až do zahájení inkubace udržována při teplotě okolo 15 °C (Romanoff, 1960) proto, aby byl znemožněn jak vývoj zárodků, tak aby nebyla ohrožena kvalita těchto zárodků.

Celkem bylo použito více jak 900 násadových vajec, která byla inkubována. Před experimentem docházelo k selekci mrtvých, spontánně malformovaných, nedostatečně vyvinutých či námi poškozených zárodků. Po selekci vstoupilo do pokusu 440 zárodků, které byly testovány na embryotoxický účinek *all-trans* retinové kyseliny a dimethyl sulfoxidu pomocí metody CHEST, a 225 zárodků, které byly testovány na embryotoxicitu stejných látek pomocí metody SANDWICH.



## 4 METODY

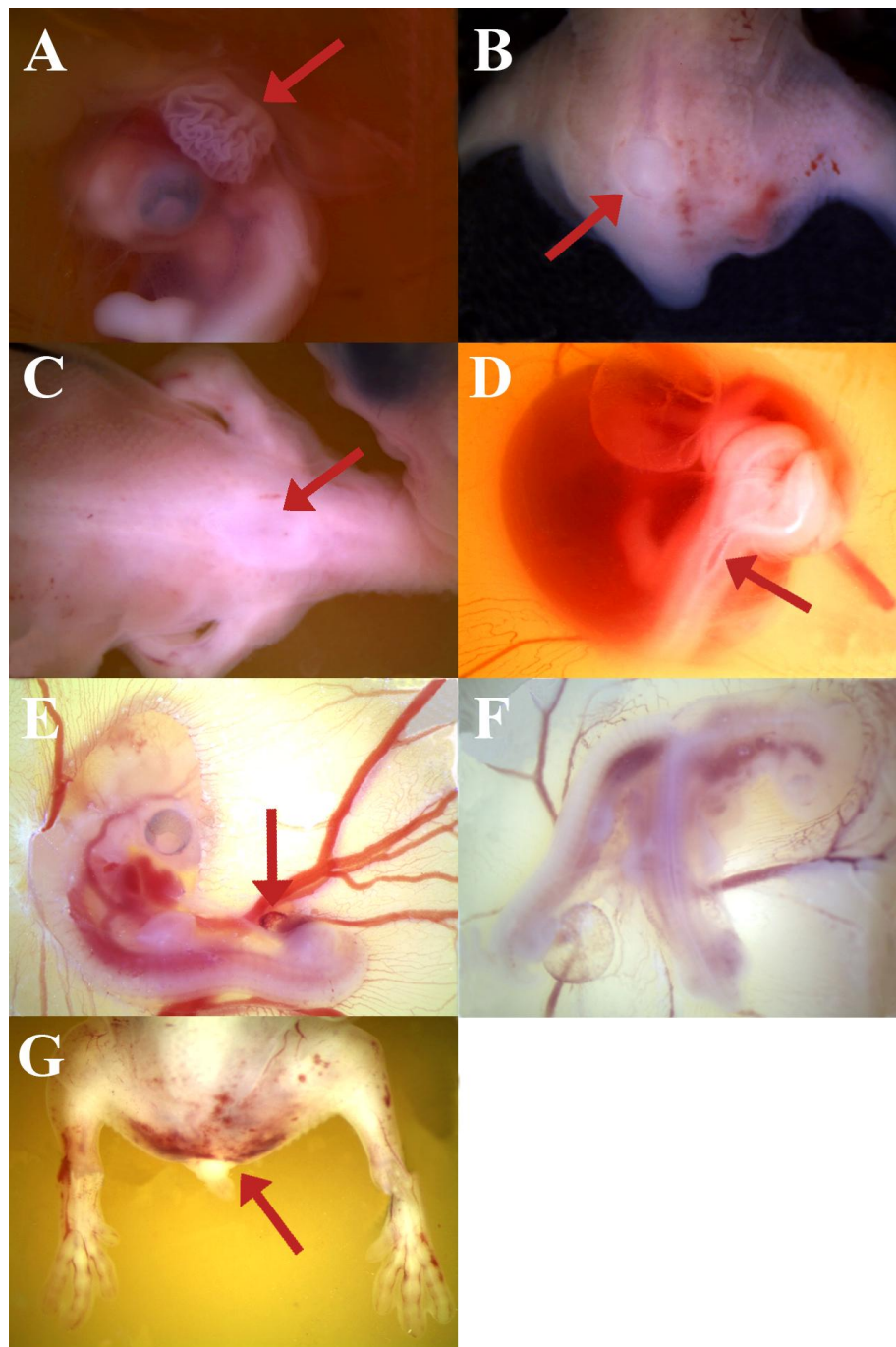
### 4.1 Inkubace

Inkubace násadových vajec se prováděla v inkubátoru Gallekamp Plus II Incubator. Jeho výhodou je, že dokáže udržet stálou teplotu s možností jejího nastavení na jednu desetinu stupně. Inkubátor bylo nutné vždy zapnout zhruba o jednu hodinu dříve před plánovaným začátkem inkubace, aby se dostatečně vytemperoval na naši požadovanou teplotu, tedy na 37.5 °C, protože růst kuřecích zárodků probíhá optimálně právě při teplotě 37 až 38 °C (Peterka et al., 1996). Teplota v inkubátoru mohla mírně kolísat, a dokonce se i nepatrně lišit v rámci jeho celého objemu, ale pro naše účely toto kolísání teploty nepředstavovalo žádnou komplikaci. Vlhost v inkubátoru byla zajišťována pomocí nádob s vodou, které se dle potřeby dolévaly. Relativní vlhkost se pohybovala mezi 60 až 80 procenty.

Vejsce se nasazovala do nosných kovových mřížek. Každé vejce bylo v horizontální poloze umístěno do příslušného čtverce (rozměr 4.5 x 4.5 cm) v rámci kovové mřížky tak, aby ve čtverci leželo diagonálně a v ideálním případě špičkou mírně vzhůru. Všechna vejce byla kladena do mřížky ve stejném směru, tím jsme zajistili lepší manipulaci s vejci. Vejce bylo třeba během inkubace otáčet kolem dlouhé osy, vždy cca o čtvrt obrátky (45°), a to ideálně každý den inkubace (až do vytvoření okénka u metody CHEST). Otáčení vajec imituje přirozené podmínky inkubace pod nosnou slepicí a zajišťuje tak rovnoměrné čerpání vápníku z různých oblastí skořápky.

### 4.2 Selekcce zárodků - vstup do experimentu

Zárodky, které byly zahrnuty do jednotlivých experimentů, byly pečlivě selektovány s ohledem na jejich vývojové stádium a na výskyt spontánních malformací. Mezi spontánní malformace, které jsme odhalili, patřila *rumplessness*, defekty neurální trubice (exencefalie, *spina bifida*), nevyvinutá alantois a vzácný nebyl ani výskyt siamských dvojčat (viz Obr. 7).



Obr. 7: Spontánní malformace kuřecího zárodku: (A) exencefalie, (B, C) *spina bifida*, (D) *spina bifida* a rozštěp kaudálního konce zárodku, (E) hypoplázie alantois, (F) siamská dvojčata, (G) *rumplessness*.

### 4.3 CHEST (Chick Embryotoxicity Screening Test)

Metoda CHEST je vhodnou volbou pro testování teratogenicity různých látek především proto, že umožňuje selekci spontánně malformovaných, mrtvých nebo při manipulaci poškozených zárodků ještě před samotnou aplikací známého množství testované látky subgerminálně nebo do amniového vaku zárodku kuřete. Tato metoda byla vyvinuta během 70. let minulého století (Jelínek, 1977).

V našem případě byl metodou CHEST testován embryotoxický účinek *all-trans* retinové kyseliny (Sigma) a dimethyl sulfoxidu (Sigma). *All-trans* retinová kyselina (ATRA) byla aplikována kuřecím zárodkům od ED2 do ED6 včetně, a to v koncentracích  $10^{-2}$  až  $10^{-6}$  (dávka od 30  $\mu\text{g}$  do 0.003  $\mu\text{g}$  ATRA ve 3  $\mu\text{l}$  objemu). Zásobním roztokem byl roztok kyseliny o koncentraci  $10^{-2}$ , který obsahoval 10 % DMSO s kuřecím fyziologickým roztokem (0.9 % chlorid sodný od firmy Hoechst-Biotika namíchaný v poměru 10 jednotek fyziologického roztoku: 3 jednotkám injekční vody). Následující koncentrace byly připraveny dekadickým ředěním (např. koncentrace  $10^{-3}$  se získala smícháním 100  $\mu\text{l}$   $10^{-2}$  ATRA s 900  $\mu\text{l}$  kuřecího fyziologického roztoku). Zásobní roztok byl vždy míchán v den experimentu, aby se tak zajistila jeho lepší kvalita a zabránilo se jeho rozkladu na světlo. Dimethyl sulfoxid byl aplikován kuřecím zárodkům taktéž od ED2 do ED6 včetně, a to v objemu 3  $\mu\text{l}$  obsahujících 100 %, 10 %, 1 % a 0.1 % DMSO. Výchozím roztokem bylo 100 % DMSO, ze kterého se získaly následující koncentrace dekadickým ředěním pomocí kuřecího fyziologického roztoku. Stejně jako v případě ATRA byly roztoky vždy připravovány v den experimentu.

ATRA je látkou, která je rozpustná ve 100 % DMSO, ale při nižších koncentracích DMSO se už nerozpouští tak ochotně. Protože náš  $10^{-2}$  výchozí roztok kyseliny retinové byl získán přidáním příslušného množství ATRA do kuřecího fyziologického roztoku obsahujícího deset procent DMSO, ATRA se v roztoku rozpustila jen částečně, proto bylo nutné vytvořit suspenzi molekul pomocí ultrazvuku.

Jako kontrolní skupina sloužila vejce, která byla sice otevřena a měla okénko, ale která nebyla naaplikována. Zároveň jako kontrola posloužil i klesající embryotoxický účinek testovaných látek, resp. jako kontrola sloužily i zárodky testované na nejnižší koncentrace jak DMSO, tak ATRA.

Postup metody CHEST obsahoval tyto kroky:

1. Otevírání vajec - vytvoření okének:
  - a. Vejce se v případě aplikace na ED2, resp. ED3 otvírala na ED2, resp. ED3, v případě aplikace na ED4 až ED6 se vejce otvírala na ED3, protože zárodky starší než ED3 mají již velmi vyvinuté cévy a hrozilo by jejich poškození při vytváření okénka.
  - b. Vejce se naposledy otočila o  $\frac{1}{4}$  obrátky nejméně jednu hodinu před začátkem pílení okének.
  - c. Každé vejce bylo prosvíceno a obyčejnou tužkou byla vyznačena vzduchová bublina a okénko o rozměru zhruba 1.0 x 1.5 cm v místě zárodku (na ED2 není většinou umístění zárodku vidět).
  - d. Skořápka byla lehce napílena pomocí elektrického brusného kotouče v místě okénka tak, aby nedošlo k porušení papírové membrány.
  - e. Následně bylo za sterilních podmínek provedeno probodnutí skořápky bodýlkem v místě vzduchové bubliny pro poklesnutí zárodku a ruční dobroušení napíleného okénka kovovým pilníkem až na úroveň papírové membrány, která by se neměla propílit.
  - f. Poté jsme naplocho přiložili skalpel ostrou hranou ke zvolené straně okénka, zasunuli ho pod jeho okraj a opatrně odklopili skořápku tak, aby papírová membrána zůstala neporušená.
  - g. V místě okénka jsme zakápli papírovou membránu kuřecím fyziologickým roztokem a pozorovali jsme, zda se objeví vzduchová bublina. Pokud se bublina objevila, tak jsme se v jejím místě snažili opatrně membránu probodnout pinzetou. Pokud se bublina neobjevila, tak jsme proděravěli papírovou membránu v místě, kde jsme neviděli ani cévy, ani zárodek.
  - h. Následně jsme od vnitřního okraje skořápky sterilní pinzetou začali odstraňovat papírovou membránu po celém obvodu okénka a nakonec jsme okénko pinzetou začistili tak, aby po jeho obvodu nevyčnívaly žádné zbytky papírové membrány.

## 2. Zavírání okénka:

- a. Do skleněné pasteurky byl nabrán tekutý parafín. Nejprve byl zalepen otvor po propíchnutí vzduchové bubliny a následně byl vytvořen parafínový rámeček okolo okénka.
- b. Do pinzety jsme uchopili sklíčko odpovídající velikosti a nahřáli ho nad kahanem. Poté jsme ho přiložili na parafínový rámeček okénka a jemně jsme ho přitlačili proti skořápce.
- c. Pokud zůstaly mezi parafínovým rámečkem a sklíčkem nějaké štěrby, tak jsme je opět pomocí parafínu pečlivě utěsnili. Je totiž nutné, aby nezůstal otvor mezi sklíčkem a parafínovým rámečkem z důvodu ochrany před možným průnikem infekce.
- d. Poté, co jsme vejce řádně zavřeli, byla vrácena zpět do inkubátoru, okénkem směrem vzhůru a vodorovně.
- e. Od této chvíle se již vejce nesmí otáčet!

## 3. Aplikace testované látky:

- a. Subgerminální aplikace (ED2):
  - i. Aplikace testované látky se prováděla subgerminálně pod stereomikroskopem Leica MZ 6 pomocí skleně mikropipety nakalibrované na objem 3  $\mu$ l do oblasti kaudální části zárodku.
  - ii. Následně bylo vejce zavřeno (viz bod 2).
  - iii. Další manipulace s vejci probíhala podle bodů 4 a 5.
- b. Intraamniální aplikace (ED3 až ED6):
  - i. Pomocí kovového pilníku nahřátého nad plamenem se vejce opět otevřela (díky nahřátému pilníku, který se přiložil na sklíčko, se rozežhřál i parafínový rámeček pod ním a sklíčko tak z parafínového rámečku snadno sklouzlo).
  - ii. Následně se pod stereomikroskopem Leica MZ 6 pomocí skleně mikropipety nakalibrované na objem 3  $\mu$ l naaplikovala testovaná látka do amniového vaku zárodku.
  - iii. Po aplikaci se okénko opět zavřelo tak, že se nad kahanem nahřálo nové sklíčko a přiložilo se na parafínový rámeček. Dle potřeby byly parafínem utěsněny i štěrby mezi sklíčkem a parafínovým rámečkem.

- iv. Zavřená naaplikovaná vejce se vrátila do inkubátoru.
- v. Pozn. v případě aplikace na ED3 byla vejce otevřena (viz bod 1), následně naaplikována (viz bod 3-b-ii) a zavřena (viz bod 2) a vrácena do inkubátoru.

4. Průběžná kontrola vajec:

- a. Ode dne aplikace až do dne odběru (ED9) se vejce průběžně kontrolovala a mrtvé zárodky se vyřazovaly.
- b. Mrtvé zárodky se prohlédly pod stereomikroskopem a do protokolu se zaznamenalo jejich vývojové stádium, den úmrtí a případně vývojové vady.

5. Odběr zárodků (ED9):

- a. Devátý embryonální den se pomocí skalpelu odstranilo sklíčko a široce se otevřel prostor okénka tak, aby byl zárodek dobře přístupný.
- b. Pomocí pinzety a nůžek se zárodek vystříhal ze zárodečných obalů, poté se v oblasti krku uchopil háčkem a přendal do kovové misky (10 x 3 x 2 cm).
- c. Odebrané zárodky se zvažily a jejich hmotnost se zaznamenala do protokolu.
- d. Nakonec byl každý zárodek prohlížen pod stereomikroskopem s cílem odhalit vývojové vady. Všimli jsme si především hlavy (exencefalie, mikroftalmie, anoftalmie, rozštěp zobáku, *cross-beak*, hypoplázie maxily či mandibuly), končetin (polydaktilie, syndaktilie, redukční deformity), kaudální oblasti (*rumplessness*, *spina bifida*, syndrom kaudální regrese) a trupu (eventrace). Po vnější examinaci zárodku byla rozstřižena tělní stěna na břišní straně a provedena kontrola srdce (defekt mezikomorové přepážky, redukce počtu velkých cév, transpozice velkých cév).
- e. Všechny odhalené vývojové vady byly zaznamenány do protokolu.

## 4.4 SANDWICH

SANDWICH je námi vyvinutá metoda pro kultivaci kuřecích embryí *in vitro* v přítomnosti testované látky. Oproti metodě CHEST je tento systém zbaven žloutku a zárodek se vyvíjí na živném médiu v Petriho misce v inkubátoru při 37.5 °C. Složení živného média je modifikací živného média používaného Hu et al. (2005) pro kultivaci myších buněk zubního mezenchymu a epitelu *in vitro*.

Stejně jako u metody CHEST jsme testovali teratogenní účinek *all-trans* retinové kyseliny a DMSO. Testované koncentrace ATRA v živném médiu byly v rozsahu od  $10^{-3}$  do  $10^{-7}$ , v případě DMSO byla experimentu podrobena živná média obsahující 10 %, 5 %, 1 %, 0.5 %, 0.1 %, 0.03 %, 0.04 %, 0.003 % nebo 0.004 % DMSO.

ATRA byla vždy rozpuštěna ve 100 % DMSO a příslušné množství tohoto roztoku bylo přidáno do živného média tak, abychom získali požadovanou koncentraci kyseliny retinové v médiu. Při těchto pokusech sloužila jako kontrola živná média obsahující DMSO, které bylo přidáno do živného média ve stejném množství jako v případě ATRA rozpuštěné v DMSO. Jak v případě pokusů s DMSO, tak s ATRA byla také často jako kontrola používána „čistá“ živná média, tedy média bez testované látky.

Postup metody SANDWICH obsahoval několik následujících kroků:

*Příprava pomůcek - den před experimentem (na 10 testovaných zárodků):*

1. Den před zahájením experimentu jsme si připravili potřebné pomůcky:
  - a. 10x Petriho miska s víčkem (průměr 5.5 cm) - pro inkubaci zárodků *in vitro*
  - b. 2x Petriho miska (průměr 15 cm) - na rozklepávání vajec
  - c. 1x Petriho miska (průměr 12 cm) - na opláchnutí „sandwiche“
  - d. 1x Erlenmeyerova baňka (průměr hrdla 2.7 cm) - pro umístění kroužku z filtračního papíru
  - e. 1x kádinka - pro sterilizaci nástrojů při pokusu
  - f. minimálně 30x papírový kroužek z filtračního papíru (vnější průměr 4 cm a vnitřní průměr 2.5 cm)
  - g. 2x pinzeta nerezová lomená se špičatými čelistmi - na zacházení s papírovými kroužky a se „sandwichem“
  - h. 1x nůžky nerezové - pro vystřížení zárodku na žloutkové membráně
  - i. 1x kopist - pro jednodušší navážení příslušného množství ATRA

2. Všechny výše zmíněné pomůcky (až na pinzety a nůžky) jsme zabalili do alobalu a dali na 2 hodiny do sterilizátoru (MEMMERT UM 400 oven), který byl nastaven na 180 °C.

*Příprava pomůcek pro přenesení zárodku kuřete na živné médium v den experimentu:*

1. V den pokusu jsme si nejprve vodou a poté alkoholem omyly pracovní plochu.
2. Na omytou pracovní plochu jsme umístili čisté filtrační papíry.
3. Připravili jsme stereomikroskop a všechny pomůcky, které jsme si dali den před experimentem vysterilizovat.
4. Do kádinky jsme nalili 80 % ethanol, abychom mohli mezi každou aplikací nástroje (pinzety, nůžky) sterilizovat.
5. Zapnuli jsme vyhřívací desku typu VD-I a na ni dali ohřát cca 30 ml BGJb média určeného pro oplach „sandwiche“.
6. Všechny Petriho misky určené pro kultivaci kuřecích zárodků jsme si řádně označili, tak abychom měli přehled, v jaké misce je jaký zárodek a jaká koncentrace testované látky.

*Příprava živného média (v laminárním boxu, Jouan MSC 12):*

1. Připravili jsme si živné médium potřebné na inkubaci 10 kuřecích zárodků (tedy 50 ml).
  - a. Do falkonky jsme přidali následující látky (celkový objem 51.5 ml):
    - i. 40 ml BGJb medium (Fitton-Jackson Modification) (1X) liquid (Gibco), nebo DMEM/F-12+GlutaMAX<sup>TM</sup>-I (DMEM/F-12 (Ham) (1:1) 1X (Gibco)
    - ii. 10 ml FBS (Fetal Bovine Serum, Sigma)
    - iii. 500 µl vitamínu C - z 18 mg L-ascorbic acid (Sigma) na 1 ml DMEM/F-12+GlutaMAX<sup>TM</sup>-I (DMEM/F-12 (Ham) (1:1) 1X (Gibco)
    - iv. 500 µl L-glutamine 200 nm (100X) (Gibco)
    - v. 500 µl gentamicin 50 mg/ml (Gibco)
  - b. Obsah falkonky jsme promíchali.
  - c. Živné médium jsme sterilně přefiltrovali pomocí 0.22µm filtru do nové falkonky.
    - i. Živného média jsme vždy připravovali o něco více, protože při filtrování docházelo k jeho ztrátám.



- d. Živné médium ve falkonce jsme vložili do inkubátoru (~37 °C), aby se prohřálo.
  - e. Během doby, kdy se živné médium zahřívalo v inkubátoru, jsme si připravili agar:
    - i. 350 mg agarosa, Type VII (Sigma) se smíchalo s 10 ml injekční vody v Erlenmeyerově baňce, která se z vrchu překryla alobalem.
    - ii. Obsah Erlenmeyerovy baňky se pomalu zahříval nad propanbutanovým hořákem až do chvíle, kdy byl celý čirý a vřel.
  - f. 50 ml živného média se ve falkonce smíchalo s 5 ml agaru (na 10 ml živného média se přidal 1 ml agaru). Obsah se promíchal a falkonka se vrátila zpět do inkubátoru.
2. Do živného média smíchaného s agarem byla přidána testovaná látka (ATRA, DMSO), popř. živné médium zůstalo bez testované látky s cílem získat kontrolní skupinu. Obsah falkonky se promíchal.
  3. Na každou Petriho misku (o průměru 5.5 cm) se napipetovalo 5 ml živného média s agarem a testovanou látkou. Misky se přikryly skleněnými víčky.
  4. Obsah Petriho misek se nechal zatuhnout (nejlépe při 6 °C).

*Přenesení zárodků kuřete na živné médium (za semisterilních podmínek)*

(fotodokumentace způsobu přenosu zárodku na živné médium viz Příloha 2):

1. Kuřecí zárodky byly inkubovány ve vejci až do ED2 (viz kapitola „Inkubace“).
2. Každé vejce bylo následně rozklepnuto o dno velké Petriho misky tak, aby byl zárodek na povrchu žloutkového vaku umístěn co nejvíce centrálně.
3. Každý zárodek byl prohlédnut pod stereomikroskopem Leica MZ 6 s cílem určit, zda je zárodek živý a jaké je jeho vývojové stádium vzhledem k hodnocení podle Hamburgera a Hamiltona (1951).
4. Pokud byl zárodek stádia 12 HH až 13+ HH, pak byl využit v experimentu.
5. Kroužek z filtračního papíru byl pomocí pinzety položen na žloutkový vak tak, aby byl zárodek uprostřed kroužku. Papírový kroužek byl následně pomocí pinzety jemně přitisknut k žloutkovému vaku.
6. Poté byl tento papírový kroužek pomocí nůžek obstrížen dokola tak, aby po následném uchopení kroužku do pinzety byl na tomto kroužku uchycen zárodek na žloutkové (vitelinní) membráně.

7. První papírový kroužek spolu se zárodkem na žloutkové membráně byl posléze přenesen na druhý kroužek z filtračního papíru o stejné velikosti tak, aby vznikl jakýsi „sandwich“ (první papírový kroužek - zárodek na vitelinní membráně - druhý papírový kroužek).
  - a. Druhý kroužek byl umístěn horizontálně na hrdle Erlenmeyerovy baňky.
8. Oba kroužky k sobě byly potom pomocí pinzety „sečvaknuty“ na několika místech, tento úkon zajistil, že se zárodek na žloutkové membráně neměl tendenci shrnout.
9. Tento „sandwich“ byl uchopen do pinzety a jemně opláchnut v Petriho misce s BGJb médiem proto, aby se zárodek očistil od zbytků žloutku.
  - a. Médium v misce bylo vyhřáté alespoň na 30 °C, aby nebyl zárodek vystaven náhlé změně teploty.
10. Takto opláchnutý „sandwich“ se ihned přenesl na Petriho misku obsahující živné médium.
  - a. Živné médium v Petriho misce, na které se umisťoval „sandwich“, bylo zahřáté na vyhřívací desce alespoň na 30 °C ze stejných důvodů, jako v případě média, ve kterém byl „sandwich“ oplachován.
  - b. Mezi zárodkem a živným médiem nesměla vzniknout vzduchová bublina.
11. Petriho miska se opět přiklopila víčkem a umístila se do inkubátoru SANYO MCO-5M (UV); O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> incubator vytemperovaného na 37.5 °C.

*Hodnocení efektu testované látky:*

1. Zárodky vyvíjející se na živném médiu v Petriho misce byly kontrolovány pod stereomikroskopem Leica MZ 6 zhruba každých 24 hodin (tedy po 24 hod, 48 hod, 72 hod a příležitostně i po 96 hod od aplikace).
2. U každého zárodku byla pořízena obrazová dokumentace díky propojení stereomikroskopu Leica MZ 6 se softwarem LAS EZ.
3. Smrt a jiné viditelné změny na zárodku se zaznamenávaly do protokolu.
4. Účinek testované látky byl hodnocen po 24 hodinách od přenesení zárodku na živné médium (ED3), v případě účinku DMSO (naměstnaná krev v oblasti dolních končetinových pupenů zárodku) i po 48 hodinách (ED4).

## 4.5 Histologické zpracování tkáně

Histologická analýza dolních končetinových pupenů byla provedena u zárodků vystavených působení 1 % DMSO *in vitro* v porovnání s pupeny dolních končetin kontrolních jedinců. Postup histologického zpracování tkání obsahoval několik následujících kroků:

1. Zárodek byl odebrán na ED4.
2. Fixace zárodku probíhala v Bouin Holland (Penta) po dobu nejméně 7 dní.
3. Následně došlo k zalití zárodku:
  - a. 80 % ethanolum: min 24 hod
  - b. 96 % ethanolum (v/v) (Penta): 60 min
  - c. 96 % ethanolum (v/v) (Penta): 60 min
  - d. 96 % ethanolum (v/v) (Penta): do druhého dne
  - e. ethylalkohol absolutní p.a. (Penta): 30 min
  - f. ethylalkohol absolutní p.a. (Penta): 30 min
  - g. ethylalkohol absolutní p.a. (Penta): 60 min
  - h. toluen čistý (Penta): 10 min
  - i. toluen čistý (Penta): 10 min
  - j. parafin Paraplast® X-TRA (Sigma): 60 min
  - k. parafin Paraplast® X-TRA (Sigma): 60 min
  - l. parafin Paraplast Plus® (Sigma): 90 min
  - m. parafin Paraplast Plus® (Sigma): 90 min
  - n. parafin Paraplast Plus® (Sigma): přes noc
4. Poté jsme vytvořili parafinový bloček.
5. Krájeli jsme parafinové řezy pomocí Mikrotom Leitz na 10  $\mu\text{m}$ .
6. Následně jsme parafinové řezy barvili:
  - a. xylen čistý, směs izomerů (Penta): 10 min
  - b. xylen čistý, směs izomerů (Penta): 10 min
  - c. ethylalkohol absolutní p.a. (Penta): 5 min
  - d. ethylalkohol absolutní p.a. (Penta): 5 min
  - e. 96 % ethanolum (v/v) (Penta): 5 min
  - f. 96 % ethanolum (v/v) (Penta): 5 min
  - g. alcianová modř: 10 min

- h. tekoucí voda: 10 min
  - i. destilovaná voda: 5 min
  - j. hematoxylin: 30-35 s
  - k. tekoucí voda: 10 min
  - l. destilovaná voda: 5 min
  - m. eosin: 25 s
  - n. destilovaná voda: 5 min
  - o. 96 % ethanolum (v/v) (Penta):5 min
  - p. 96 % ethanolum (v/v) (Penta): 5 min
  - q. ethylalkohol absolutní p.a. (Penta):5 min
  - r. ethylalkohol absolutní p.a. (Penta):5 min
  - s. xylen čistý, směs izomerů (Penta): 5 min
  - t. xylen čistý, směs izomerů (Penta): 5 min
7. Po barvení jsme parafinové řezy montovali pomocí bezvodného montovacího média Neo-Mount® (Merck).
8. Vzorky jsme prohlíželi pod mikroskopem ZEISS Primo Star a pořizovali fotodokumentaci pomocí fluorescenčního mikroskopu Leica DMI6000 B a přidruženého softwaru.

Pozn. použitá barviva:

1. *Alciánová modř:*

0.2 g Alcian blau 8 GX (Merck)

458 ml 70 % ethanolum

15 ml ledové kyseliny octové - acetic acid 100 % puriss (glacial) (Sigma)

2. *Hematoxylin:*

1 000 ml destilované vody

1 g hematoxylin krystalický (BDH)

0.2 g jodičnanu sodného p.a. (Penta)

91.9 g síranu draselno-hlinitého dodekahydrátu (Penta)

50 g chloralhydrátu čistého (Penta)

1 g kyseliny citronové monohydrátu p.a. (Lachema Brno)

3. *Eosin:*

0.5 g eosinu (Merck)

500 ml injekční vody

5 kapek ledové kyseliny octové - acetic acid 100 % puriss (glacial) (Sigma)

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 SANDWICH, živná média

Nejprve byly otestovány rozdíly mezi živným médiem obsahujícím BGJb médium a živným médiem obsahujícím DMEM/F-12+GlutaMAX<sup>TM</sup>-I (dále jen DMEM/F) médium. Otestována byla jak živná média bez testované látky (kontrolní médium), tak s testovanou látkou (1 % DMSO). Mezi živnými médii obsahujícími BGJb nebo DMEM/F médium nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl ve sledovaném znaku, tedy v tvorbě vitelinních cév ani v případě médií neobsahujících testovanou látku, ani u médií obsahujících 1 % DMSO.

Pro *dose-response* účinek (účinek v závislosti na dávce, popř. koncentraci) dimethyl sulfoxidu (DMSO) bylo použito jen BGJb médium. Ale v případě *all-trans* retinové kyseliny bylo pro dvě nejvyšší testované koncentrace ( $10^{-3}$  a  $10^{-4}$ ) použito médium DMEM/F, pro ostatní koncentrace pak výživnější médium BGJb.

### 5.2 SANDWICH, DMSO

#### 5.2.1 DMSO *dose-response*

Účinky různých koncentrací dimethyl sulfoxidu (DMSO) na kuřecí zárodek *in vitro* byly zkoumány pomocí metody SANDWICH. Testované koncentrace DMSO byly: 10 %, 5 %, 1 %, 0.5 %, 0.1 %, 0.03 %, 0.04 %, 0.003 % a 0.004 %. DMSO bylo ředěno živným médiem (BGJb). Účinek DMSO na dvoudenní zárodek byl hodnocen po 24 a 48 hodinách od aplikace, tedy na ED3 a ED4. Hodnocenými parametry byla smrt, tvorba vitelinních cév, resp. napojení a nenapojení zárodku k *area vasculosa*, přítomnost krve v kaudální oblasti embrya, především pak v oblasti dolních končetinových pupenů a nakonec normální fenotyp zárodku.

#### 5.2.2 Kontrolní skupina

Jako kontrolní skupina byly použity zárodky, které se vyvíjely na kontrolním živném médiu (BGJb médium), tedy na médiu bez přidaného DMSO. Všechny tyto zárodky vykazovaly normální fenotyp. Normální fenotyp jednoho ze zárodků je vidět na obrázku (viz Obr. 8).

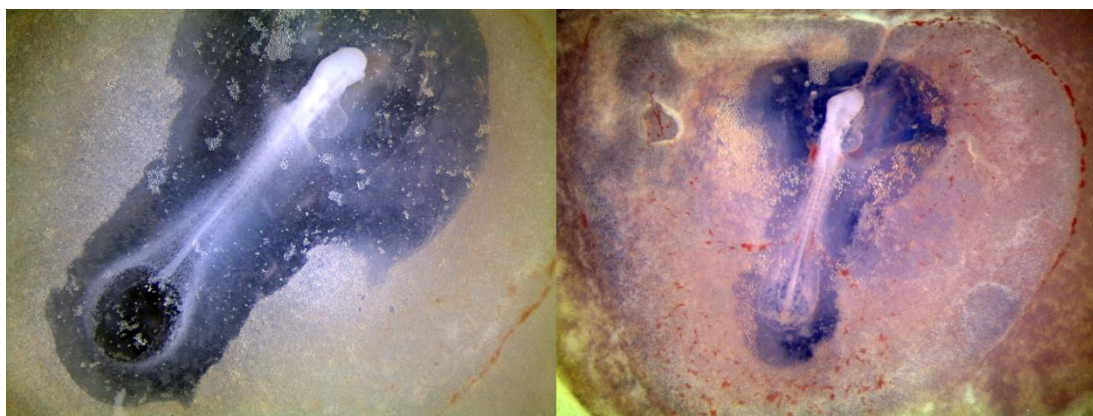


Obr. 8: Živý zárodek z kontrolní skupiny.

### 5.2.3 Efekt jednotlivých testovaných koncentrací DMSO

#### Efekt 10 % a 5 % DMSO

Jak 10 % DMSO, tak 5 % DMSO způsobilo smrt u sta procent zárodků do 24 hodin od aplikace. Vzhled typický pro mrtvé zárodky je vidět na obrázku (viz Obr. 9).

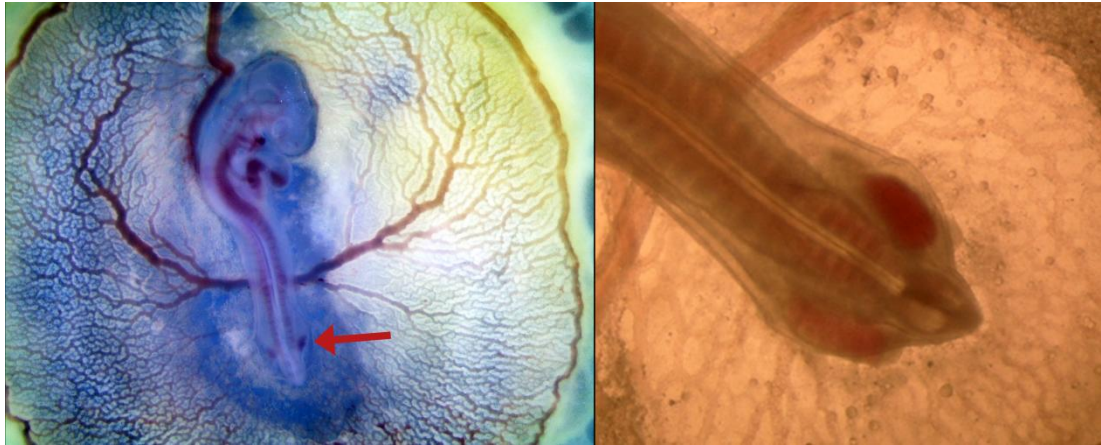


Obr. 9: Mrtvý zárodek vystavený působení 10 % DMSO (vlevo) a 5 % DMSO (vpravo).

#### Efekt 1 % DMSO

1 % DMSO nezpůsobilo smrt žádnému ze zárodků. U všech testovaných zárodků došlo k tvorbě vitelinních cév, a tedy k jejich napojení k *area vasculosa*. Překvapivým účinkem 1 % DMSO však bylo nashromáždění krve v oblasti pupenů dolních končetin. Z dvaceti testovaných jedinců se krev v dolních končetinových pupenech objevila u tří z

nich již u ED3 a u šestnácti zárodků až na ED4. Pouze jeden zárodek vykazoval normální fenotyp. Celkový vzhled, ale i detail kaudální oblasti jednoho ze zárodků vystavených působení 1 % DMSO je vidět na obrázku (viz Obr. 10).



Obr. 10: Živý zárodek vystavený působení 1 % DMSO s naměstnanou krví v pupenech dolních končetin (vlevo) a detail kaudální oblasti zárodku (vpravo).

### **Efekt 0.5 % DMSO**

0.5 % DMSO nebylo pro kuřecí zárodky letální. Všechny zárodky vytvořily vitelinní cévy. Avšak, stejně jako v případě 1 % DMSO, se celkem u osmi zárodků z dvaceti objevila naměstnaná krev v oblasti dolních končetinových pupenů. U sedmi zárodků byla krev patrná již po 24 hodinách od aplikace a pouze u jednoho zárodku až po 48 hodinách. Vzhled zárodku vystaveného 0.5 % DMSO je vidět na obrázku (viz Obr. 11).

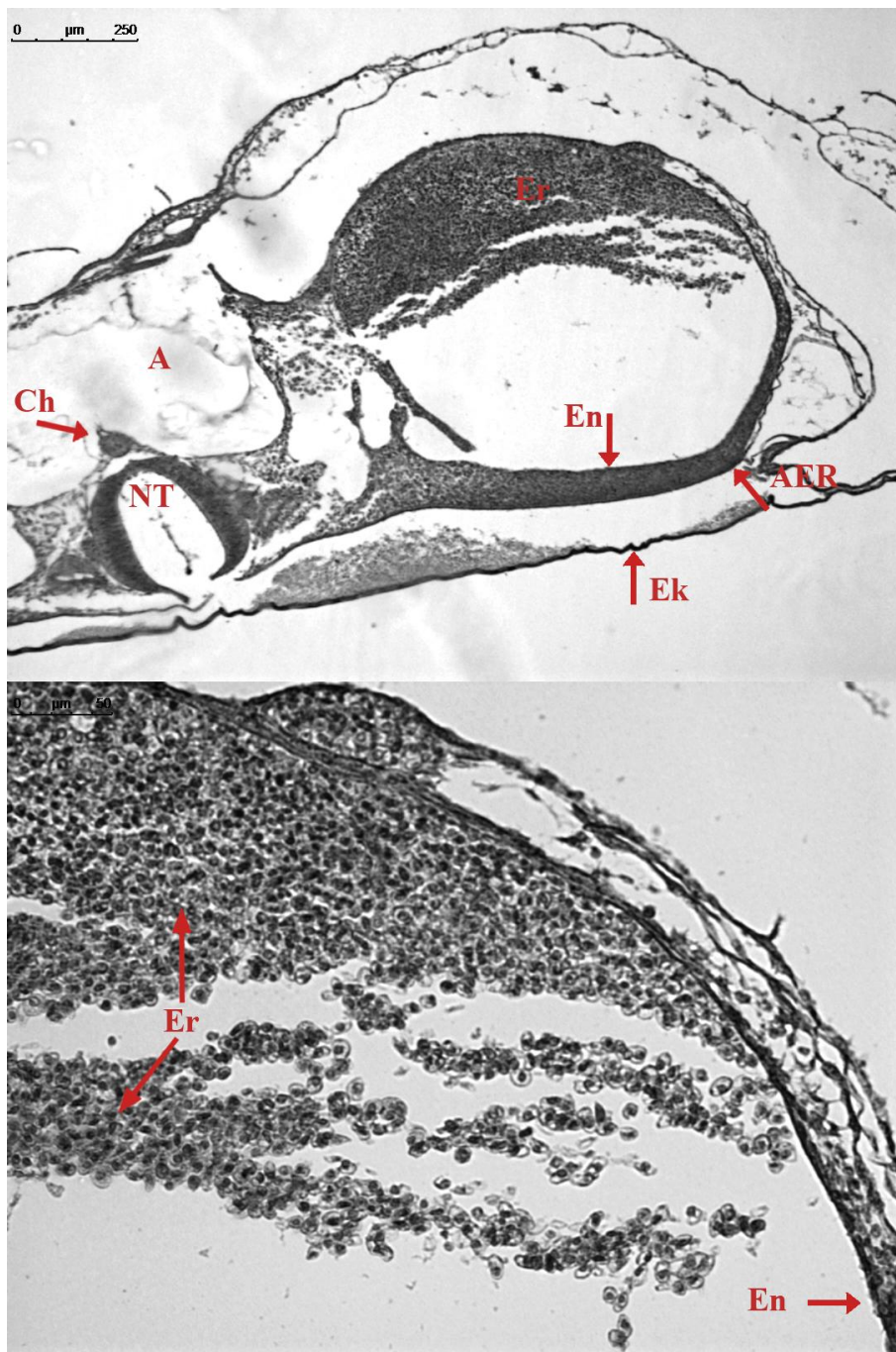




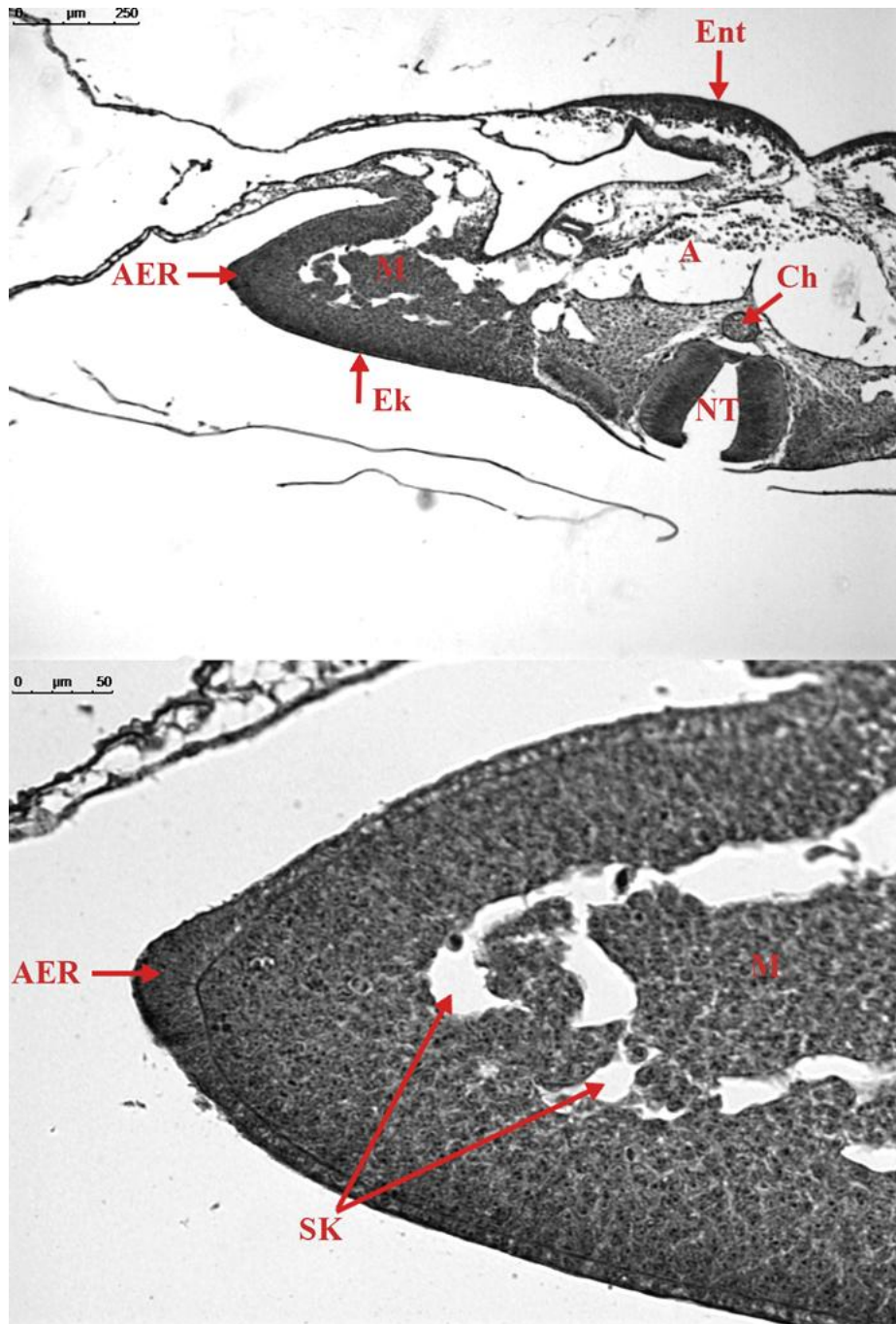
Obr. 11: Živý zárodek vystavený působení 0.5 % DMSO s naměstnanou krví v pupenech dolních končetin.

### **Histologické řezy - krev v oblasti dolních končetinových pupenů**

Analýza transversálních histologických řezů zárodků vystavených působení 1 % DMSO odhalila zvýšený výskyt červených krvinek (erytrocytů) ve vacích vystlaných endotelem v dolních končetinových pupenech zárodku na úkor výskytu mesenchymu v porovnání s kontrolními zárodky (viz Obr. 12 a Obr. 13).



Obr. 12: Transversální histologické řezy kuřecím zárodkem, který byl vystaven působení 1 % DMSO (**A**-aorta, **AER**-*apical ectodermal ridge*, **Ek**-ektoderm, **En**-endotel, **Er**-erythrocyty, **Ch**-chorda, **NT**- neurální trubice).



Obr. 13: Transversální histologické řezy kuřecím zárodkem, který se vyvíjel na kontrolním médiu (**A**-aorta, **AER**-*apical ectodermal ridge*, **Ek**-ektoderm, **Ch**-chorda, **M**-mesenchym, **NT**-neurální trubice, **SK**-síť kapilár).

### **Efekt 0.1 % DMSO a DMSO o nižších koncentracích**

0.1 % DMSO bylo testováno na osmi zárodcích. Tato koncentrace neměla letální efekt, všechny zárodky vytvořily vitelinní cévy, napojily se k *area vasculosa* a u žádného jedince se již neobjevila naměstnaná krev v oblasti dolních končetinových pupenů. Normální vzhled zárodka vystaveného 0.1 % DMSO je vidět na obrázku (viz Obr. 14).

Další nižší testované koncentrace DMSO (0.03 %, 0.04 %, 0.003 % a 0.004 %) byly pochopitelně neúčinné a zárodky vykazovaly normální fenotyp.

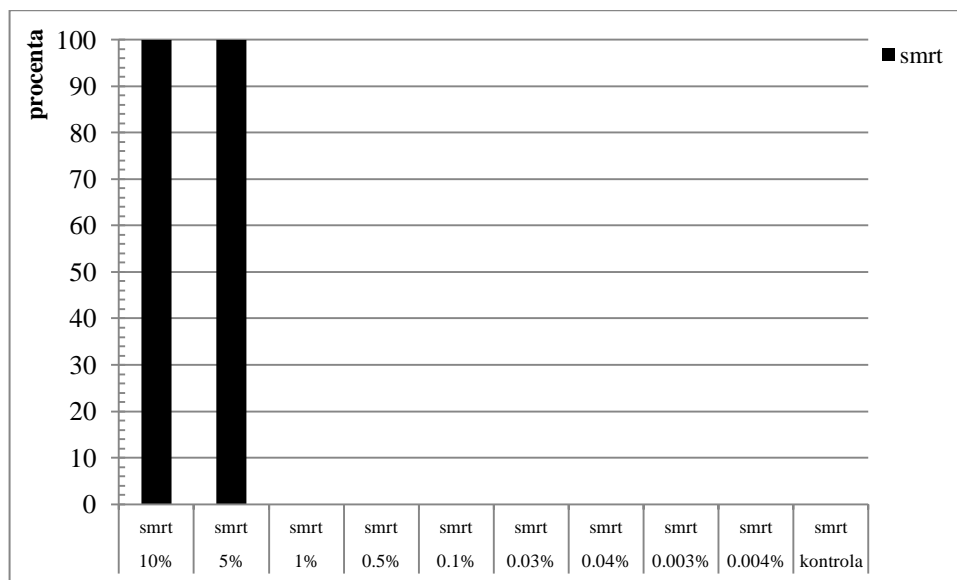


Obr. 14: Živý zárodek vystavený působení 0.1 % DMSO.

#### **5.2.4 Embryotoxický efekt DMSO na zárodek kuřete**

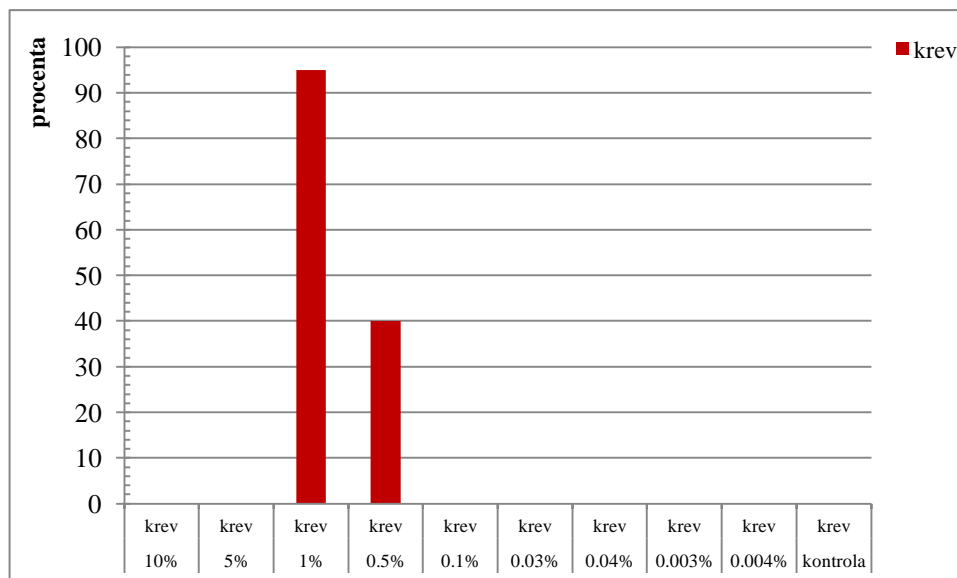
Mezi testovanými koncentracemi DMSO byl shledán významný rozdíl v hodnocených parametrech na základě Pearsonova chí-kvadrátu (hodnota Pearsonova chí-kvadrátu: 231.858; sv=27,  $p < 0.001$ ). Hodnocenými parametry byla smrt zárodka, přítomnost naměstnané krve v oblasti dolních končetinových pupenů, a normální fenotyp zárodka. Smrt do 24 hodin od aplikace nastala pouze v případě 5 % a 10 % DMSO. Krev v oblasti dolních končetinových pupenů se vyskytovala pouze tehdy, pokud byly zárodky vystaveny působení 1 % nebo 0.5 % DMSO. Ostatní koncentrace DMSO zárodky kuřat nijak nepoškozovaly, a tyto zárodky vykazovaly normální fenotyp, až na dva zárodky z koncentrace DMSO 0.03 %, kde nedošlo k vytvoření vitelinních cév. Procentuální zastoupení mrtvých zárodků, zárodků, u kterých se vyskytla krev v dolních končetinových pupenech, a procento normálních zárodků je vidět v následujících grafech (viz Obr. 15, Obr. 16, Obr. 17).

Odhadovaný začátek pásma embryotoxicity byl stanoven mezi takovými dvěma testovanými koncentracemi, kde suma mrtvých a malformovaných zárodků přesáhla 30 % hranici. Tato hranice představuje míru spontánního úhynu a malformací zárodků (Jelínek et al., 1985). Odhadovaný začátek pásma embryotoxicity DMSO se tedy nacházel mezi 0.1 % a 0.5 %.

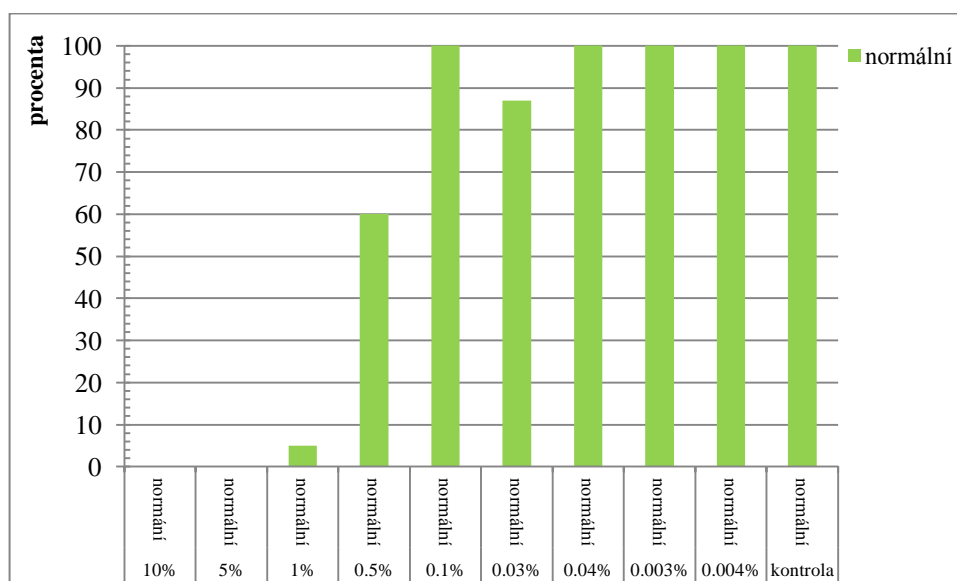


Obr. 15: Procentuální zastoupení mrtvých zárodků u jednotlivých testovaných koncentrací DMSO a u kontroly.





Obr. 16: Procentuální zastoupení naměstnané krve v oblasti dolních končetinových pupenů zárodků u jednotlivých testovaných koncentrací DMSO a u kontroly.



Obr. 17: Procentuální zastoupení výskytu normálního fenotypu zárodku u jednotlivých testovaných koncentrací DMSO a u kontroly.

## 5.3 CHEST, DMSO

### 5.3.1 DMSO dose-response

Embryotoxický účinek dimethyl sulfoxidu na zárodek kuřete byl testován pomocí *in ovo* metody CHEST. Na jedincích různého stáří, od ED2 do ED6, bylo testováno 0.1 %, 1 %, 10 % a 100 % DMSO v objemu 3  $\mu$ l.

### 5.3.2 Efekt DMSO v závislosti na dni aplikace

#### Efekt DMSO na zárodek kuřete (ED2)

Zárodky vystavené působení různých koncentrací DMSO druhý embryonální den nevykazovaly ani zvýšenou úmrtnost, ani vyšší míru výskytu vrozených vad. Jediná malformace, která byla odhalena v den odběru u zárodku vystaveného působení 10 % DMSO, byla *rumplessness*. Ostatní přeživší zárodky vykazovaly normální fenotyp. Počty mrtvých, malformovaných a normálních zárodků jsou uvedeny v tabulce (viz Tab. 2).

Tab. 2: Počty normálních, malformovaných (včetně malformačního spektra) a mrtvých zárodků po aplikaci DMSO na ED2 metodou CHEST\*.

ED 2				
účinek / koncentrace	100%	10%	1%	0.1%
normální	8	9	9	10
malformovaní	0	1	0	0
<i>malformace kaudy</i>	/	1	/	/
<i>malformace obličeje</i>	/	/	/	/
<i>malformace končetin</i>	/	/	/	/
<i>malformace srdce</i>	/	/	/	/
<i>malformace břišní stěny</i>	/	/	/	/
mrtví	2	0	1	0
celkem	10	10	10	10

\* pozn. malformace neodhalena = /

### Efekt DMSO na zárodek kuřete (ED3)

Z jedinců, kterým bylo 100 % DMSO aplikováno 3. embryonální den, jich osm uhynulo do 24 hodin od aplikace a jeden uhynul až 7. embryonální den. Jediný zárodek, který se dožil 9. dne, byl silně malformovaný. Postižena byla břišní stěna (eventrace), končetiny (redukční deformity), kaudální oblast zárodka (*rumplessness*) a srdce (Kettlerova transpozice předsíní - viz Obr. 18).



Obr. 18: Kettlerova transpozice předsíní (pravá i levá předsíň se nachází vlevo, viz žlutá šipka).

U nižších koncentrací se nevyskytovala zvýšená letalita, ani zvýšený výskyt vývojových vad. Jedinou, pravděpodobně spontánní, malformací odhalenou mezi zárodky vystavenými působení DMSO o koncentraci 10% byla opět *rumplessness*. Počty mrtvých, malformovaných a normálních zárodků jsou uvedeny v tabulce (viz Tab. 3).

Tab. 3: Počty normálních, malformovaných (včetně malformačního spektra) a mrtvých zárodků po aplikaci DMSO na ED3 metodou CHEST.

ED 3				
účinek / koncentrace	100%	10%	1%	0.1%
normální	0	10	10	9
malformovaní	1	0	0	1
<i>malformace kaudy</i>	1	/	/	1
<i>malformace obličeje</i>	/	/	/	/
<i>malformace končetin</i>	1	/	/	/
<i>malformace srdce</i>	1	/	/	/
<i>malformace břišní stěny</i>	1	/	/	/
mrtví	9	0	0	0
celkem	10	10	10	10



#### Efekt DMSO na zárodek kuřete (ED4)

U zárodků vystavených působení různých koncentrací DMSO čtvrtý embryonální den nebyl odhalen zvýšený výskyt vývojových vad ani úhynu zárodků. Jediná odhalená malformace byla identifikována u zárodku ze skupiny vystavené působení 10 % DMSO. Tento zárodek měl postiženou svou kaudální oblast. Počty mrtvých, malformovaných a normálních zárodků jsou uvedeny v tabulce (viz Tab. 4).

Tab. 4: Počty normálních, malformovaných (včetně malformačního spektra) a mrtvých zárodků po aplikaci DMSO na ED4 metodou CHEST.

ED 4				
účinek / koncentrace	100%	10%	1%	0.1%
normální	7	9	8	7
malformovaní	0	1	0	0
<i>malformace kaudy</i>	/	1	/	/
<i>malformace obličeje</i>	/	/	/	/
<i>malformace končetin</i>	/	/	/	/
<i>malformace srdce</i>	/	/	/	/
<i>malformace břišní stěny</i>	/	/	/	/
mrtví	3	0	2	3
celkem	10	10	10	10

#### Efekt DMSO na zárodek kuřete (ED5)

Ve skupině zárodků, které byly vystaveny účinku různých koncentrací DMSO pátý den vývoje, nebyla odhalena žádná vývojová vada. Procento mrtvých zárodků pro jednotlivé koncentrace nepřesáhlo dvacet procent. Počty mrtvých, malformovaných a normálních zárodků jsou uvedeny v tabulce (viz Tab. 5).

Tab. 5: Počty normálních, malformovaných (včetně malformačního spektra) a mrtvých zárodků po aplikaci DMSO na ED5 metodou CHEST.

ED 5				
účinek / koncentrace	100%	10%	1%	0.1%
normální	10	8	8	10
malformovaní	0	0	0	0
<i>malformace kaudy</i>	/	/	/	/
<i>malformace obličeje</i>	/	/	/	/
<i>malformace končetin</i>	/	/	/	/
<i>malformace srdce</i>	/	/	/	/
<i>malformace břišní stěny</i>	/	/	/	/
mrtví	0	2	2	0
celkem	10	10	10	10

### Efekt DMSO na zárodek kuřete (ED6)

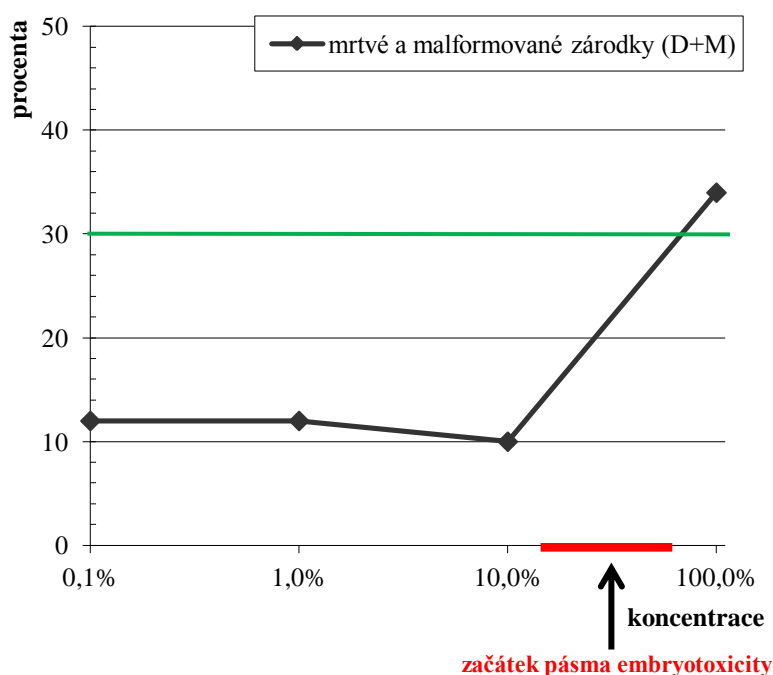
Ve skupině zárodků, kterým bylo aplikováno DMSO šestý embryonální den, nebyla odhalena zvýšená mortalita zárodků. U přeživších zárodků nebyla v den odběru nalezena žádná vývojová vada. Všechny žijící zárodky měly normální fenotyp. Počty mrtvých, malformovaných a normálních zárodků jsou uvedeny v tabulce (viz Tab. 6).

Tab. 6: Počty normálních, malformovaných (včetně malformačního spektra) a mrtvých zárodků po aplikaci DMSO na ED6 metodou CHEST.

ED 6				
účinek / koncentrace	100%	10%	1%	0.1%
normální	8	9	9	8
malformováni	0	0	0	0
<i>malformace kaudy</i>	/	/	/	/
<i>malformace obličeje</i>	/	/	/	/
<i>malformace končetin</i>	/	/	/	/
<i>malformace srdce</i>	/	/	/	/
<i>malformace břišní stěny</i>	/	/	/	/
mrtví	2	1	1	2
celkem	10	10	10	10

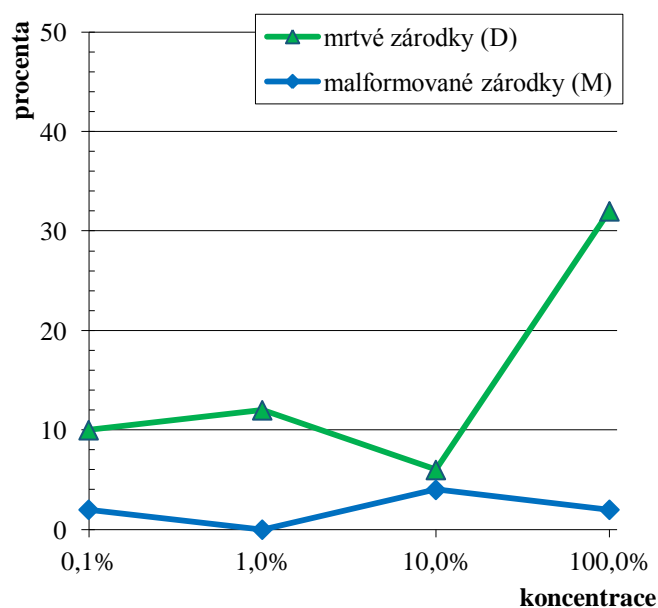
#### 5.3.3 Závislost počtu mrtvých a malformovaných zárodků na aplikované koncentraci DMSO

Celkový počet (suma) mrtvých a malformovaných jedinců (D+M) v závislosti na aplikované dávce (koncentraci) DMSO je vidět v grafu (viz Obr. 19). Pouze 100 % DMSO dokázalo zabít či malformovat více jak 30 % jedinců. Hranice 30 % totiž odpovídá spontánní míře úhynu a poškození zárodků během vývoje (Jelínek et al., 1985). Odhadovaný začátek pásma embryotoxicity se tedy nachází někde mezi koncentrací 10 % a 100 % dimethyl sulfoxidu aplikovaných ve 3  $\mu$ l. Suma mrtvých a malformovaných zárodků pro koncentrace DMSO od 0.1 % do 10 % není významná, protože nepřesáhla 30 % hranici.



Obr. 19: Závislost počtu mrtvých a malformovaných zárodků (D+M) na aplikované koncentraci DMSO v objemu 3  $\mu$ l od ED2 do ED6.

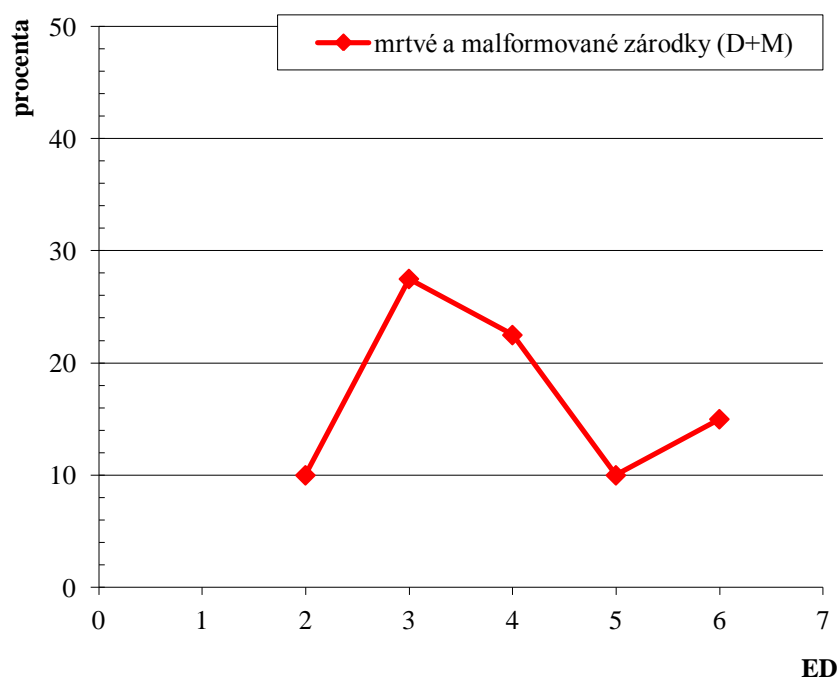
V grafu závislosti počtu mrtvých (D) a malformovaných (M) zárodků na aplikované koncentraci DMSO v objemu 3  $\mu$ l (viz Obr. 20) je vidět, že nejvíce mrtvých (32 %) zárodků je důsledkem aplikace DMSO o nejvyšší koncentraci, počet mrtvých jedinců u nižších testovaných koncentrací se pohybuje od 6 do 12 %. Počet malformovaných jedinců napříč testovanými koncentracemi DMSO je minimální a nepřesahuje 4 %.



Obr. 20: Závislost počtu mrtvých (D) a malformovaných (M) zárodků na aplikované koncentraci DMSO v objemu 3  $\mu$ l od ED2 do ED6.

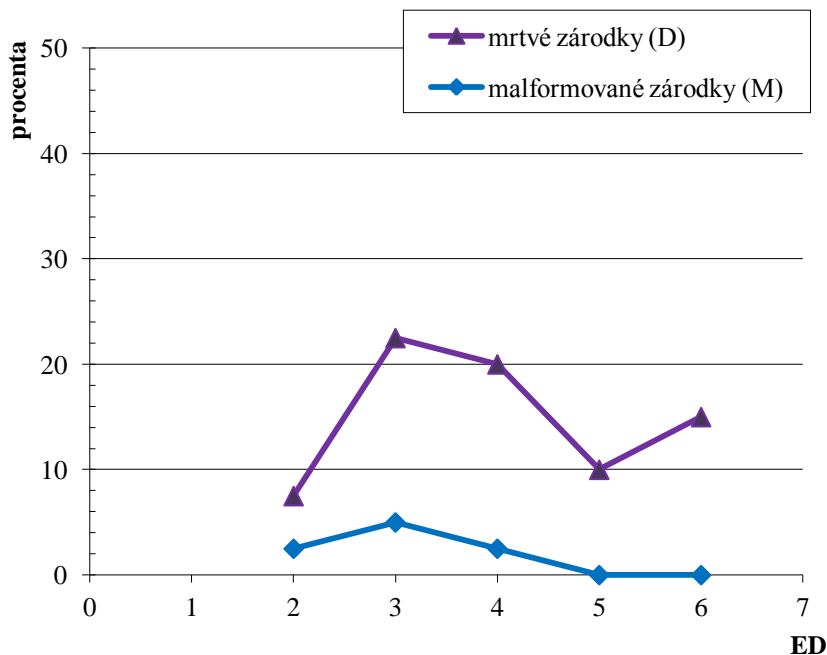
#### 5.3.4 Závislost počtu mrtvých a malformovaných zárodků na dni aplikace DMSO

Celkový počet (suma) mrtvých a malformovaných zárodků (D+M) v závislosti na dni aplikace DMSO je vidět v grafu (viz Obr. 21). Nejvyšší počet mrtvých a malformovaných jedinců je důsledkem aplikace DMSO na třetím nebo čtvrtém embryonálním dni. 100 % DMSO aplikované třetí nebo čtvrtý den inkubace mělo bezprostřední efekt na srdce. U většiny jedinců byla pozorována zvýšená srdeční frekvence (*tachykardie*) a po zhruba 10 minutách od aplikace začalo docházet i k selhávání krevního oběhu na periférii.



Obr. 21: Závislost počtu mrtvých a malformovaných zárodků (D+M) na dni aplikace DMSO pro testované koncentrace 100 % až 0.1 %.

V následujícím grafu je vidět závislost počtu nejen mrtvých (D), ale i malformovaných (M) zárodků na dni aplikace DMSO (viz Obr. 22). Počet malformovaných jedinců napříč testovanými dny je velmi nízký a nepřesahuje 5 %. Nejvyšší zastoupení mrtvých zárodků je důsledkem aplikace DMSO na třetím (22.5 %) a čtvrtém (20 %) embryonální dni.



Obr. 22: Závislost počtu mrtvých (D) a malformovaných (M) zárodků na dni aplikace DMSO pro testované koncentrace 100 % až 0.1 %.

## 5.4 SANDWICH, ATRA

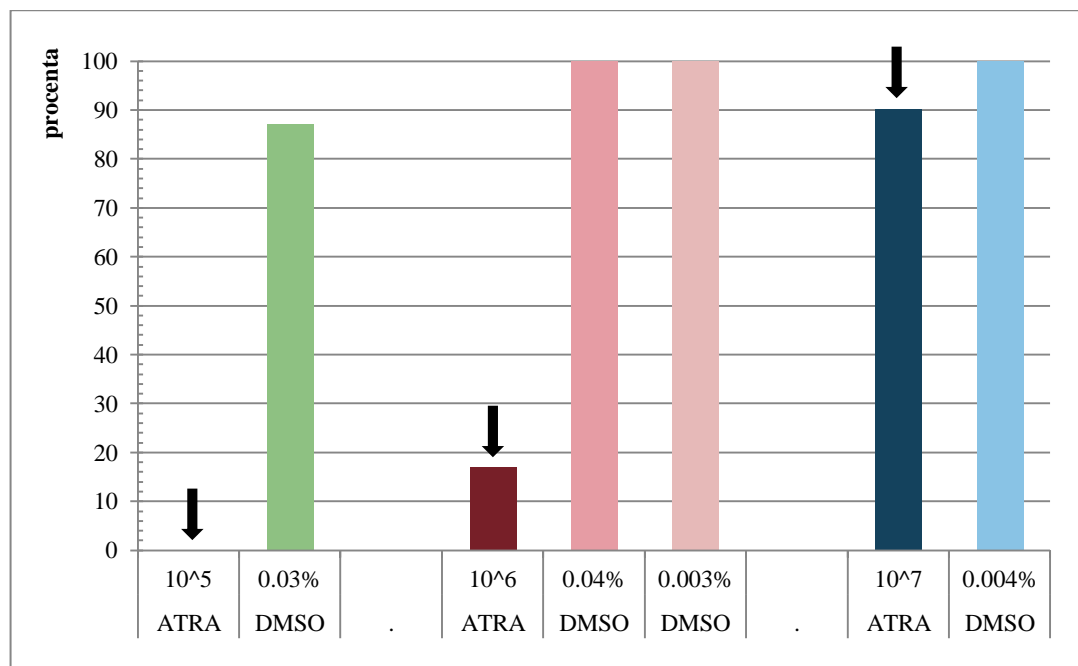
### 5.4.1 ATRA dose-response

Účinky různých koncentrací *all-trans* retinové kyseliny (ATRA) na dvoudenní kuřecí zárodek *in vitro* byly zkoumány pomocí metody SANDWICH. ATRA byla testována v koncentracích od  $10^{-3}$  až do  $10^{-7}$ . Kyselina retinová byla vždy nejprve rozpuštěna ve 100 % DMSO a následně byla naředěna živným médiem, obsahujícím buď BGJb, nebo DMEM/F médium, na příslušnou koncentraci. Ke sledovaným proměnným patřila smrt, tvorba vitelinních cév, resp. napojení zárodku k *area vasculosa*, měštnání krve u srdce, hyperlordóza, narušená segmentace a kontrakce *area vasculosa*.

### 5.4.2 Kontrolní skupiny

Abychom si byli jisti, že účinek kyseliny retinové je opravdu způsobený jí samotnou a nikoli přidaným rozpouštědlem (DMSO), byly konečné koncentrace dimethyl sulfoxidu v živném médiu vždy nižší než 0.03 % pro testované koncentrace ATRA od  $10^{-5}$  do  $10^{-7}$ . U koncentrace  $10^{-3}$  ATRA v médiu bylo sice z celkového objemu DMSO zastoupeno 2.86 %, ale protože DMSO způsobilo smrt jen tehdy, bylo-li o koncentraci 5 a

více % a také vzhledem k tomu, že všechny zárodky vystavené kyselině retinové o koncentraci  $10^{-4}$  s obsahem 0.286 % DMSO v médiu uhynuly, byla smrt v případě ATRA o koncentraci  $10^{-3}$  považována převážně za důsledek působení kyseliny retinové nikoli DMSO. Procentuální zastoupení výskytu normálního fenotypu jak u koncentrací ATRA od  $10^{-5}$  do  $10^{-7}$ , tak u jejich kontrol je patrné z grafu (viz Obr. 23).

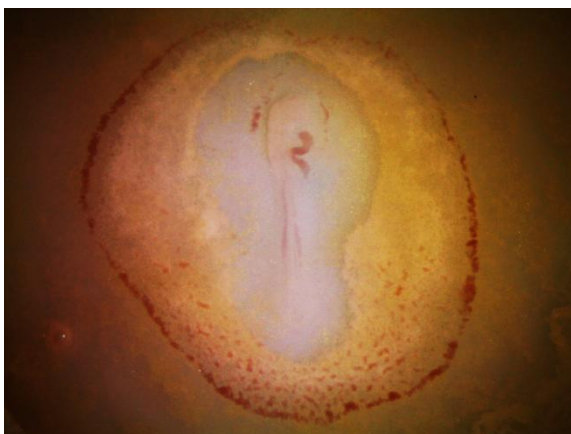


Obr. 23: Procentuální zastoupení normálních zárodků u jednotlivých testovaných koncentrací ATRA a u příslušných kontrol obsahujících DMSO.

### 5.4.3 Efekt jednotlivých testovaných koncentrací ATRA

#### Efekt ATRA o koncentraci $10^{-3}$

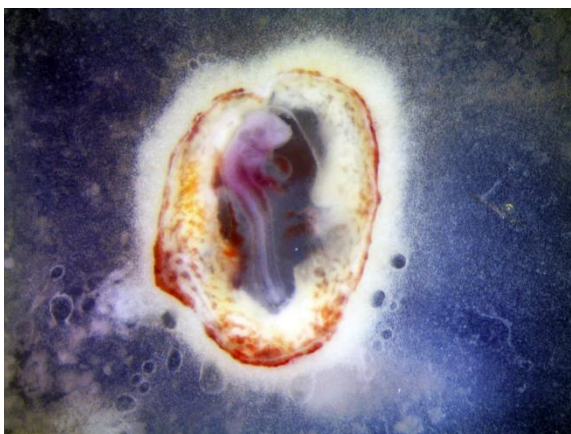
Kyselina retinová o koncentraci  $10^{-3}$ , v živném médiu z DMEM/F obsahujícím 2.86 % DMSO, způsobila smrt do 24 hodin od aplikace u sta procent kuřecích zárodků. Vzhled jednoho z mrtvých zárodků je vidět na obrázku (viz Obr. 24).



Obr. 24: Mrtvý zárodek vystavený působení ATRA o koncentraci  $10^{-3}$ .

#### **Efekt ATRA o koncentraci $10^{-4}$**

Kyselina retinová o koncentraci  $10^{-4}$ , v živném médiu z DMEM/F obsahujícím 0.286 % DMSO, způsobila také smrt všech kuřecích zárodků do 24 hodin od aplikace. Vzhled jednoho z mrtvých zárodků je vidět na obrázku (viz Obr. 25).



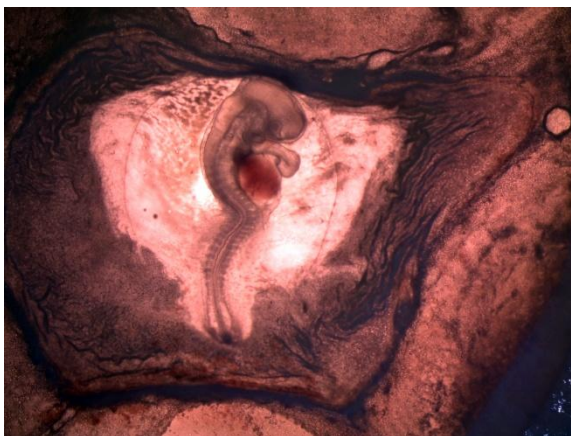
Obr. 25: Mrtvý zárodek vystavený působení ATRA o koncentraci  $10^{-4}$ .

#### **Efekt ATRA o koncentraci $10^{-5}$**

ATRA o koncentraci  $10^{-5}$ , v živném médiu z BGJb obsahujícím 0.03 % DMSO, neměla letální efekt. Devatenáct z dvaceti zárodků se nenapojilo k *area vasculosa*, protože nedošlo k vytvoření vitelinních cév. Všechny zárodky vykazovaly narušenou segmentaci somitů v kaudální oblasti a také kontrakci *area vasculosa*. U všech zárodků, až na jednu výjimku, byla patrná naměstnaná krev v oblasti srdce. Hyperlordózou trpělo jedenáct z



nich. Žádný zárodek nevykazoval normální fenotyp. Vzhled jednoho zárodka vystaveného působení ATRA o koncentraci  $10^{-5}$  je vidět na obrázku (viz Obr. 26).

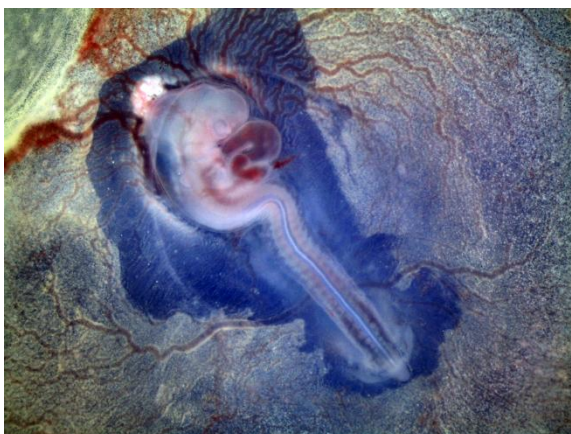


Obr. 26: Hyperlordóza, naměstnaná krev v oblasti srdce a nenapojení vitelinních cév k *area vasculosa* u živého zárodka vystaveného působení ATRA o koncentraci  $10^{-5}$ .

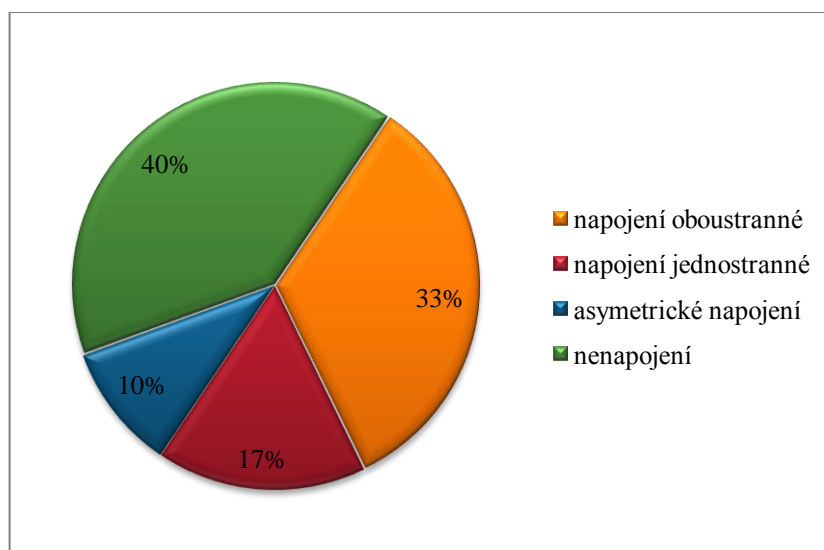
#### **Efekt ATRA o koncentraci $10^{-6}$**

*All-trans* retinová kyselina o koncentraci  $10^{-6}$ , v živném médiu z BGJb obsahujícím buď 0.04 %, nebo 0.003 % DMSO, neměla letální účinek a ani nezpůsobovala kontrakci *area vasculosa*. Z celkového počtu třiceti zárodků, nedošlo k napojení vitelinních cév k *area vasculosa* u dvanácti z nich, narušená segmentace byla odhalena u jedenácti zárodků, městnání krve u srdce se vyskytovalo v pěti případech a nakonec hyperlordóza postihla sedmnáct testovaných zárodků. Vzhled jednoho ze zárodků, vystavených působení ATRA o koncentraci  $10^{-6}$ , je vidět na obrázku (viz Obr. 27).

V případě této koncentrace kyseliny retinové bylo zajímavé, že z osmnácti zárodků, které se napojily k *area vasculosa*, jich pouze deset bylo napojeno standardně oboustranně, pět zárodků bylo napojeno jednostranně a tři zárodky byly sice napojeny oboustranně, ale asymetricky. Procentuální zastoupení různých typů napojených a nenapojených zárodků je vidět v grafu (viz Obr. 28).



Obr. 27: Hyperlordóza a asymetrické napojení vitelinních cév k *area vasculosa* u živého zárodku vystaveného působení ATRA o koncentraci  $10^{-6}$ .



Obr. 28: Procentuální zastoupení různých typů napojených a nenapojených zárodků vystavených působení ATRA o koncentraci  $10^{-6}$ .

### **Efekt ATRA o koncentraci $10^{-7}$**

*All-trans* retinová kyselina o nejnižší koncentraci, tedy o koncentraci  $10^{-7}$ , v živném médiu z BGJb obsahujícím 0.004 % DMSO, nezpůsobovala smrt, ani kontrakci žloutkové membrány a také nenarušovala segmentaci kaudální oblasti zárodku. Vitelinní cévy se nevyvinuly pouze u jednoho jedince z dvaceti. A pouze dva jedinci byli postiženi hyperlordózou. Normální fenotyp jednoho ze zárodků je vidět na obrázku (viz Obr. 29).

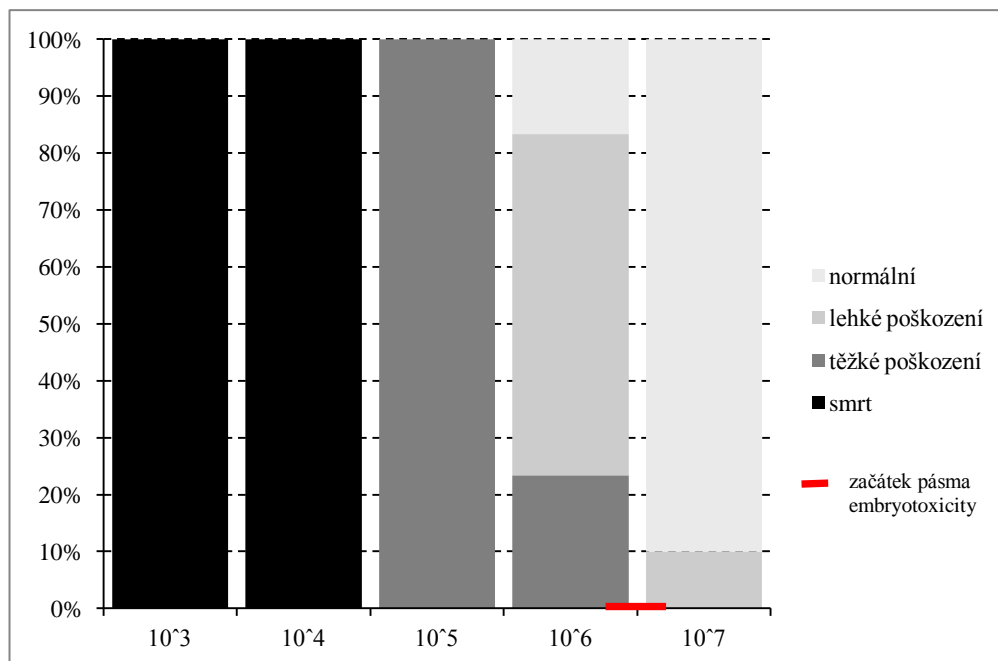


Obr. 29: Živý zárodek vystavený působení ATRA o koncentraci  $10^{-7}$ .

#### 5.4.4 Embryotoxický efekt ATRA na zárodek kuřete

Embryotoxický účinek různých koncentrací ATRA byl hodnocen na základě toho, jaká byla proporce mrtvých, těžce poškozených, lehce poškozených a normálních jedinců v dané skupině testovaných zárodků. Jako těžce poškození jedinci byli hodnoceni ti, kteří vykazovali nejméně 3 z 5 hodnocených znaků (poškození). Za lehce poškozené byli považováni ti, kteří vykazovali 1 až 2 poškození z pěti. Mezi pět hodnocených znaků (poškození) zárodku patřilo nenapojení zárodku k *area vasculosa*, narušená segmentace v kaudální oblasti, městnání krve u srdce, hyperlordóza a nakonec kontrakce *area vasculosa*. Procentuální zastoupení mrtvých, těžce a lehce poškozených zárodků a normálních zárodků je vidět v grafu (viz Obr. 30).

Statisticky významný rozdíl v míře poškození zárodků mezi jednotlivými koncentracemi ATRA, kterým byly zárodky kuřete vystaveny, byl odhalen pomocí kontingenčních tabulek a Pearsonova chí-kvadrátu (hodnota Pearsonova chí-kvadrátu: 188.263;  $sv= 12$ ,  $p < 0.001$ ). Odhadovaný začátek pásma embryotoxicity (stanoven podle Jelínek et al., 1985) byl mezi koncentrací  $10^{-7}$  a  $10^{-6}$ .



Obr. 30: Embryotoxický efekt ATRA v závislosti na její koncentraci (metoda SANDWICH).

## 5.5 CHEST, ATRA

### 5.5.1 ATRA dose-response

Embryotoxický účinek *all-trans* retinové kyseliny (ATRA) na zárodek kuřete byl testován pomocí *in ovo* metody CHEST. Na jedincích různého stáří, od ED2 do ED6, byly testovány koncentrace od  $10^{-2}$  do  $10^{-6}$  v dávkách (od 30  $\mu\text{g}$  do 0.003  $\mu\text{g}$  ATRA). Každá koncentrace ATRA byla aplikována 10 kuřecím zárodkům.

### 5.5.2 Efekt ATRA v závislosti na dni aplikace

#### Efekt ATRA na zárodek kuřete (ED2)

Subgerminální aplikace 3  $\mu\text{l}$  kyseliny retinové o koncentraci  $10^{-2}$  a  $10^{-3}$  druhý inkubační den měla za následek smrt zárodku ve sto procentech případů.

U ostatních aplikovaných koncentrací ATRA nebyla odhalena zvýšená frekvence úmrtí zárodků. K identifikovaným malformacím přeživších zárodků patřila *rumplessness* a defekt mezikomorové přepážky srdce. Počty mrtvých, malformovaných a normálních zárodků jsou uvedeny v tabulce (viz Tab. 7).

Tab. 7: Počty normálních, malformovaných (včetně malformačního spektra) a mrtvých zárodků po aplikaci ATRA na ED2 metodou CHEST\*.

ED 2					
účinek / koncentrace	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
normální	0	0	7	8	8
malformovani	0	0	2	1	1
<i>malformace kaudy</i>	/	/	1	/	/
<i>malformace obličeje</i>	/	/	/	/	/
<i>malformace končetin</i>	/	/	/	/	/
<i>malformace srdce</i>	/	/	1	1	1
<i>malformace břišní stěny</i>	/	/	/	/	/
mrtví	10	10	1	1	1
celkem	10	10	10	10	10

### Efekt ATRA na zárodek kuřete (ED3)

Intraamniální aplikace *all-trans* retinové kyseliny o koncentraci 10<sup>-2</sup> třetí embryonální den způsobila smrt všech deseti testovaných zárodků, a to do 24 hodin od aplikace.

Koncentrace 10<sup>-3</sup> měla letální účinek u čtyř zárodků. U všech přeživších zárodků pak byly odhaleny vývojové vady. Typickými vadami byly hypoplázie obličejových výběžků, redukční deformity končetin a malformace srdce (defekt mezikomorové přepážky, absence jedné z velkých srdečních cév). Žádný zárodek z této testované skupiny nevykazoval normální fenotyp.

U ostatních testovaných koncentrací ATRA nedocházelo ke zvýšené míře úhynu zárodků, avšak v případě působení ATRA o koncentraci 10<sup>-4</sup> byly čtyři zárodky postižené. K odhaleným vadám patřily především hypoplázie maxilárního výběžku a malformace končetin. Přeživší zárodky testované na účinek ATRA o dvou nejnižších koncentracích vykazovaly normální fenotyp. Počty mrtvých, malformovaných a normálních zárodků jsou uvedeny v tabulce (viz Tab. 8).

---

\* pozn. malformace neodhalena = /

Tab. 8: Počty normálních, malformovaných (včetně malformačního spektra) a mrtvých zárodků po aplikaci ATRA na ED3 metodou CHEST.

ED 3					
účinek / koncentrace	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
normální	0	0	4	10	9
malformovaní	0	6	4	0	0
<i>malformace kaudy</i>	/	3	1	/	/
<i>malformace obličeje</i>	/	6	3	/	/
<i>malformace končetin</i>	/	6	3	/	/
<i>malformace srdce</i>	/	5	/	/	/
<i>malformace břišní stěny</i>	/	/	/	/	/
mrtví	10	4	2	0	1
celkem	10	10	10	10	10

#### Efekt ATRA na zárodek kuřete (ED4)

Účinek nejvyšší koncentrace kyseliny retinové (10<sup>-2</sup>) aplikované ve 3 µl byl letální ve sto procentech případů. U devíti jedinců nastala smrt do 24 hodin od aplikace a pouze u jednoho až po 48 hodinách od aplikace.

Z testovaných zárodků vystavených působení ATRA o koncentraci 10<sup>-3</sup> se dne odběru dožily jen dva. Oba tyto zárodky měly hypoplázií obličejových výběžků a malformované končetiny (redukční deformity končetin, syndaktylie, polydaktylie).

Ve skupině zárodků, vystavených ATRA o koncentraci 10<sup>-4</sup>, bylo odhaleno pět malformovaných zárodků ze šesti žijících. Mezi identifikované vady patřila eventrace, malformace obličeje (hypoplázie maxily, rozštěp zobáku) a deformity končetin (redukční deformity, polydaktylie).

Důsledkem aplikace kyseliny retinové o dvou nejnižších koncentrací (10<sup>-5</sup> a 10<sup>-6</sup>) nebyl vznik žádné vývojové vady. Počty mrtvých, malformovaných a normálních zárodků jsou uvedeny v tabulce (viz Tab. 9).

Tab. 9: Počty normálních, malformovaných (včetně malformačního spektra) a mrtvých zárodků po aplikaci ATRA na ED4 metodou CHEST.

ED 4					
účinek / koncentrace	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
normální	0	0	1	7	7
malformovaní	0	2	5	0	0
<i>malformace kaudy</i>	/	/	/	/	/
<i>malformace obličeje</i>	/	2	2	/	/
<i>malformace končetin</i>	/	2	5	/	/
<i>malformace srdce</i>	/	1	/	/	/
<i>malformace břišní stěny</i>	/	/	1	/	/
mrtví	10	8	4	3	3
celkem	10	10	10	10	10

### Efekt ATRA na zárodek kuřete (ED5)

Kyseliny retinová o koncentraci 10<sup>-2</sup> aplikovaná na ED5 způsobila smrt u všech zárodků až na jeden. Tento zárodek byl silně malformovaný. Zárodek měl rozštěp zobáku, deformaci mandibuly, redukční deformity končetin a vady srdce (defekt mezikomorové přepážky, absence velké srdeční cévy).

Následující koncentrace 10<sup>-3</sup> měla za následek smrt čtyř zárodků. Ze zárodků, které se dožily dne odběru, byly čtyři malformované. Typické byly malformace končetin a srdce (defekt mezikomorové přepážky, absence velké srdeční cévy, transpozice velkých cév).

Ve skupině zárodků vystavených působení ATRA o koncentraci 10<sup>-4</sup> byla odhalena mírně zvýšená mortalita zárodků (40 %). Jediný zárodek z přeživších měl defekt mezikomorové přepážky.

Žijící zárodky z poslední testované koncentrace (10<sup>-5</sup>) vykazovaly normální fenotyp odpovídající devátému dni vývoje. Počty mrtvých, malformovaných a normálních zárodků jsou uvedeny v tabulce (viz Tab. 10).

Tab. 10: Počty normálních, malformovaných (včetně malformačního spektra) a mrtvých zárodků po aplikaci ATRA na ED5 metodou CHEST\*.

ED 5					
účinek / koncentrace	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
normální	0	2	5	8	X
malformováni	1	4	1	0	X
<i>malformace kaudy</i>	/	/	/	/	X
<i>malformace obličeje</i>	1	1	/	/	X
<i>malformace končetin</i>	1	3	/	/	X
<i>malformace srdce</i>	1	4	1	/	X
<i>malformace břišní stěny</i>	/	/	/	/	X
mrtví	9	4	4	2	X
celkem	10	10	10	10	X

### Efekt ATRA na zárodek kuřete (ED6)

Kyselina retinová o nejvyšší koncentraci (10<sup>-2</sup>) měla letální účinek v devadesáti procentech případů. Jediný přeživší zárodek vykazoval normální fenotyp.

Ze skupiny zárodků, kterým byla aplikována ATRA o koncentraci 10<sup>-3</sup>, se čtyři nedožily devátého dne inkubace. Z přeživších zárodků byl jen jeden malformovaný, měl defekt mezikomorové přepážky.

Ostatní koncentrace *all-trans* retinové kyseliny nezpůsobovaly zvýšenou míru letality. Všechny zárodky měly zcela normální fenotyp. Počty mrtvých, malformovaných a normálních zárodků jsou uvedeny v tabulce (viz Tab. 11).

---

\* pozn. koncentrace netestována = X

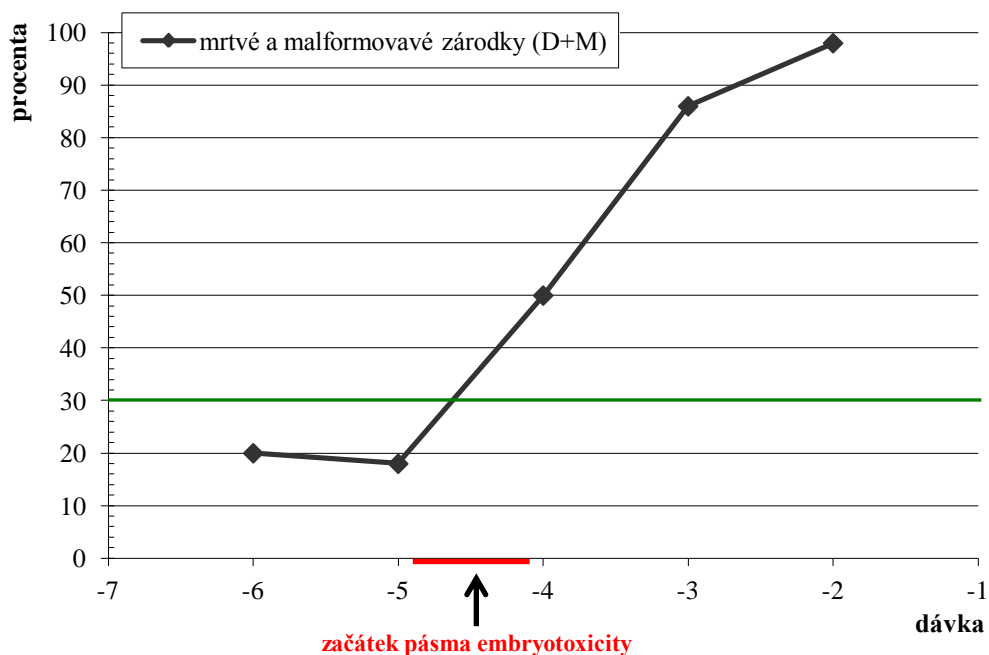


Tab. 11: Počty normálních, malformovaných (včetně malformačního spektra) a mrtvých zárodků po aplikaci ATRA na ED6 metodou CHEST.

ED 6					
účinek / koncentrace	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
normální	1	5	8	8	8
malformování	0	1	0	0	0
<i>malformace kaudy</i>	/	/	/	/	/
<i>malformace obličeje</i>	/	/	/	/	/
<i>malformace končetin</i>	/	/	/	/	/
<i>malformace srdce</i>	/	1	/	/	/
<i>malformace břišní stěny</i>	/	/	/	/	/
mrtví	9	4	2	2	2
celkem	10	10	10	10	10

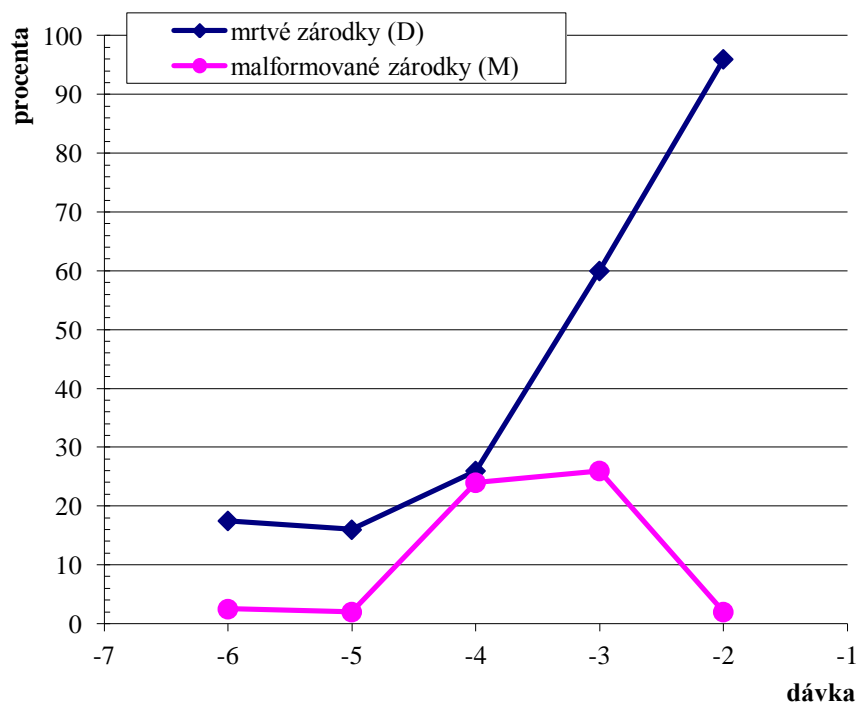
### 5.5.3 Závislost počtu mrtvých a malformovaných zárodků na aplikované dávce ATRA

Celkový počet (suma) mrtvých a malformovaných zárodků (D+M) v závislosti na aplikované dávce (koncentraci) ATRA je vidět v grafu (viz Obr. 31). Pouze koncentrace *all-trans* retinové kyseliny vyšší než 10<sup>-4</sup> překročily hranici 30 % představující maximální míru výskytu spontánních úmrtí a malformací (Jelínek et al., 1985). Suma mrtvých a malformovaných jedinců v závislosti na aplikované dávce (koncentraci) stoupala a u koncentrace 10<sup>-2</sup> dosáhla téměř sta procent. Koncentrace 10<sup>-5</sup> a 10<sup>-6</sup> nezpůsobily smrt či malformaci více jak 30 % zárodků. Proto se odhadovaný začátek pásma embryotoxicity nachází mezi koncentracemi 10<sup>-5</sup> a 10<sup>-4</sup>.



Obr. 31: Závislost počtu mrtvých a malformovaných zárodků (D+M) na aplikované dávce ATRA od ED2 do ED6.

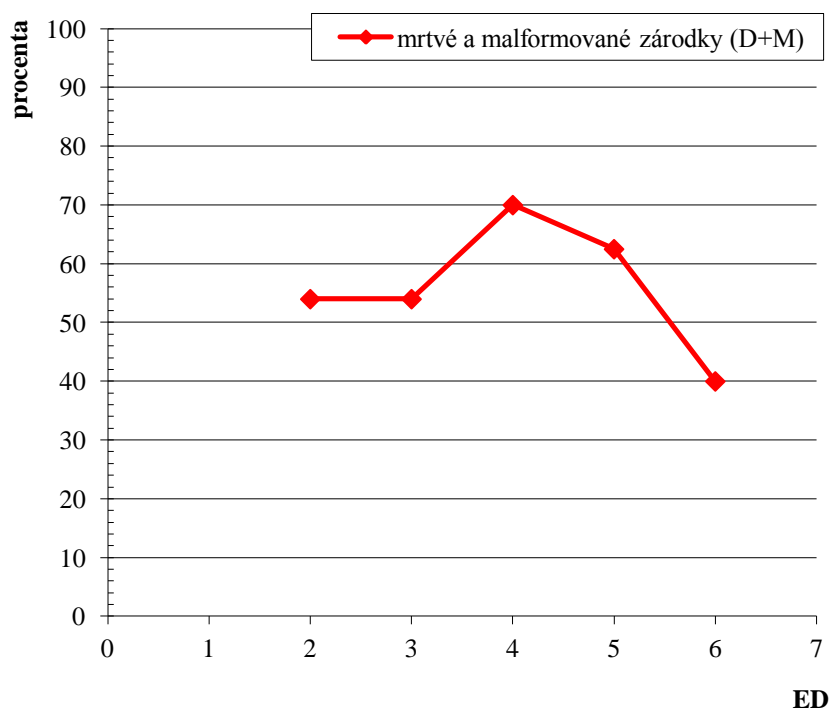
Z následujícího grafu (viz Obr. 32) je vidět, že nejvyšší dávka kyseliny retinové způsobila smrt 96 % zárodků a malformaci jen 2 % zárodků. Další dávka ( $10^{-3}$ ) měla letální účinek v 60 % případů a způsobila malformace 26 % zárodků. Dávka ATRA  $10^{-4}$  měla přibližně stejnou proporcii mrtvých (26 %) a malformovaných (24 %) zárodků. U dvou nejnižších dávek bylo zastoupení malformovaných jedinců nižší než 3 % a počet mrtvých se nepřesáhl 20 %.



Obr. 32: Závislost počtu mrtvých (D) a malformovaných (M) zárodků na aplikované dávce ATRA od ED2 do ED6.

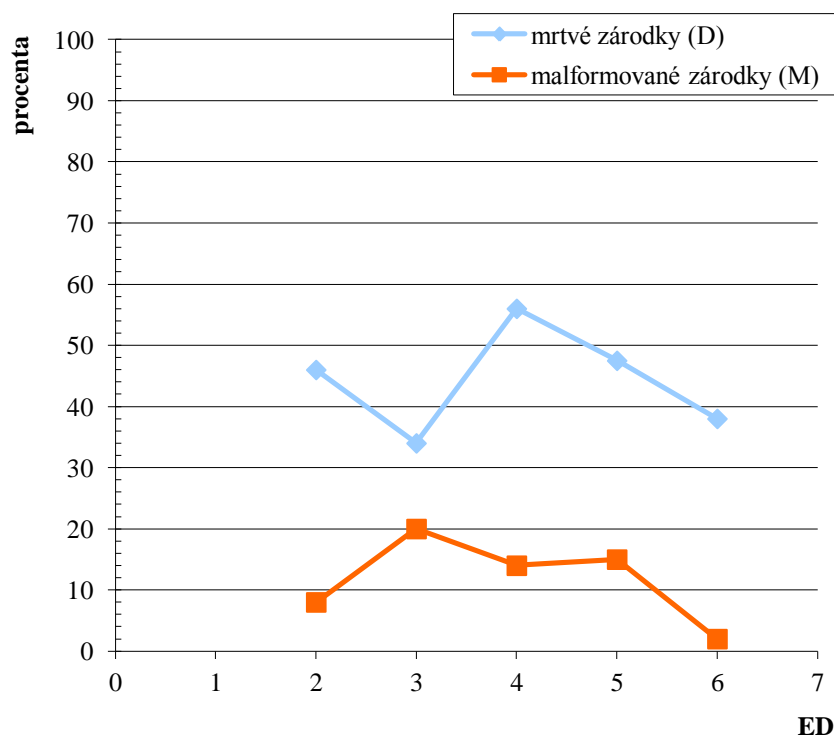
#### 5.5.4 Závislost počtu mrtvých a malformovaných zárodků na dni aplikace ATRA

Celkový počet (suma) mrtvých a malformovaných (D+M) zárodků v závislosti na dni aplikace ATRA je vidět v grafu (viz Obr. 33). Nejvyšší počet mrtvých a malformovaných jedinců je důsledkem aplikace *all-trans* retinové kyseliny na čtvrtém nebo pátém embryonálním dni, kdy suma mrtvých a malformovaných přesahuje 60 %. Počet mrtvých a malformovaných zárodků aplikovaných na ED2 a ED3 dosáhl 54 %. A v případě posledního dne aplikace, tedy ED6, je suma mrtvých a malformovaných zárodků nejnižší (40 %).



Obr. 33: Závislost počtu mrtvých a malformovaných zárodků (D+M) na dni aplikace ATRA pro testované dávky  $10^{-2}$  až  $10^{-6}$ .

Celkový počet mrtvých (D) a malformovaných (M) zárodků v závislosti na dni aplikace ATRA je vidět v grafu (viz Obr. 34). Největší procento malformovaných a zároveň nejnižší procento mrtvých zárodků je důsledkem aplikace ATRA třetí den embryonálního vývoje. Smrt je nejvíce zastoupena mezi zárodky, kterým byla kyselina retinová aplikována čtvrtý den vývoje. Jinak procento mrtvých zárodků aplikovaných na ED2 a ED5 je přibližně stejné a pohybuje se okolo 45 %. Množství malformovaných zárodků bez ohledu na den aplikace nepřesahuje 20 %.



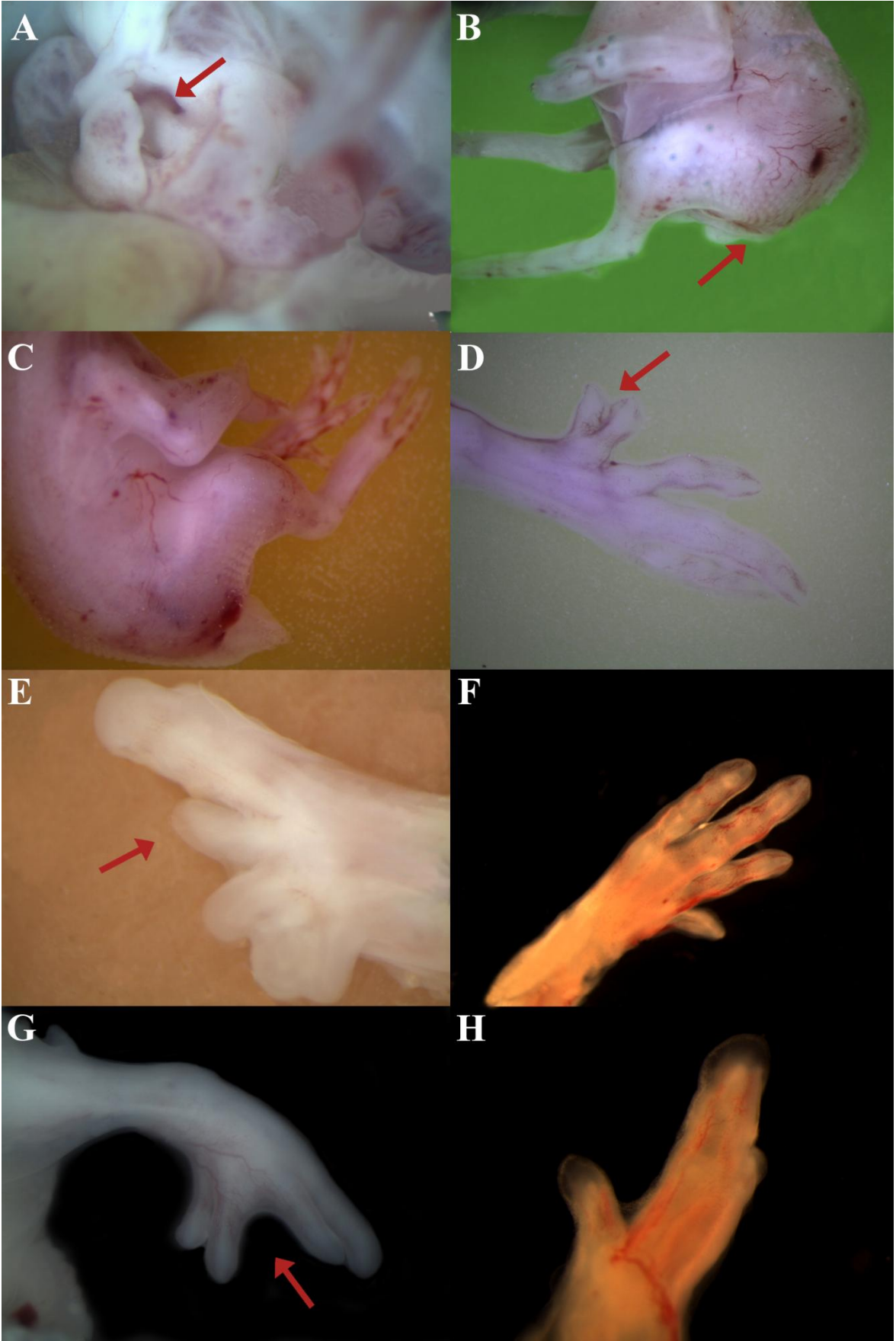
Obr. 34: Závislost počtu mrtvých (D) a malformovaných (M) zárodků na dni aplikace ATRA pro testované dávky  $10^{-2}$  až  $10^{-6}$ .

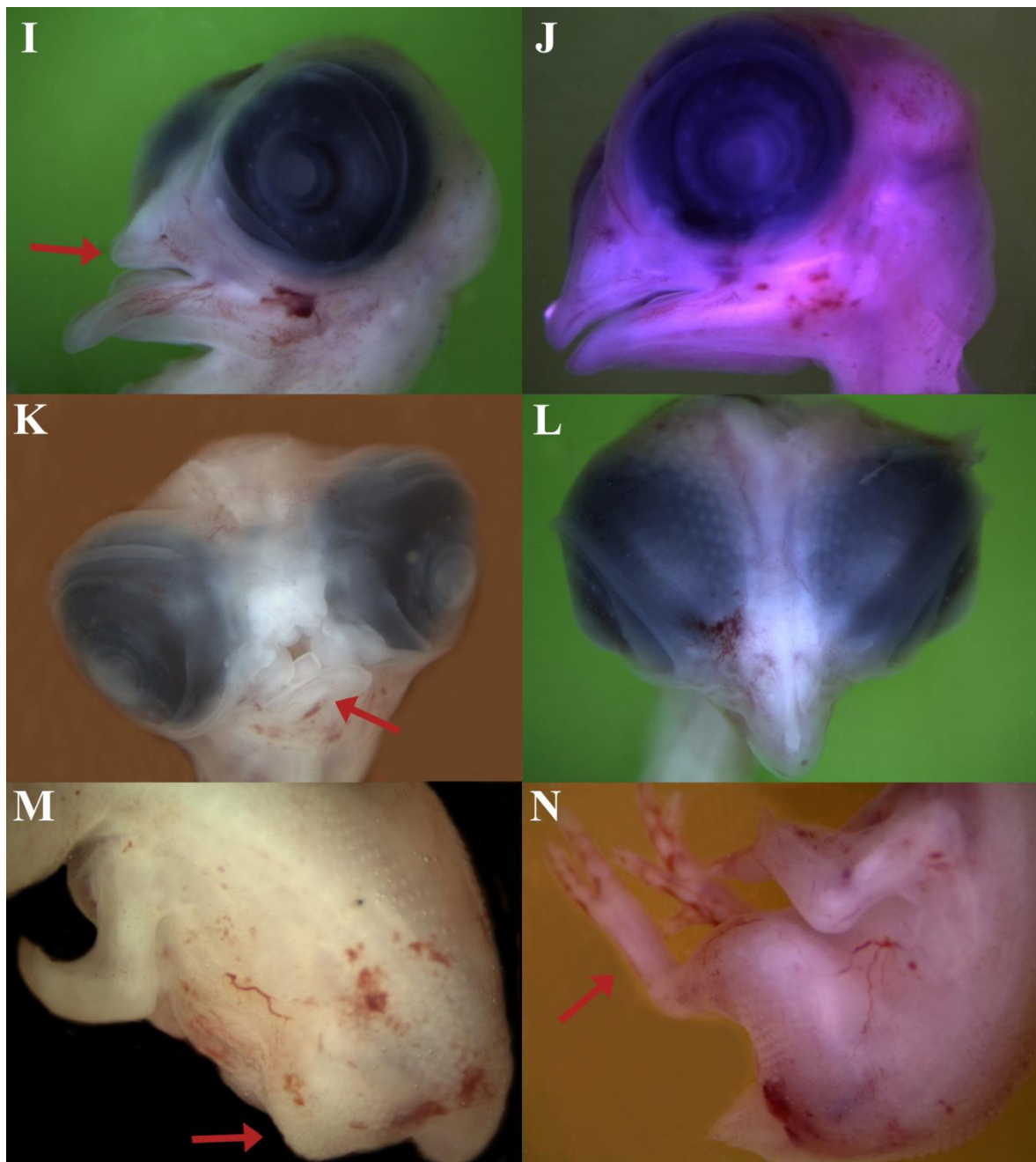
### 5.5.5 Malformační spektrum

*All-trans* retinová kyselina nejčastěji způsobovala malformace kaudální oblasti zárodku, obličeje, končetin a srdce (viz Obr. 35). K malformacím kaudální oblasti zárodku patřila *rumplessness* (RS) a syndrom kaudální regrese (SCR). Nejčastější malformací obličeje byla hypoplázie obličejových výběžků, popř. rozštěp zobáku (CB). Končetiny byly nejčastěji poškozeny redukčními deformitami (např. amélie), ale vzácná nebyla ani polydaktylie či syndaktylie. Nejvíce zastoupenou vadou srdce byl defekt mezikomorové přepážky, ale v některých případech i absence jedné z velkých srdečních cév, vzácně i jejich transpozice. Početnost a zastoupení jednotlivých malformací u žijících zárodků vzhledem ke dni aplikace je vidět v tabulce (viz Tab. 12).

Tab. 12: Celkové počty normálních, malformovaných (včetně malformačního spektra) a mrtvých zárodků bez ohledu na koncentraci ATRA aplikované od ED2 do ED6 metodou CHEST.

účinek / ED	ED 2	ED 3	ED 4	ED 5	ED 6
<b>normální</b>	23	23	15	15	30
<b>malformovaní</b>	4	10	7	6	1
<i>malformace kaudy</i>	1	4	0	0	0
<i>malformace obličeje</i>	0	9	4	2	0
<i>malformace končetin</i>	0	9	7	4	0
<i>malformace srdce</i>	3	5	1	6	1
<i>malformace břišní stěny</i>	0	1	1	0	0
<b>mrtví</b>	13	17	28	19	19
<b>celkem</b>	50	50	50	40	50





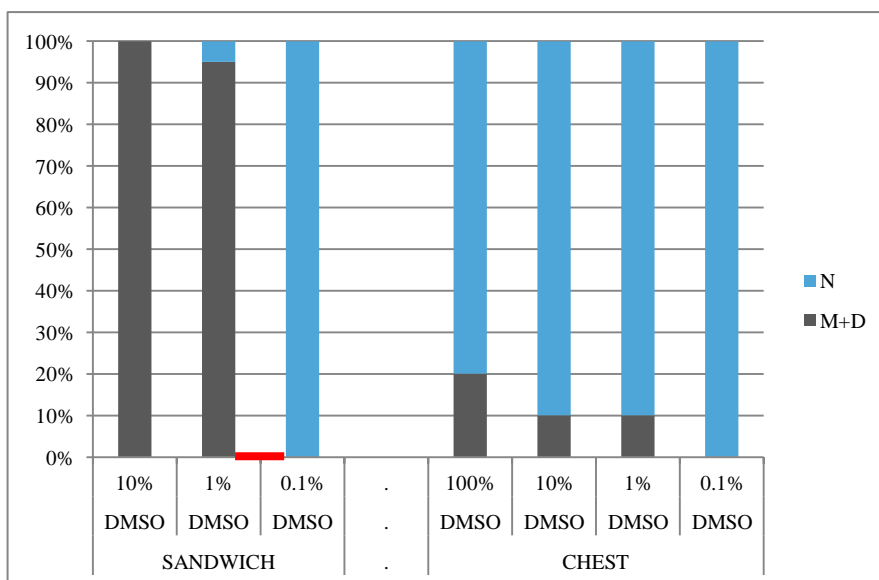
Obr. 35: Nejčastější malformace způsobené *all-trans* retinovou kyselinou: (A) defekt mezikomorové přepážky srdce, (B) *rumpleness*, (C) kontrola, (D) polydaktilie na DK, (E) polydaktilie na DK, (F) kontrola DK, (G) *lobster-claw* na HK, (H) kontrola HK, (I) hypoplázie maxily, (J) kontrola, (K) hypoplázie všech obličejových výběžků, (L) kontrola, (M) amélie levé DK, (N) kontrola.



## 5.6 Porovnání metody SANDWICH a CHEST na ED2

### 5.6.1 Porovnání odhadu začátku pásma embryotoxicity DMSO, ED2

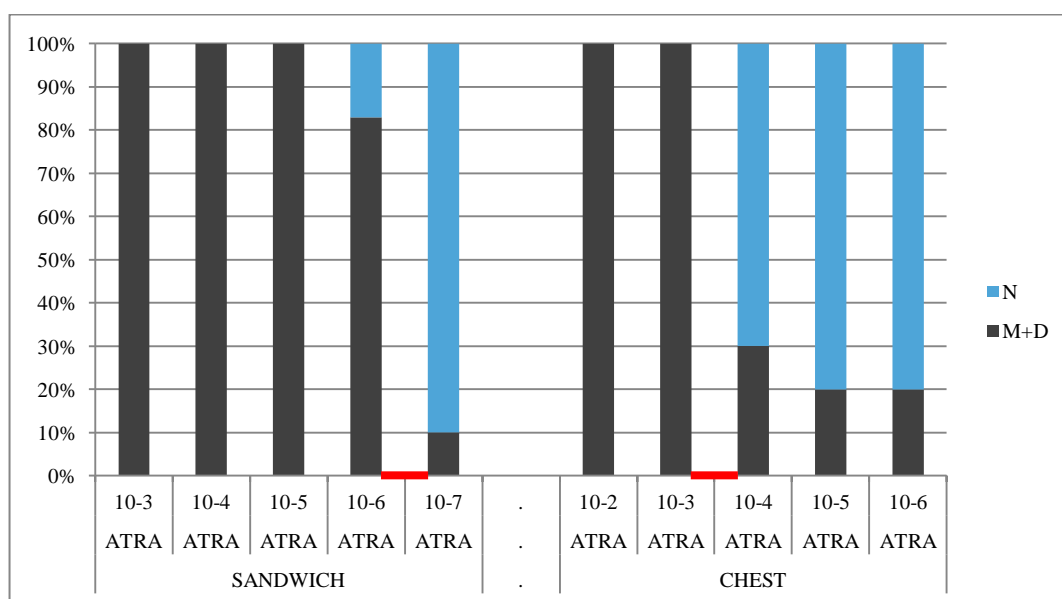
Dimethyl sulfoxid aplikovaný na druhém embryonálním dni měl odlišný začátek pásma embryotoxicity při porovnání metody SANDWICH a CHEST (viz Obr. 36). V případě metody SANDWICH se nacházel odhadovaný začátek pásma embryotoxicity mezi koncentracemi 1 % (resp. 0.5 %) a 0.1 % DMSO. Dimethyl sulfoxid aplikovaný subgerminálně (za využití metody CHEST) kuřecím zárodkům na ED2 neměl embryotoxický efekt ani v nejvyšší testované koncentraci. Rozdíl v odhadovaném začátku pásma embryotoxicity získaném pro DMSO pomocí metody SANDWICH a CHEST činil při porovnání systému *in vitro* a *in ovo* více jak dva dávkové řády.



Obr. 36: Porovnání procentuálního zastoupení součtu malformovaných a mrtvých (M+D) s normálními (N) zárodky v závislosti na koncentraci DMSO a metodě aplikace na ED2 (červeně označen odhadovaný začátek pásma embryotoxicity).

### 5.6.2 Porovnání odhadu začátku pásma embryotoxicity ATRA, ED2

*All-trans* retinová kyselina aplikovaná zárodkům kuřete na druhém embryonálním dni měla odlišný začátek pásma embryotoxicity při porovnání metody SANDWICH a CHEST (viz Obr. 37). V případě metody SANDWICH se odhadovaný začátek pásma embryotoxicity ATRA nacházel mezi koncentracemi  $10^{-6}$  a  $10^{-7}$ . Naopak u metody CHEST byl odhadovaný začátek pásma embryotoxicity mezi koncentrací (dávkou)  $10^{-3}$  a  $10^{-4}$ . Rozdíl v odhadovaném začátku pásma embryotoxicity získaném pro ATRA pomocí metody SANDWICH a CHEST činil při porovnání systému *in vitro* a *in ovo* tři dávkové řády.



Obr. 37: Porovnání procentuálního zastoupení součtu malformovaných a mrtvých (M+D) s normálními (N) zárodky v závislosti na koncentraci ATRA a metodě aplikace na ED2 (červeně označen odhadovaný začátek pásma embryotoxicity).

## 6 DISKUZE

### 6.1 Vypracování metody SANDWICH a její standardizace

Během standardizace metody SANDWICH byla použita dvě různá živná média, a to živné médium obsahující *DMEM/F-12+GlutaMAX<sup>TM</sup>-I médium (DMEM/F-12 (Ham) (1:1) IX (Gibco)* (dále jen DMEM/F médium) nebo *BGJb médium (Fitton-Jackson modification) (IX) (Gibco)*. Ač mezi živnými médii nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl týkající se tvorby vitelinních cév, zárodky, které se vyvíjely na BGJb médiu, byly větší, dospěly do pozdějších stádií vývoje a *antemortem* změny se u nich začaly objevovat později než v případě zárodků rostoucích na živném médiu obsahujícím DMEM/F médium. Pravděpodobnou příčinou této skutečnosti je vyšší koncentrace aminokyselin, které BGJb médium obsahuje. Zárodek si tak tuto větší zásobu aminokyselin vyčerpá později.

K otestování nové metody byl použit prokázaný lidský teratogen, a to vitamin A, resp. jeho metabolit *all-trans* retinová kyselina (ATRA). Kyselina retinová byla zvolena úmyslně s ohledem na to, že teratogenní účinek retinoidů, hlavně pak vitaminu A, byl prokázán pomocí mnoha klasických i alternativních metod testování a detekce teratogenů (např. Cohlán, 1953; Kochhar a Johnson, 1965; Lee et al., 1991). Embryotoxický účinek ATRA na vývoj zárodku jsme proto očekávali i v případě metody SANDWICH. Druhou testovanou substancí byl dimethyl sulfoxid (DMSO), což je běžně používané rozpouštědlo, které jsme využívali k rozpuštění ATRA. Kyselina retinová se ve stoprocentním DMSO rozpouštěla velmi ochotně. Embryotoxický účinek ATRA byl potvrzen i touto novou *in vitro* metodou. Překvapivě byl odhalen i embryotoxický účinek velmi nízkých koncentrací DMSO.

### 6.2 Embryotoxický účinek DMSO

Embryotoxický účinek DMSO byl námi prokázán v podstatě pouze pro 100 % DMSO aplikované o objemu 3  $\mu$ l kuřecím zárodkům na ED3 pomocí metody CHEST, kdy měla tato koncentrace letální efekt pro 9 z 10 testovaných zárodků, jediný přeživší zárodek byl pak výrazně malformovaný, postižena byla kaudální oblast zárodku, končetiny, břišní stěna a srdce. V případě metody SANDWICH (ED2) uhynuly všechny zárodky vyvíjející se na živném médiu obsahujícím 10 % nebo 5 % DMSO. U zárodků, které byly vystaveny

působení 1 % nebo 0.5 % DMSO, byla odhalena naměstnaná krev v dolních končetinových pupenech v 95 %, resp. 40 % případů. Prokázali jsme tak nejen letální, ale i teratogenní efekt DMSO působícího během embryonálního vývoje kuřecího zárodku (viz Obr. 9, Obr. 10, Obr. 11). Tento embryotoxický účinek nízkých koncentrací DMSO byl nečekaný.

Účinek DMSO na zárodek kuřete byl testován i dalšími autory. Výsledky jsou však nejednoznačné. Některé studie embryotoxický účinek DMSO potvrzují, jiné ne. Mezi studie, jež neodhalily negativní účinek DMSO na kuřecí zárodek, patří např. studie Osmonda et al. (1991) a Dickmana a Smithe (1996). Osmond et al. (1991) testovali účinek ATRA na vyvíjející se srdce zárodku kuřete (3 až 8 HH). DMSO bylo použito jako rozpouštědlo pro ATRA. Byl proto testován i efekt samotného rozpouštědla na vývoj srdce. DMSO bylo buď součástí živného média (modifikace metody podle New, 1955), kde tvořilo 1 % objemu média, nebo bylo aplikováno jako součást „soaked beads“. Procento malformovaných zárodků se nijak významně nelišilo od kontrol. Autoři pravděpodobně nepozorovali poškození končetinových pupenů zárodku, jež jsme pozorovali my, protože testovali vliv DMSO na vývojově mladší zárodky. Končetinové pupeny se totiž začínají výrazně vyvíjet až od pozdějších stádií embryonálního vývoje. Dickman a Smith (1996) také testovali účinek kyseliny retinové na morfogenezi srdce kuřecích zárodků (4 HH) a DMSO bylo opět použito jako rozpouštědlo. Kyselina retinová, resp. DMSO bylo aplikováno jako součást „soaked beads“ na Hensenův uzel. Výskyt malformací se opět nijak nelišil mezi zárodky vystavenými DMSO a mezi kontrolními zárodky (Dickman a Smith, 1996).

Embryotoxický efekt DMSO byl prokázán např. ve studii Caujolleho et al. (1967). V této studii bylo 50 % DMSO injikováno na vitelinní cévy (ED3) nebo na alantois (ED4) kuřecím zárodkům. Maximum malformací bylo důsledkem aplikace DMSO v dávkách okolo 10.3 mg na embryo při aplikaci na ED3 a 12.2 mg při aplikaci na ED4. Nejčastějšími malformacemi v případě aplikace na ED3 byly anoftalmie levého oka a levostranná torze zobáku spojená s redukcí horního zobáku a výjimečně i malformace končetin. Pro zárodky aplikované na ED4 bylo typické poškození končetin související s narušením vývoje cévního systému končetinového pupenu, protože již 4 hodiny po aplikaci se na končetinách objevila krvácivá místa, puchýře. Kromě končetin byl postižen i zobák, oči, ocas a stěna tělní (celosomie) (Caujolle et al., 1967). Při porovnání našich výsledků s výsledky Caujolleho et al. (1967) jsme zjistili, že jsme sice také pozorovali přítomnost krve v končetinových pupenech, ale jen v pupenech dolních končetin. V našem případě to bylo

důsledkem působení 1 % či 0.5 % DMSO na zárodek kuřete *in vitro* (metoda SANDWICH). K přenesení zárodka na živné médium obsahující příslušnou koncentraci DMSO došlo druhý embryonální den. Výsledky Caujolleho et al. (1967) ukazují, že krev byla přítomna v podobě jakýchsi krev obsahujících puchýřů, a to jak na horních končetinových pupenech, tak na dolních, a to po aplikaci DMSO (dávky v desítkách mg) na ED4 na systému *in ovo*. U zárodků, které jsme vystavili působení DMSO druhý, třetí i čtvrtý embryonální den *in ovo* pomocí metody CHEST (3  $\mu$ l), jsme nezaznamenali výskyt krvavých oblastí na pupenech ani dolních, ani horních končetin. Rozdíl ve výsledcích získaných z obou *in ovo* systémů je pravděpodobně důsledkem odlišné cesty aplikace a též značně odlišných dávek. Je velmi zajímavé, že jsme pozorovali přítomnost krve pouze na systému *in vitro* a nikoli na systému *in ovo* a že jsme oproti Caujollemu et al. (1967) tuto krev pozorovali pouze v dolních končetinových pupenech. Je otázkou, zda se jedná o stejná poškození, protože v našem případě byla krev pozorována v končetinových pupenech, ale u Caujolleho et al. (1967), byla tato krev popsána jako „krvavé puchýře“ na končetinových pupenech.

Další studie, ve které byl embryotoxický efekt DMSO potvrzen, pochází z roku 1970. DMSO bylo aplikováno přímo na pupen horní i dolní končetiny čtyřdenním kuřecím zárodkům (22-23 HH) v dávkách 5, 10 nebo 15  $\mu$ l. DMSO postihovalo jak horní, tak dolní končetiny, na kterých se záhy po aplikaci objevila krvácivá místa, která se postupně změnila v krevní cysty. Histologická analýza končetinových pupenů ukázala, že DMSO působí na kapilární síť. DMSO způsobilo dilataci cév, což vedlo ke změnám nejen v endotelu, ale také mesenchymu končetinového pupenu (Cros et al., 1970). Při porovnání našich výsledků s výsledky Crose et al. (1970) pozorujeme stejný efekt DMSO, ale získaný na zcela jiných systémech. V našem případě mělo DMSO tento účinek na systému *in vitro*, kdy DMSO působilo na zárodek od ED2. Postiženy byly pouze dolní končetinové pupeny, a to u zárodků vystavených působení 1 %, popř. 0.5 % DMSO. Stejně jako Cros et al. (1970) i my jsme na histologických řezech pozorovali rozšíření kapilár na úkor mesenchymu v končetinových pupenech testovaných zárodků. U zárodků, které jsme vystavili působení DMSO na ED4 *in ovo* pomocí metody CHEST (3  $\mu$ l), jsme nezaznamenali výskyt krvavých oblastí na končetinových pupenech. Otázkou tedy zůstává, proč jsme nepozorovali stejný účinek DMSO na našem systému *in ovo*. Vysvětlením tohoto rozdílu je pravděpodobně způsob aplikace a také aplikovaná dávka.

Embryotoxický účinek DMSO byl odhalen i ve studii Larsena a Jannerse (1987). Autoři aplikovali 1  $\mu$ l 90 % DMSO 109 kuřecím zárodkům od stádia 17 HH do stádia 23 HH. DMSO bylo nakapáno na pupen pravého křídla a na přilehlé somity. 90 % DMSO bylo zodpovědné za poškození somitů, resp. sklerotomu. Dimethyl sulfoxid způsoboval především defekty lopatky a obratlů, ale v některých případech i defekty dlouhých kostí křídla (Larsen a Janners, 1987). Porovnáme-li naše výsledky *in ovo* s výsledky Larsena a Jannerse (1987), překvapí nás, že my jsme tyto defekty nepozorovali. Způsob aplikace byl v podstatě shodný, testovaná dávka taktéž, stejně jako testovaná stádia a den odběru (v případě Larsena a Jannerse: ED10). Jedním z možných vysvětlení je způsob aplikace, kdy v případě Larsena a Jannerse (1987) byl 1  $\mu$ l 90 % dimethyl sulfoxidu aplikován konkrétně na pupen pravého křídla a přilehlé somity. V našem případě však bylo aplikováno 100 % DMSO o objemu 3  $\mu$ l nespécificky do amniového vaku. Je však zarážející, že v našem případě došlo ke smrti zárodka v devíti z deseti případů po aplikaci 100 % DMSO na ED3 a jediný přeživší zárodek byl silně malformovaný. Kromě jiných byly postiženy i dolní končetiny, jedna zcela chyběla a druhá byla redukována. Malformace křídel jsme nepozorovali. Aplikace 100 % DMSO na ED4 neměla za následek zvýšenou mortalitu a ve skupině testovaných zárodků nebyla odhalena žádná vývojová vada. Dalším možným vysvětlením je, že naše dávka (3  $\mu$ l) aplikovaná na ED3 byla příliš vysoká a proto byla převažujícím efektem letalita, pokud bychom však snížili dávku, např. na 1  $\mu$ l, mohli bychom snad také pozorovat větší míru poškození zárodka na úkor jeho smrti.

S ohledem na naše výsledky získané pomocí metody CHEST, a hlavně pak pomocí metody SANDWICH, je důležité se zamyslet nad tím, zda je dimethyl sulfoxid opravdu tak bezpečnou látkou, jak je obecně prezentováno. Využití DMSO je poměrně hojné, a většinou souvisí s jeho schopností procházet přes většinu membrán (Wood a Wood, 1975) a se schopností spolu se sebou samým transportovat i jiné látky a usnadňovat tak jejich přechod přes membrány (Sulzberger et al., 1967). S těmito vlastnostmi DMSO souvisí i otázka, zda v časných stádiích embryonálního vývoje lidského zárodka nemůže být narušen jeho vývoj tím, že DMSO ovlivní homeostázu vyvíjejícího se embrya a usnadní transport některých látek, které by pak mohly negativně ovlivnit jeho vývoj. Domníváme se proto, že by měl být dimethyl sulfoxid podroben dalším teratologickým studiím, abychom si byli jisti tím, jak DMSO ovlivňuje zárodek.

### 6.3 Embryotoxický účinek ATRA

Embryotoxický účinek vitamínu A, resp. jeho metabolitu *all-trans* retinové kyseliny jsme potvrdili jak na systému *in ovo* (CHEST), tak na systému *in vitro* (SANDWICH). Odhadovaný začátek pásma embryotoxicity se pohyboval mezi dávkovými řády  $10^{-5}$  až  $10^{-4}$  v případě metody CHEST pro ED2-ED6 (průměr pěti embryonálních dní). Tyto výsledky byly totožné s výsledky Jelínka a Kistlera (1981) i Peterky et al. (1997), kteří taktéž testovali ATRA metodou CHEST. Kyselina retinová typicky postihovala kaudální oblast zárodku, obličej, končetiny a srdce spolu se srdečními cévami. Malformace pozorované na kuřecím zárodku *in ovo* po administraci ATRA jsou ve shodě s malformacemi pozorovanými po podání vitamínu A nebo jeho analogů laboratorním savcům (např. Cohlan, 1953; Kalter, 1960; Griffith a Wiley, 1991), popř. člověku (např. Lammer et al., 1985).

V případě metody SANDWICH jsme pozorovali letální účinek u koncentrací  $10^{-3}$  a  $10^{-4}$ , a to u všech testovaných zárodků. Teratogenní účinek byl prokázán pro koncentraci  $10^{-5}$ , postiženy byly všechny zárodky. Ze zárodků vystavených působení ATRA o koncentraci  $10^{-6}$  vykazovalo normální fenotyp pouze 17 % z nich. Nejnižší testovaná koncentrace, tedy  $10^{-7}$ , neměla teratogenní efekt. 90 % zárodků z této koncentrace bylo zcela normálních ve fenotypu (viz Obr. 23). Odhadovaný začátek pásma embryotoxicity se pohyboval mezi dávkovými řády  $10^{-6}$  a  $10^{-7}$ .

Teratogenní účinek ATRA, resp. malformační spektrum na systému *in vitro* v případě metody SANDWICH je nesrovnatelné se systémem *in ovo* i s výsledky z klasických metod, protože zárodek *in vitro* se bez *antemortem* změn dožije maximálně ED4, a to ještě nejsou plně vyvinuté všechny orgánové soustavy a vzniklé malformace jako např. defekt mezikomorové přepážky či rozštěp zobáku nejsou patrné. Jedinou srovnatelnou malformací pozorovatelnou jak na systému *in vitro*, tak na systému *in ovo*, ale i na klasických metodách je postižení kaudální oblasti zárodku, jako syndrom kaudální regrese či *rumplessness*.

## 6.4 Porovnání odhadu začátku pásma embryotoxicity pro ATRA i DMSO na ED2 získaných metodou CHEST a SANDWICH

K porovnání odhadovaného začátku pásma embryotoxicity testovaných látek získaných pomocí metody SANDWICH a CHEST mohlo dojít pouze na druhém embryonálním dni. Odhadovaný začátek pásma embryotoxicity pro ATRA se na ED2 nacházel mezi dávkovými řády  $10^{-4}$  a  $10^{-3}$  v případě metody CHEST. V případě metody SANDWICH se nacházel mezi dávkovými řády  $10^{-7}$  a  $10^{-6}$ . Rozdíl v odhadovaném začátku pásma embryotoxicity získaném pro ATRA pomocí metody SANDWICH a CHEST tak činil tři dávkové řády.

U DMSO aplikovaného na ED2 metodou CHEST nebyly ani jeho nejvyšší testované koncentrace embryotoxické. V případě metody SANDWICH se pak jeho odhadovaný začátek pásma embryotoxicity pohyboval mezi koncentrací 0.1 % a 0.5 % DMSO. Rozdíl v odhadovaném začátku pásma embryotoxicity získaném pro DMSO pomocí metody SANDWICH a CHEST činil tedy více jak dva dávkové řády.

Rozdíl v senzitivitě, resp. v odhadovaném začátku pásma embryotoxicity obou systémů vůči *all-trans* retinové kyselině a dimethyl sulfoxidu na ED2 může mít několik důvodů. K těmto důvodům by mohlo patřit, že aplikace testovaných látek v případě metody CHEST byla jednorázová, testovaná látka působila v řádu několika hodin, a probíhala subgerminálně, došlo tak k výraznému naředění obou těchto látek žloutkem zárodku. Naproti tomu u metody SANDWICH docházelo v podstatě k testování chronického působení obou látek. Nedochovalo k jejich naředění vaječným žloutkem, protože ten v případě metody SANDWICH není přítomný, a zároveň tyto látky působily na zárodek po celou dobu jeho vývoje (ED2-ED4) na Petriho misce. Zárodky *in vitro* tak byly po delší dobu vystaveny působení vyšších koncentrací testovaných látek.

Metoda SANDWICH tak splnila naše očekávání, protože zvýšila senzitivitu systému obsahujícího kuřecí zárodek vůči působení *all-trans* retinové kyseliny o tři dávkové řády a vůči DMSO o více jak dva dávkové řády v porovnání s metodou CHEST při aplikaci na ED2. Proto se domníváme, že metoda SANDWICH je vhodným doplněním subgerminální aplikace testované látky pomocí metody CHEST na druhém embryonálním dni, protože eliminuje efekt naředění testované látky žloutkem zárodku.



## 6.5 CHEST vs. SANDWICH

Alternativní metody testování embryotoxicity látek využívají toho, že jsou oproti klasickým testovacím metodám zbaveny metabolického systému mateřského organismu. Ideálním modelovým organismem pro alternativní metody testování embryotoxicity látek je zárodek kuřete, který umožňuje testovat embryotoxicitu jak v přirozeném prostředí zárodku (*in ovo*), tak v umělých podmínkách (*in vitro*). V našem případě byly kuřecí zárodky vystaveny působení testovaných látek jak v podmínkách *in ovo*, tak *in vitro*.

První metodou, která byla využita v této práci, byl CHEST (*Chick Embryotoxicity Screening Test*) (Jelínek, 1977). CHEST je okénková *in ovo* metoda, která využívá zárodku kuřete v jeho přirozeném prostředí. Výhodou metody CHEST je možnost selekce mrtvých, spontánně malformovaných, nedostatečně vyvinutých či námi poškozených zárodků ještě před samotnou aplikací testované látky. Testovaná látka je kuřecím zárodkům aplikovaná o definované dávce (koncentraci) a objemu subgerminálně (ED2) či intraamniálně (ED3-ED6). Nevýhodou subgerminální aplikace testované látky zárodku je, že druhý embryonální den dochází k výraznému naředění této látky žloutkem. Po intraamniální aplikaci dochází k naředění testované látky v amniotické tekutině a testovaná látka tak působí na zárodek ve stále se snižující koncentraci, jak se amniotický vak vyvíjí. Testovaná látka může být kuřecím zárodkům aplikována od druhého do šestého embryonálního dne, což nám umožňuje odhadnout senzitivní periody jednotlivých orgánových soustav vůči testované látce. Další výhodou metody CHEST je možnost průběžné vizuální kontroly vyvíjejících se zárodků. Díky tomu mohou být mrtvé zárodky odhaleny dříve než v den odběru. Devátý embryonální den, kdy dochází k odběru zárodků, jsou již všechny orgánové soustavy vyvinuté, již prošly svou kritickou periodou, proto jsme tento den schopni teoreticky pozorovat velmi široké malformační spektrum, má-li testovaná látka vysoký teratogenní potenciál a bylo-li vůči ní senzitivní velké množství vyvíjejících se orgánových soustav. V neposlední řadě je důležité zmínit, že zárodek se sice vyvíjí bez přítomnosti metabolismu mateřského organismu, avšak metabolity testované látky vzniklé ve vejci interakcí žloutku a *area vasculosa*, mohou tento systém sekundárně ovlivnit.

Druhou metodu, kterou jsme použili, byl tzv. SANDWICH. SANDWICH je nová *in vitro* metoda. Tato metoda testování embryotoxicity látek využívá zárodku kuřete, který je zbaven žloutku. SANDWICH byl vyvinut jako doplnění metody CHEST na druhém embryonálním dni. U metody SANDWICH, oproti metodě CHEST, nedochází k ředění

testované látky ani žloutkem, ani amniovou tekutinou. Testovaná látka se dostává do zárodku přímo, difúzí ze semisolidního živného média, ve kterém je koncentrace testované látky v průběhu času v podstatě konstantní. Na zárodek tak testovaná látka působí déle a o vyšší koncentraci. Výhodou metody SANDWICH je, stejně jako v případě metody CHEST, možnost selekce mrtvých, spontánně malformovaných, nedostatečně vyvinutých či námi poškozených zárodků ještě před samotnou aplikací testované látky. Dále pak možnost průběžné vizuální kontroly kuřecích zárodků a možnost snadného pořízení obrazové dokumentace (v našem případě pomocí propojení stereomikroskopu Leica MZ 6 se softwarem LAS EZ). Metoda SANDWICH je však časově omezená, to souvisí nejen se samotnou aplikací testovaných látek, ale i s hodnocením jejich efektu na vývoj zárodků. K aplikaci testované látky (resp. přenesení „sandwiche“ na živné médium) dochází jen na druhém embryonálním dni (12 až 13+ HH), protože pak jsou již vitelinní cévy a *area vasculosa* natolik vyvinuté, že hrozí jejich poškození při přenosu zárodků na živné médium. Zároveň bychom kvůli použití starších zárodků ztratili možnost pozorovat efekt testované látky na napojení vitelinních cév k *area vasculosa* zárodku. Co se týče hodnocení zárodků, tak ty jsou hodnoceny pouze třetí a čtvrtý embryonální den. Zárodky na živném médiu sice většinou přežívají i do pátého či šestého embryonálního dne, ale jsou na nich patrné *antemortem* změny, data z ED5 a ED6 tak nejsou pro hodnocení testované látky relevantní. S aplikací omezenou jen na jeden den vývoje souvisí i fakt, že druhý embryonální den jsou vůči působení testované látky senzitivní jen některé orgánové soustavy, a my tak nemůžeme testovat efekt této látky na všechny vyvíjející se orgánové soustavy. Můžeme tak hodnotit pouze takové parametry, které jsou patrné na třetím a čtvrtém dni vývoje. Mezi tyto parametry patří např. smrt zárodku, nenapojení zárodku k *area vasculosa*, hyperlordóza, narušená segmentace či somitogeneze zárodku, syndrom kaudální regrese, *rumplessness* či naměstnání krve v určitých oblastech zárodku.

## **6.6 CHEST vs. ostatní metody využívající kuřecího zárodku** *in ovo*

Kuřecí zárodek byl prvním modelovým organismem využitým ke studiu embryonálního vývoje, proto není divu, že se také brzy stal využívaným i ve studiích v rámci experimentální embryologie (Stern, 2005). Velmi důležitými pro pozdější experimentální studie byly dvě práce pocházející z počátku 50., resp. 60. let minulého

století. Tyto práce dokumentují normální vývoj kuřecího zárodku (Hamburger a Hamilton, 1951), resp. pak vývoj jeho orgánových soustav během inkubační periody (Romanoff, 1960).

CHEST není jedinou *in ovo* metodou, která využívá kuřecího zárodku. Jednou z prvních metod využívající kuřecího zárodku ve svém přirozeném prostředí byla metoda aplikace testované látky její injekcí do žloutkového vaku. Tento způsob testování látek byl popsán např. McLaughlinem et al. (1963) či Walkerem (1967). Metoda aplikace látky do žloutku neumožňuje řádnou selekci mrtvých či spontánně malformovaných zárodků před experimentem. Další problém vidíme v samotné aplikaci testované látky, protože testovaná látka je žloutkem výrazně naředěna. Zároveň může dojít k výraznějšímu poškození žloutkové membrány vpichem jehly a k jejímu následnému prasknutí v důsledku vzniklého tlaku uvnitř žloutku po aplikaci většího objemu testované látky. Dále si myslíme, že není vhodné přelepovat otvor po vpichu ve skořápce pomocí izolepy. Látky obsažené v izolepě mohou negativně ovlivnit normální vývoj zárodku. Předností této metody v porovnání s metodou CHEST je fakt, že umožňuje aplikaci testované látky kdykoli během inkubace, a dokonce ještě před samotnou inkubací.

Další metoda, která využívá systému *in ovo*, je metoda aplikace testované látky do vzduchové bubliny vejce (např. Henshel et al., 2002). Kladně hodnotíme použití tekutého parafinu na místo izolepy k uzavření otvoru po vpichu ve skořápce. I my ho využíváme ke stejným účelům. Dále oceňujeme možnost aplikace testované látky nejen před samotnou inkubací, ale i kdykoli během pozdějšího vývoje zárodku, což nám metoda CHEST neumožňuje. Tento způsob aplikace testované látky má ale i několik nedostatků. K nedostatkům tohoto způsobu aplikace patří především nemožnost selekce mrtvých či spontánně malformovaných zárodků před experimentem. A také samotná aplikace testované látky, protože je otázkou, jak moc je testovaná látka aplikovaná do vzduchové bubliny přístupná zárodku.

Existuje i *in ovo* metoda aplikace testované látky do bílku (např. Phelps a Gildersleeve, 1995), k aplikaci testované látky může dojít kdykoli během inkubace, ale i ještě před jejím zahájením. Nevýhodu této metody lze, opět, vidět v nemožnosti selekce mrtvých a spontánně malformovaných zárodků před zahájením experimentu, ale i v tom, že látka se k zárodku dostává až v poslední třetině inkubační periody, kdy zárodek spotřebovává bílek, je to během období výrazného růstu (Hensel et al., 2002). Aplikace látek do bílku tak není vhodnou metodou teratogeneze, vzhledem ke kritické periodě

vyvíjejících se orgánových soustav. Její automatizovaná podoba je však poměrně hojně využívána např. k imunizaci kuřecích zárodků v drůbežářství (Miller a Sheeks, 1986).

Další metodou, která využívá *in ovo* systému, je aplikace testované látky na skořápku vejce. Nevýhodou takové aplikace je, že je vhodná pouze pro aplikaci v tučných rozpustných látek a že testovaná látka je oproti ostatním výše zmíněným metodám nejméně spolehlivá, co se týče doručení testované látky k vyvíjejícímu se zárodku (Hensehl et al., 2002).

Existuje také celá řada metod postavených na aplikaci testované látky zárodku skrze okénko ve skořápce vejce. Obecně jsou tyto postupy aplikace nazývané jako okénkové metody. Příkladem je metoda využívající aplikace testované látky do alantois (dýchací a vylučovací orgán) zárodku. Tato metoda je obecně používaná ve virologii a slouží tak k určování teratogenicity virů na kuřecí zárodek (např. Weidanz a Schaffer, 1962). Testovaná látka může být aplikována ale i celou řadou dalších způsobů, a to přímo na povrch vitelinní (žloutkové) membrány či na vitelinní cévy, alantois (např. Caujolle et al., 1967) nebo na chorioalantoidní membránu (např. Ringway a Karnofsky, 1952), do subblastodermálního (subgerminálního) prostoru (např. Van Dongen, 1964; Jelínek, 1977; Griffith a Wiley, 1991) a také do prostoru amnia (např. Jelínek, 1977). Všechny tyto způsoby aplikace látek jsou jednorázové, látka působí poměrně krátkou dobu, než je systémem naředěna. Chceme-li simulovat teratogenní efekt chronického užívání testované látky, je nutné tuto látku aplikovat zárodkům opakovaně, což je časově náročné a při každém otevírání a zavírání okénka ve skořápce hrozí zárodku poškození. Byly proto vyvinuty metody, které umí simulovat chronické působení testované látky bez nutnosti její opakované aplikace. Jednou z možností je aplikace testované látky jako součást „soaked bead“ (např. Tickle et al., 1985). „Soaked beads“ jsou korálky z materiálu, který je schopný nasát definovaný objem testované látky o přesné koncentraci do sebe sama. Tento korálek se následně umístí např. na vitelinní cévy nebo na horní končetinový pupen. Testovaná látka se do zárodku dostává postupně, čímž je simulován její chronický příjem mateřským organismem. Předností „soaked beads“ je možnost jejich využití jak v systémech *in ovo*, tak *in vitro*.

Někteří badatelé se snažili vyřešit obecný problém okénkových metod, tedy i metody CHEST, a to aplikaci na časných stádiích embryonálního vývoje, tedy na ED1, kdy dochází k dysmorfogenezi, především CNS, či smrti u většiny zárodků. Jedním z možných řešení je podle Fishera a Schoenwolfa (1983) eliminace suprablastodermálního vzduchu,

který se k zárodku během otevírání vejce (tvorby okénka) dostane, pomocí bílku či fyziologického roztoku, které nahradí prostor se vzduchem. Autoři také navrhují otočení vejce s izolepou zalepeným okénkem o 180°, tak aby se embryo vyvíjelo pod nenarušenou skořápkou (Fisher a Schoenwolf, 1983). Problém tohoto vylepšení okénkových metod vidíme v tom, že autoři hodnotili efekt otevření, zalití bílkem či fyziologickým roztokem a otočení o 180° po 24 hod od otevření, tedy po 48 hodinách celkové inkubace zárodku. Je proto otázkou, jaký bude mít kontakt izolepy s bílkem v důsledku rotace vejce efekt na vyvíjející se zárodek, pokud na něj bude působit až do devátého dne, kdy dochází ke standardnímu odběru v případě námi použité metody CHEST.

Okénková metoda CHEST se nám proto jeví jako nejvhodnější *in ovo* metoda, protože oproti metodám nevyužívajícím aplikace testované látky skrze okénko, umožňuje selekci zárodků vstupujících do experimentu. Dále umožňuje jejich průběžnou kontrolu během inkubace. Testovaná látka je aplikována do bezprostřední blízkosti zárodku od druhého do šestého dne embryonálního vývoje, a to o objemu menším (většinou 3 nebo 10  $\mu$ l) než u aplikace do žloutku či vzduchové bubliny, kdy jsou většinou aplikovány dávky v řádech stovek  $\mu$ l. U metody CHEST tak dochází ke snížení výdajů za testovanou látku. Výhodu oproti ostatním okénkovým metodám představuje zavírání okénka pomocí sterilních sklíček a parafinu. Jejich přítomnost nemá toxický efekt na zárodek jako např. izolepa, a zároveň sklíčko umožňuje lepší průběžnou kontrolu než pohled na zárodek přes izolepu. Nakonec, při metodě CHEST nedochází k omývání či dezinfekci skořáčky vejce, čímž je zajištěna přirozená ochrana zárodku před patologickými agens.

Důležitým pozitivem metody CHEST je, že výsledky z ní získané lze převést na situaci, kdy je testovaná látka aplikována cestou přes savčí mateřský organismus. Odhadovaný začátek pásma embryotoxicity se pro savčí organismus stanoví vynásobením získaného odhadovaného začátku pásma embryotoxicity pro kuřecí zárodek indexem  $10^{-2}$  (Jelínek, 1977). Po extrapolaci dat na savčí organismus a jejich následném porovnání s výsledky metod využívajících laboratorní savce, konkrétně krysy a králíky, kterým byly testované látky aplikovány stejnou cestou, jaká je využívána v klinické praxi, nejčastěji tedy *per orálně*, byla odhalena shoda v 80 % případů (Jelínek a Marhan, 1994). Proto tvrdíme, že metoda CHEST je vhodnou metodou primární detekce teratogenů právě proto, že extrapolace dat na savčí systém je poměrně spolehlivá.

## 6.7 SANDWICH vs. ostatní metody využívající kuřecího zárodku *in vitro*

Alternativní *in vitro* mají v teratologických studiích své místo, a to především proto, že využívají systému, který je zbaven metabolismu mateřského organismu.

Jednou z neúspěšnějších metod počátku 30. let minulého století byla metoda podle Waddingtona (1932), která vychází z metody kultivace tkání vyvinuté Fellem a Robinsonem (1929). Waddington (1932) přenesl kuřecí blastoderm s částí vitelinní membrány na sraženinu, která vznikla smícháním krevní plazmy dospělého kura a extraktu získaného z osmidenního, popř. devítidenního zárodku kuřete. Tato sraženina byla vytvořena na dně hodinového sklíčka. To bylo umístěno do Petriho misky, jež obsahovala vatu a převařenou vodu, tím byla zajištěna vlhkost prostředí. Petriho miska pak byla překryta víčkem. Výhodou této metody je možnost snadného pozorování vyvíjejícího zárodka. Mezi nedostatky této metody patří náročnost přípravy kultivačního média (Stern a Bachvarova, 1997) a také poměrně pomalý vývoj a růst zárodka. Primitivní proužek se totiž vyvine pouze do stádia, které je analogické s třicetihodinovým vývojem zárodka *in ovo*. Zárodky jsou hodnoceny jako abnormálně malé a zřídka kdy u nich dochází k vytvoření funkčního krevního oběhu (Waddington, 1932). Bez ohledu na svá omezení, se tato metoda stala důležitou pro budoucí výzkum, protože posloužila jako základ či inspirace pro řadu dalších *in vitro* systémů. Častým předmětem modifikace této metody bylo nahrazení sraženiny plazmy za jiná živná prostředí, jako např. za směs agaru, vaječného bílku a Ringerova roztoku (Spratt, 1947), popř. za směs agaru a dialyzátu vaječného žloutku (Spratt a Haas, 1960).

Jakousi revoluční metodou je metoda kultivace kuřecích zárodků podle New (1955). Tato metoda původně sloužila ke zpřístupnění kuřecích zárodků pro mikrochirurgické zákroky na časných stádiích jejich vývoje. New využil stejně jako Waddington (1932) hodinového sklíčka a Petriho misky s vatou a převařenou vodou. Změnou však bylo, že na dně hodinového sklíčka byl přítomný pouze vaječný bílek. Blastoderm se vyvíjel na vitelinní membráně, která byla natažena přes skleněný kroužek, který byl položen na hodinovém sklíčku tak, aby byl zajištěn okraj vitelinní membrány před shrnutím. Pozitivem této metody je, že se blastoderm vyvíjí normálně, v podstatě jako *in ovo*, až do stádia 20 somitů (13 HH), dochází tedy k flexi a torzi zárodka a také k vytvoření funkčního krevního oběhu (New, 1955). V porovnání s naší metodou

SANDWICH má metoda podle New (1955) tu výhodu, že využívá jako živného média pouze bílku, čímž je oproti metodě SANDWICH výrazně ušetřen čas i peníze. Rozdíl oproti metodě SANDWICH je také v tom, že zárodky jsou na živné médium přenášeny ve stádiích časně embryogeneze, proto by tato metoda mohla mít využití pro testování teratogenního účinku látek právě na časných stádiích vývoje kuřecího zárodku, protože ani jedna z námi použitých metod nepokrývala testování embryotoxicity na nejčasnějších vývojových stádiích. Asi největší nedostatky této metody vidíme v zajišťování vitelinní membrány před jejím shrnutím a také v náročnosti jejího správného napnutí na kroužku. Pokud by totiž tenze vitelinní membrány na skleněném kroužku byla příliš vysoká, mohlo by dojít k poškození vyvíjejícího se zárodku nebo oddělení blastodermu od vitelinní membrány.

Další metodou využívající kuřecí zárodek je metoda podle Kučery a Burnanda (1987), která byla vyvinuta právě se záměrem testovat embryotoxický účinek látek *in vitro* a snížit tak množství laboratorních savců využívaných pro stejné účely. Ve vejci inkubovaném po dobu 20 hod (4 HH) je udělán otvor o průměru 1cm. Tuhý bílek se vylíje a řídký bílek se nasaje do injekční stříkačky. Následně se skořápka ještě více otevře a žloutek se přelije do krystalizační misky obsahující Tyrodův roztok, tím je zajištěno, že se blastoderm po chvíli dostane na povrch žloutku. Následně se blastoderm na vitelinní membráně vystříhne a na čajové lžičce přenese do další nádoby obsahující Tyrodův roztok. Zde se preparát omyje od žloutku a přenese se do inkubační misky naplněné Tyrodovým roztokem. Vitelinní membrána se napne přes kroužek vystupující ze dna misky. Následně se odstraní Tyrodův roztok a pod a nad zárodek se injikuje standardní množství živného média, které se skládá ze směsi Tyrodova roztoku a řídkého bílku, obsahující testovanou látku. Miska se přiklopí víčkem a dá se inkubovat. Zárodky se běžně dožívají ED3 a po 66 hodinách inkubace odpovídají stádiu 17 HH a jsou opožděné zhruba o 6 hodin oproti stavu *in ovo*. Míra spontánních malformací na tomto systému tvoří maximálně 15 %. Podle autorů této metody byly malformace pozorované pro testované látky srovnatelné s těmi popsanými na jiných systémech i živočišných druzích. Mezi přednosti této metody patří celková rychlost, nenákladnost, relativní jednoduchost a také srovnatelnost s výsledky z jiných systémů (Kučera a Burnand, 1987). Ve srovnání s metodou SANDWICH má metoda podle Kučery a Burnanda (1987) tu výhodu, že je žloutek přeléván do krystalizační misky s roztokem a tím je zajištěno, že se zárodek po chvíli dostane na povrch žloutku. V případě naší metody se musí vejce opatrně přenášet z inkubátoru, aby se s ním příliš

nehýbalo a zárodek se tak nedostal mimo střed povrchu žloutku. Pak totiž hrozí, že je zárodek po rozbití vejce příliš na straně a není tak přístupný pro přenesení na papírovém kroužku. Další rozdíl je v působení testované látky na zárodek. V případě Kučery a Burnanda (1987) je to od vývojového stádia 4 HH, v našem případě pak až od stádia 12 až 13+ HH. Za komplikace této metody považujeme přílišné množství kroků v postupu, protože čím více kroků, tím větší pravděpodobnost, že dojde k poškození zárodku, a také napínání vitelinní membrány přes kroužek. Vitelinní membrána se totiž může shrnout. Domníváme se, že na našem systému je pravděpodobnost shrnutí vitelinní membrány se zárodkem minimalizována, protože je zárodek umístěn mezi dvěma papírovými kroužky, a zároveň na našem systému nehrozí, že by byla žloutková membrána napjata příliš, a tak došlo k poškození zárodku.

Asi nejpodobnější metodě SANDWICH je metoda EC (*early chick*) (Chapman et al., 2001). Postup je obdobný jako u naší *in vitro* metody. Na vitelinní membránu je umístěn filtrační papír s otvorem tak, aby byl blastoderm (3 až 4 HH) ve středu tohoto otvoru. Filtrační papír je spolu s vitelinní membránou a blastodermem vystřižen. Dále je blastoderm na filtračním papíru opláchnut v solném roztoku obsahujícím penicilin a streptomycin a následně je přenesen na živné médium složené z agaru a bílku z neoplozených vajec s přidanými antibiotiky. Zárodky přenesené na živné médium se standardně inkubují do stádia 15 až 17 HH. Pozitiva EC metody jsou následující: metoda je rychlá a jednoduchá; nevyžaduje žádné speciální vybavení laboratoře; médium je semisolidní, takže nemůže dojít k přelití vyvíjejícího se zárodku živným médiem; a zároveň toto médium umožňuje i otočení vyvíjejícího se zárodku od stádia 8 HH tak, aby rostl dorsální stranou vzhůru. Porovnáme-li metodu EC s naší metodou SANDWICH, nalezneme několik rozdílů. Jedním z nich je, že zárodky jsou inkubovány od časných stádií embryonálního vývoje. Další odlišnost pak můžeme vidět v použití filtračního papíru pro přenos zárodku. EC metoda totiž využívá pouze jednoho filtračního papíru jakožto nosiče vitelinní membrány se zárodkem, zato SANDWICH využívá dvou kroužků z filtračního papíru. Rozdíl je i v živném médiu, ač je v případě obou metod semisolidní, metoda EC využívá pouze kombinace bílku a agaru s přidavkem antibiotik, naopak SANDWICH využívá zcela syntetického živného média, do kterého je také přidáno antibiotikum (modifikace podle Hu et al., 2005). Autoři metody EC uvádějí, že je vhodná pro mikrochirurgii, mikroinjekci, transplantaci tkání (*grafting*), implantaci přenašečů látek (*bead implantation*) a pro elektroporaci. To znamená, že EC metoda je vhodná pro



teratologická testování. Myslíme si, že by testovaná látka mohla být, stejně jako v případě metody SANDWICH, také součástí semisolidního živného média.

Metoda SANDWICH je, ve srovnání s metodami využívajícími hodinového skla a skleněného kroužku, popř. jejich obdob, poměrně snadnou, časově nenáročnou metodou, která nevyžaduje žádné speciální vybavení laboratoře. Naše *in vitro* metoda je, oproti výše zmíněným metodám, jedinou, při které dochází k přenosu zárodků na ED2 a tyto zárodky se bez *antemortem* změn dožívají ED4. Skutečnost, že se naše kontrolní zárodky normálně vyvíjejí do ED4, je pravděpodobně důsledkem využití zcela syntetického živného média. Předností tohoto média je jeho vysoký obsah aminokyselin, nezbytných pro růst zárodků, a také jeho konstantní složení. Je otázkou, zda by bylo reálné, aby se zárodky stádia 12 až 13+ HH (využívané námi) přenesené na živné médium tvořené pouze bílkem či bílkem a agarem nebo Tyrodovým roztokem mohly úspěšně vyvíjet až do ED4 jako na našem systému, protože tyto zárodky mají již poměrně vysoké nároky na příjem živin. Asi největší předností metody SANDWICH je přenos zárodku na Petriho misku. Zárodek je přenášen na vitelinní membráně mezi dvěma kroužky z filtračního papíru. Tím je zajištěno, že nedojde ke shrnutí vitelinní membrány či k jejímu přílišnému napnutí, a tím k poškození zárodku.

## **6.8 CHEST, SANDWICH a jejich využití v kombinaci s klasickými metodami**

Klasické metody využívají laboratorních savců. Nevýhodou těchto metod je jejich časová i finanční náročnost. Klasické metody mají i několik nedostatků: (1) testovaná látka může být metabolizována mateřským organismem a v pozdějších stádiích intrauterinního vývoje nemusí tato látka vůbec projít skrze placentu, (2) nevíme, jaká je skutečná dávka testované látky, která na zárodky působí. Důležité je zmínit, že mezi savci existují mezidruhové rozdíly ve farmakokinetice i biotransformaci testované látky, proto nevíme, zda bude mít testovaná látka na člověka stejný účinek jako v případě testovaných savců.

Vhodným doplněním klasických metod jsou proto metody alternativní, a to především ty, využívající kuřecího zárodku, který má oproti klasickým metodám značné výhody (viz. Henshel et al., 2002). Domníváme se proto, že metoda CHEST spolu s metodou SANDWICH jsou vhodnými metodami pro primární detekci odhadovaného začátku pásma embryotoxicity testovaných látek. Po extrapolaci dat na savčí systém pak

mohou být na březích samicích savců testovány takové dávky (koncentrace), jejichž účinnost byla prokázána našimi metodami, a tak je snížen počet savčích zárodků, které by byly zbytečně použity na testování látek, které by byly buď zcela neúčinné, nebo by měly za následek stoprocentní letalitu. Metoda CHEST v kombinaci s metodou SANDWICH je tak ideální metodou preskríningu embryotoxicity potenciálních teratogenů.

## 6.9 Budoucí směr výzkumu

Naší snahou do budoucna je rozšířit aplikaci potenciálních teratogenů časným stádiím embryonálního vývoje zárodku, jak pomocí metody CHEST, tak pomocí metody SANDWICH, kdy je centrální nervová soustava vysoce náchylná k možnému poškození. Díky tomu bychom mohli rozšířit možné pozorovatelné malformační spektrum testovaných látek.

Naším cílem je v případě metody CHEST rozšířit možnosti aplikace testované látky nejen na zárodky mladší než 12 HH (ED2), ale i na zárodky před samotnou inkubací. Inspirací je pro nás publikace Fishera a Schoenwolfa (1983), kteří dokázali zajistit normální vývoj zárodků mladších než ED2 díky eliminaci suprablastodermálního vzduchu pomocí přidání bílku či fyziologického roztoku. V případě metody SANDWICH jsou pro nás inspirací publikace, ve kterých byla popsána inkubace časných kuřecích zárodků *in vitro* (např. New, 1955; Kučera a Burnand 1987; Chapman et al., 2001).

## 7 ZÁVĚRY

1. Metoda SANDWICH je poměrně rychlou a levnou metodou primární detekce začátku pásma embryotoxicity testované látky na časných stádiích embryonálního vývoje zárodku. Zárodek je po delší dobu vystaven působení testované látky, a proto je tato metoda vhodným doplněním metody CHEST na ED2, kdy při subgerminální aplikaci testované látky pomocí metody CHEST dochází k výraznému naředění této látky žloutkem zárodku.

2. Odhadovaný začátek pásma embryotoxicity DMSO se nacházel mezi koncentrací 0.1 % a 0.5 % v případě metody SANDWICH (ED2) a mezi koncentrací 10 % a 100 % aplikovaných v objemu 3  $\mu$ l v případě metody CHEST (ED2-ED6). Pro ATRA se odhadovaný začátek pásma embryotoxicity nacházel mezi dávkovými řády  $10^{-7}$  a  $10^{-6}$  v případě metody SANDWICH (ED2) a mezi dávkovými řády  $10^{-5}$  a  $10^{-4}$  aplikovaných v objemu 3  $\mu$ l v případě metody CHEST (ED2-ED6).

3. Porovnáním odhadovaného začátku pásma embryotoxicity získaného pro ATRA i DMSO pomocí metody SANDWICH a CHEST na ED2 bylo zjištěno, že metoda SANDWICH je senzitivnější. Rozdíl v odhadovaném začátku pásma embryotoxicity získaném pro ATRA pomocí metody SANDWICH a CHEST činil tři dávkové řády a pro DMSO více jak dva dávkové řády.

## 8 POUŽITÁ LITERATURA

- Adams J, Lammer EJ.** 1993. Neurobehavioral teratology of isotretinoin. *Reprod Toxicol* 7: 175-177.
- Alyabyeva AP, Muravyev YV.** 1983. Control trials of dimethyl sulfoxide in rheumatoid and collagen diseases. *Ann NY Acad Sci* 411: 309-315.
- Antipatis C, Grant G, Ashworth CJ.** 2000. Moderate maternal vitamin A deficiency affects perinatal organ growth and development in rats. *Br J Nutr* 84: 125-132.
- Armstrong JL, Redfern CP, Veal GJ.** 2005. 13-cis retinoic acid and isomeration in paediatric oncology- is changing shape the key to success? *Biochem Pharmacol* 69: 1299-1306.
- Assheton R.** 1896. An experimental examination into the growth of the blastoderm of the chick. *Proc Roy Soc* 60: 349-356.
- Auerbach R, Kubai L, Knighton D, Folkman J.** 1974. A simple procedure for the long-term cultivation of chicken embryos. *Dev Biol* 41: 391-394.
- Ayme S, Julian C, Gambarelli D, Mariotti B, Maurin N.** 1988. Isotretinoin dose and teratogenicity. *Lancet* 1: 655.
- Bates CJ.** 1995. Vitamin A. *Lancet* 345: 31-35.
- Bauernfeind JC.** 1980. The safe use of vitamin A: a report of the international vitamin A consultative group (IVACG). New York: Nutrition foundation.
- Bellairs R, Osmond M.** 2005. The atlas of chick development. London: Elsevier Academic Press.
- Bendlich A, Langseth L.** 1989. Safety of vitamin A. *Am J Clin Nutr* 49: 358-371.
- Bewley S.** 2003. Ethical issues in prenatal diagnosis. *In Abramsky L, Chapple J*, editors. *Prenatal Diagnosis – the human side*. Cheltenham: Nelson Thornes. p 1-16.
- Bigby M, Stern RS.** 1988. Adverse reactions to isotretinoin: a report from the Adverse Drug Reaction Reporting System. *J Am Acad Dermatol* 18: 543-552.
- Blomhoff R, Blomhoff HK.** 2006. Overview of retinoid metabolism and function. *J Neurobiol* 66: 606-630.
- Blumenthal LS, Fuchs M.** 1967. The clinical use of dimethyl sulfoxide on various headaches, musculoskeletal, and other general medical disorders. *Ann NY Acad Sci* 141: 572-585.

- Boylan JF, Gudas LJ.** 1992. The level of CRABP-I expression influences the amounts and types of all-trans-retinoic acid metabolites in F9 teratocarcinoma stem cells. *J Biol Chem* 267: 21486-21491.
- Brobyn RD.** 1975. The human toxicology of dimethyl sulfoxide. *Ann NY Acad Sci* 243: 497-506.
- Brown NA, Spielmann H, Bechter R, Flint OP, Freeman SJ, Jelínek RJ, Koch E, Nau H, Newall DR, Palmer AK, Renault JY, Repetto MF, Vogel R, Wieger R.** 1995. Screening chemicals for reproductive toxicity: the current alternatives. The report and recommendations of an ECVAM/ETS workshop (ECVAM workshop 12). *ATLA* 23: 868-882.
- Brown NA.** 1997. Chemical teratogenes: hazards, tools and clues. *In: Thorogood P*, editor. Embryos, genes and birth defects. Chichester: John Wiley & Sons. p 69-88.
- Campo-Paysaa F, Marlétaz F, Laudet V, Schubert M.** 2008. Retinoic acid signaling in development: tissue-specific functions and evolutionary origins. *Genesis* 46: 640-656.
- Caujolle FM, Caujolle DH, Cros SB, Calvet MM.** 1967. Limits of toxic and teratogenic tolerance of dimethyl sulfoxide. *Ann NY Acad Sci* 141: 110-126.
- Chapman SC, Collignon J, Schoenwolf GC, Lumsden A.** 2001. Improved method for chick whole-embryo culture using a filter paper carrier. *Dev Dyn* 220: 284-289.
- Cohlan SQ.** 1953. Excessive intake of vitamin A as a cause of congenital anomalies in the rat. *Science* 117: 535-536.
- Copel JA, Buyon JP, Kleinman CS.** 1995. Successful in utero therapy of fetal heart block. *Am J Obstet Gynecol* 173: 1384-1390.
- Cros S, Voisin MC, Tollon Y Oreglia J.** 1970. Atteinte des bourgeons de membres d'embryons de poulet par le diméthylsulfoxyde. *Ann Pharm Fr* 28: 263-270.
- Czeizel AE, Intódy Z, Modell B.** 1993. What proportion of congenital abnormalities can be prevented? *BMJ* 306: 499-503.
- Davis LA, Sadler TW.** 1981. Effects of vitamin A on endocardial cushion development in the mouse heart. *Teratology* 24: 139-148.
- Delva L, Bastie JN, Rochette-Egly C, Kraïba R, Balitrand N, Despouy G, Chambon P, Chomienne C.** 1999. Physical and functional interactions between cellular retinoic acid binding protein II and the retinoic acid-dependent nuclear complex. *Mol Cell Biol* 19: 7158-7167.

- Desvergne B.** 2007. RXR: from partnership to leadership in metabolic regulations. *In* **Begley TP, Means AR, O'Malley BW, Riddiford L, Tashjian AH Jr**, editors. Vitamin A: vitamins and hormones, volume 75. San Diego: Elsevier. p 1-32.
- Dickman ED, Smith SM.** 1996. Selective regulation of cardiomyocyte gene expression and cardiac morphogenesis by retinoic acid. *Dev Dyn* 206: 39-48.
- Fantel AG, Shepard TH, Newell-Morris LL, Moffett BC.** 1977. Teratogenic effects of retinoic acid in pigtail monkeys (*Macaca nemestrina*). I. General features. *Teratology* 15: 65-71.
- FAO/WHO.** 1988. Requirements of vitamin A, iron, folate and vitamin B<sub>12</sub>: Report of a joint FAO/WHO expert consultation. Rome: Food and agriculture organization of the United Nations.
- Fell HB, Robinson R.** 1929. The growth, development and phosphate activity of embryonic avian femora and limb buds cultivated in vitro. *Biochem J* 23: 767-784.
- Ferm VH.** 1966. Congenital malformations induced by dimethyl sulphoxide in the golden hamster. *J Embryol Exp Morphol* 16: 49-54.
- Fernhoff PM, Lammer EJ.** 1984. Craniofacial features of isotretinoin embryopathy. *J Pediatr* 105: 595-597.
- Fiorella PD, Giguère V, Napoli JL.** 1993. Expression of cellular retinoic acid-binding protein (type II) in *Escherichia coli*: characterization and comparison to cellular retinoic acid-binding protein (type I). *J Biol Chem* 268: 21545-21552.
- Fisher M, Schoenwolf GC.** 1983. The use of early chick embryos in experimental embryology and teratology: improvements in standard procedures. *Teratology* 27: 65-72.
- Frenz DA, Liu W, Galinovic-Schwartz V, Van De Water TR.** 1996. Retinoic acid-induced embryopathy of the mouse inner ear. *Teratology* 53: 292-303.
- Freytag TL, Liu SM, Rogers QR, Morris JG.** 2003. Teratogenic effects of chronic ingestion of high levels of vitamin A in cats. *J Anim Physiol Anim Nutr* 87: 42-51.
- Fucic A, Merlo DF, Ceppi M, Lucas JN.** 2008. Spontaneous abortions in female populations occupationally exposed to ionizing radiation. *Int Arch Occup Environ Health* 81: 873-879.
- Gaylord Chemical Company.** 2005. Reaction solvent dimethyl sulfoxide (DMSO). Technical bulletin 105b: 1-110.

- Geelen JA.** 1973. Skullbase malformations in rat fetuses with hypervitaminosis A-induced exencephaly. *Teratology* 7: 49-56.
- Geiger JM, Baudin M, Saurat JH.** 1994. Teratogenic risk with etretinate and acitretin treatment. *Dermatology* 189: 109-116.
- Gilchrist H, Taranath DA, Gole GA.** 2010. Ocular malformation in a newborn secondary to maternal hypovitaminosis A. *J AAPOS* 14: 274-276.
- Goldman L, Igelman JM, Kitzmiller K.** 1967. Investigative studies with DMSO in dermatology. *Ann NY Acad Sci* 141: 428-436.
- Greaves MW.** 1988. Embryopathy in infant conceived one year after termination of maternal etretinate: a reappraisal. *Lancet* 2: 154.
- Gregg NM.** 1941. Congenital cataract following German measles in the mother. *Trans Ophthalmol Soc Aust* 3: 35-46.
- Griffith CM, Wiley MJ.** 1991. Effects of retinoic acid on chick tail bud development. *Teratology* 43: 217-224.
- Grote W, Harms D, Jänig U, Kietzmann H, Ravens U, Schwarze I.** 1985. Malformation of fetus conceived 4 months after termination of maternal etretinate treatment. *Lancet* 1: 1276.
- Hale F.** 1933. Pigs born without eye balls. *J Hered* 24: 105-106.
- Hamburger V, Hamilton HL.** 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morph* 88: 49-92.
- Harrison MR, Mychaliska GB, Albanese CT, Jennings RW, Farrell JA, Hawgood S, Sandberg P, Levine AH, Lobo E, Filly RA.** 1998. Correction of congenital diaphragmatic hernia in utero IX: fetuses with poor prognosis (liver herniation and low lung-to-head ratio) can be saved by fetoscopic temporary tracheal occlusion. *J Pediatr Surg* 33: 1017-1023.
- Hart RC, McCue PA, Ragland WL, Winn KJ, Unger ER.** 1990. Avian model for 13-cis-retinoic acid embryopathy: demonstration of neural crest related defects. *Teratology* 41: 463-472.
- Henshel DS, DeWitt J, Troutman A.** 2002. Using chicken embryos for teratology studies. *Curr Protoc Toxicol suppl.* 14: 13.4.1-13.4.19.
- Howard WB, Willhite CC.** 1986. Toxicity of retinoids in humans and animals. *J Toxicol Toxin Rev* 5: 55-94. *citováno z Sulik KK, Alles AJ.* 1991. Teratogenicity of the retinoids. *In Saurat J-H*, editor. *Retinoids -10 years on.* Basel: Karger. p 282-295.

- Hsieh SD, Yamamoto R, Saito K, Iwamoto Y, Kuzuya T, Ohba S, Kobori S, Saito K.** 1987. Amyloidosis presented with whitening and loss of hair which improved after dimethylsulfoxide (DMSO) treatment. *Jpn J Med* 26: 393-395.
- Hu B, Nadiri A, Bopp-Küchler S, Perrin-Schmitt F, Lesot H.** 2005. Dental epithelial histomorphogenesis in vitro. *J Dent Res* 84: 521-525.
- Jacob SW, Herschler R.** 1983. Introductory remarks: dimethyl sulfoxide after twenty years. *Ann NY Acad Sci* 411: xii-xvii.
- Jedlička V.** 1954. Embryopathie a některé problémy pokusné teratologie (jejich význam pro lékařskou praxi). Praha: Státní zdravotnické nakladatelství.
- Jelínek R, Dostál M, Peterka M.** 1996. Základy vývojové toxikologie a teratologie: svazek 19. Ostrava: Vysoká škola Báňská - Technická univerzita Ostrava.
- Jelínek R, Kistler A.** 1981. Effect of retinoic acid upon the chick embryonic morphogenetic systems. I. The embryotoxicity dose range. *Teratology* 23: 191-195.
- Jelínek R, Marhan O.** 1994. Validation of the chick embryotoxicity screening test (CHEST). A comparative study. *Funct Dev Morphol* 4: 317-323.
- Jelínek R, Peterka M, Rychter Z.** 1985. Chick embryotoxicity screening test – 130 substances tested. *Indian J Exp Biol* 23: 588-595.
- Jelínek R.** 1977. The chick embryotoxicity screening test (CHEST). In **Neubert D, Merker HJ, Kwasigroch TE**, editors. *Methods in prenatal toxicology*. Stuttgart: Georg Thieme Publishers. p 381-386.
- Kalter H.** 1960. The teratogenic effects of hypervitaminosis A upon the face and mouth of inbred mice. *Ann NY Acad Sci* 85: 42-55.
- Kay ED.** 1987. Craniofacial dysmorphogenesis following hypervitaminosis A in mice. *Teratology* 35: 105-117.
- Kochhar DM, Johnson EM.** 1965. Morphological and autoradiographic studies of cleft palate induced in rat embryos by maternal hypervitaminosis A. *J Embryol Exp Morphol* 14: 223-238.
- Kochhar DM.** 1973. Limb development in mouse embryos: I. Analysis of teratogenic effects of retinoic acid. *Teratology* 7: 289-298.
- Koren G, Avner M, Shear N.** 2004. Generic isotretinoin: a new risk for unborn children. *CMAJ* 170: 1567-1568.
- Kučera J.** 1989. Populační teratologie. Praha: Avicenum/zdravotnické nakladatelství.



- Kučera P, Burnand MB.** 1987. Routine teratogenicity test that uses chick embryos in vitro. *Teratog Carcinog Mutagen* 7: 427-447.
- Lamba PA, Sood NN.** 1968. Congenital microphthalmus and coloboma in maternal vitamin A deficiency. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 115-117. *citováno z* **Bendlich A, Langseth L.** 1989. Safety of vitamin A. *Am J Clin Nutr* 49: 358-371.
- Lammer EJ, Chen DT, Hoar RM, Agnish ND, Benke PJ, Braun JT, Curry CJ, Fernhoff PM, Grix AW Jr, Lott IT, Richard JM, Sun SC.** 1985. Retinoic acid embryopathy. *N Engl J Med* 313: 837-841.
- Lammer EJ.** 1988. Embryopathy in infant conceived one year after termination of maternal etretinate. *Lancet* 2: 1080-1081.
- Lamming GE, Woollam DH, Millen JW.** 1954. Hydrocephalus in young rabbits associated with maternal vitamin A deficiency. *Br J Nutr* 8: 363-369.
- Larsen HL, Janners MY.** 1987. Teratogenic effects of retinoic acid and dimethylsulfoxide on embryonic chick wing and somite. *Teratology* 36: 313-320.
- Lee QP, Juchau MR, Kraft JC.** 1991. Microinjection of cultured rat embryos: studies with retinol, 13-cis- and all-trans-retinoic acid. *Teratology* 44: 313-323.
- Lelièvre-Pégorier M, Vilar J, Ferrier ML, Moreau E, Freund N, Gilbert T, Merlet-Bénichou C.** 1998. Mild vitamin A deficiency leads to inborn nephron deficit in the rat. *Kidney Int* 54: 1455-1462.
- Lenz W.** 1961. Kindliche Missbildungen nach Medikament-Einnahme während der Gravidität?. *Dtsch Med Wchnschr* 86: 2555-2556.
- Lewis DE.** 1995. Aleksandr Mikhailovich Zaitsev (1841-1910). *Bull Hist Chem* 17/18: 21-30.
- Lorente CA, Miller SA.** 1978. Vitamin A induction of cleft palate. *Cleft Palate J* 15: 378-385.
- Lott IT, Pribram HW, Leitner M.** 1984. Fetal hydrocephalus and ear anomalies associated with maternal use of isotretinoin. *Pediatr Res* 18: 306A.
- McBride WG.** 1961. Thalidomide and congenital abnormalities. *Lancet* 2: 1358.
- McBride WG.** 1985. Limb reduction deformities in child exposed to isotretinoin in utero on gestation days 26-40 only. *Lancet* 1: 1276.
- McCaffery P, Dräger UC.** 2000. Regulation of retinoic acid signaling in the embryonic nervous system: a master differentiation factor. *Cytokine Growth Factor Rev* 11: 233-249.

- McDowell LR.** 2000. Vitamins in animal and human nutrition. Ames: Iowa State University Press.
- McLaughlin J Jr, Marliac JP, Verrett MJ, Mutchler MK, Fitzhugh OG.** 1963. The injection of chemicals into the yolk sac of fertile eggs prior to incubation as a toxicity test. *Toxicol Appl Pharmacol* 5: 760-771.
- Mey J, McCaffery P.** 2004. Retinoic acid signaling in the nervous system of adult vertebrates. *Neuroscientist* 10: 409-421.
- Millen JW, Dickson AD.** 1957. The effect of vitamin A upon cerebrospinal-fluid pressures of young rabbits suffering from hydrocephalus due to maternal hypovitaminosis A. *Br J Nutr* 11: 440-446.
- Millen JW, Woollam DH.** 1956. The effect of the duration of vitamin-A deficiency in female rabbits upon the incidence of hydrocephalus in their young. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 19: 17-20.
- Miller GE, Sheeks P.** 1986. Egg injection method and apparatus. Patent 4 593 646.
- Moore KL, Persaud TV.** 2002. Zrození člověka: embryologie s klinickým zaměřením. Praha: ISV nakladatelství.
- Nau H.** 2001. Teratogenicity of isotretinoin revisited: species variation and the role of all-trans-retinoic acid. *J Am Acad Dermatol* 45: S183-S187.
- New DA.** 1955. A new technique for the cultivation of the chick embryo in vitro. *J Embryol Exp Morphol* 3: 326-331.
- Newell-Morris L, Sirianni JE, Shepard TH, Fantel AG, Moffett BC.** 1980. Teratogenic effects of retinoic acid in pigtail monkeys (*Macaca nemestrina*). II. Craniofacial features. *Teratology* 22: 87-101.
- Običan S, Scialli AR.** 2011. Teratogenic exposures. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 157: 150-169.
- OECD.** 2001. Test No 414: Prenatal developmental toxicity study, OECD guideline for testing chemicals, Section 4. OECD Publishing.
- Olson JA.** 1996. Biochemistry of vitamin A and carotenoids. *In Sommer A, West KP Jr*, editors. Vitamin A deficiency: health, survival, and vision. New York: Oxford University Press. p 221-250.
- Olson JA.** 2001. Vitamin A. *In Rucker RB, Suttie JW, McCormick DB, Machlin LJ*, editors. Handbook of vitamins: third edition revised and expanded. New York: Marcel Dekker. p 1-50.

- Onyskowová Z, Doležal A, Jedlička V.** 1970. The frequency and the character of malformations in multiple births. *Acta Univ Carol Med* 16: 333-376.
- Osmond MK, Butler AJ, Voon FC, Bellairs R.** 1991. The effects of retinoic acid on heart formation in the early chick embryo. *Development* 113: 1405-1417.
- Patten BM.** 1920. The early embryology of the chick. Philadelphia: P. Blakiston's son & Co.
- Perry MM.** 1988. A complete culture system for the chick embryo. *Nature* 331: 70-72.
- Peterka M, Fára M.** 1990. Jsou vitamíny embryotoxické? *Prakt Lek* 70: 567-569.
- Peterka M, Novotná B.** 2010. Úvod do teratologie: příčiny a mechanismy vzniku vrozených vad. Praha: nakladatelství Karolinum.
- Peterka M, Peterková R, Likovský Z.** 1996. Teratogenic and lethal effects of long-term hyperthermia and hypothermia in the chick embryo. *Reprod Toxicol* 10: 327-332.
- Peterka M, Peterková R, Likovský Z.** 1997. Different embryotoxic effect of vitamin A and B-carotene detected in the chick embryo. *Acta Chir Plast* 39: 91-96.
- Phelps PV, Gildersleeve RP.** 1995. Method and apparatus for early embryonic in ovo injection. Patent 5 438 954.
- Radhika MS, Bhaskaram P, Balakrishna N, Ramalakshmi BA, Devi S, Kumar BS.** 2002. Effects of vitamin A deficiency during pregnancy on maternal and child health. *BJOG* 109: 689-693.
- Ramírez E, Luza S.** 1967. Dimethyl sulfoxide in the treatment of mental patients. *Ann NY Acad Sci* 141: 655-667.
- Ridgway LP, Karnofsky DA.** 1952. The effects of metals on the chick embryo: toxicity and production of abnormalities in development. *Ann NY Acad Sci* 55: 203-215.
- Roche.** 2010. Roaccutene®: contains the active ingredient isotretinoin. Consumer medicine information.
- Romanoff AL.** 1960. The avian embryo: structural and functional development. New York: The Macmillan Company.
- Ross AC.** 1993. Overview of retinoid metabolism. *J Nutr* 123: 346-350.
- Rubin LF, Barnett KC.** 1967. Ocular effects of oral and dermal application of dimethyl sulfoxide in animals. *Ann NY Acad Sci* 141: 333-345.
- Rychter Z, Jelínek R.** 1978. Základy experimentální teratologie. Praha: Avicenum/zdravotnické nakladatelství.

- Sarma V.** 1959. Maternal vitamin A deficiency and fetal microcephaly and anophthalmia. *Obstet Gynecol* 13: 299-301. *citováno z* **Bendlich A, Langseth L.** 1989. Safety of vitamin A. *Am J Clin Nutr* 49: 358-371.
- Schardein JL.** 1985. Chemically induced birth defects. New York: Marcel Dekker.
- Scherbel AL, McCormack LJ, Layle JK.** 1967. Further observations on the effect of dimethyl sulfoxide in patients with generalized scleroderma (progressive systemic sclerosis). *Ann NY Acad Sci* 141: 613-629.
- Shenefelt RE.** 1972. Morphogenesis of malformations in hamsters caused by retinoic acid: relation to dose and stage at treatment. *Teratology* 5: 103-118.
- Shepard TH, Fantel AG, Fitzsimmons J.** 1989. Congenital defect rates among spontaneous abortuses: twenty years of monitoring. *Teratology* 39: 325-321.
- Shirley SW, Stewart BH, Mirelman S.** 1978. Dimethyl sulfoxide in treatment of inflammatory genitourinary disorders. *Urology* 11: 215-220.
- Shlafer M.** 1983. Cardiac pharmacology of dimethyl sulfoxide and its postulated relevance to organ preservation in ischemic or hypoxic states. *Ann NY Acad Sci* 411: 170-179.
- Shupack J, Stiller M, Davis L, Kenny C, Jondreau L.** 1992. Topical alpha-interferon ointment with dimethyl sulfoxide in the treatment of recurrent genital herpes simplex. *Dermatology* 184: 40-44.
- Skoric D, Balint B, Petakov M, Sindjic M, Rodic P.** 2007. Collection strategies and cryopreservation of umbilical cord blood. *Transfus Med* 17: 107-113.
- Smets KJ, Barlow T, Vanhaesebrouck P.** 2006. Maternal vitamin A deficiency and neonatal microphthalmia: complications of biliopancreatic diversion? *Eur J Pediatr* 165: 502-504.
- Smith ER, Hadidian Z, Mason MM.** 1967. The single- and repeated-dose toxicity of dimethyl sulfoxide. *Ann NY Acad Sci* 141: 96-109.
- Sporn MB, Roberts AB.** 1985. What is a retinoid? *Ciba Found Symp* 113: 1-5. *citováno z* **Klaus M.** 1990. Structure characteristics of natural and synthetic retinoids. *Methods Enzymol* 189: 3-14.
- Spratt NT Jr, Haas H.** 1960. Morphogenetic movements in the lower surface of the unincubated and early chick blastoderm. *J Exp Zool* 144: 139-157. *citováno z* **Stern CD, Bachvarova R.** 1997. Early chick embryos in vitro. *Int J Dev Biol* 41: 379-387.
- Spratt NT Jr.** 1947. A simple method for explanting and cultivating early chick embryos in vitro. *Science* 106: 452.

- Stanworth S, Warwick R, Fehily D, Persaud C, Armitage S, Navarrete C, Contreras M.** 2001. An international survey of unrelated umbilical cord blood banking. *Vox Sang* 80: 236-243.
- Stern CD, Bachvarova R.** 1997. Early chick embryos in vitro. *Int J Dev Biol* 41: 379-387.
- Stern CD.** 2005. The chick: a great model system becomes even greater. *Dev Cell* 8: 9-17.
- Stern RS, Rosa F, Baum C.** 1984. Isotretinoin and pregnancy. *J Am Acad Dermatol* 10: 851-854.
- Stewart AM, Webb JW, Giles BD, Hewitt D.** 1956. Malignant disease in childhood and diagnostic irradiation in utero. *Lancet* 268: 447.
- Sulzberger MB, Cortese TA Jr, Fishman L, Wiley HS, Peyakovich PS.** 1967. Some effects of DMSO on human skin in vivo. *Ann NY Acad Sci* 141: 437-450.
- Takahashi N.** 2010. Vitamin A in health. *J Health Sci* 56: 144-153.
- Taylor IM, Wiley MJ, Agur A.** 1980. Retinoic acid-induced heart malformations in the hamster. *Teratology* 21: 193-197.
- Tibbles L, Wiley MJ.** 1988. A comparative study of the effects of retinoic acid given during the critical period for inducing spina bifida in mice and hamsters. *Teratology* 37: 113-125.
- Tickle C, Lee J, Eichele G.** 1985. A quantitative analysis of the effect of all-trans-retinoic acid on the pattern of chick wing development. *Dev Biol* 109: 82-95.
- Underwood BA.** 1994. Maternal vitamin A status and its importance in infancy and early childhood. *Am J Clin Nutr* 59: 517S-524S.
- ÚZIS ČR.** 2011. Vrozené vady u narozených v roce 2009. Praha: Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR.
- Valeri CR, Rangno G, Khuri S.** 2005. Freezing human platelets with 6 percent dimethyl sulfoxide with removal of the supernatant solution before freezing and storage at -80 °C without postthaw processing. *Transfusion* 45: 1890-1898.
- Van Dongen R.** 1964. Insulin and myeloschisis in the chick embryo. *Aust J Exp Biol Med Sci* 42: 607-614.
- Verma IC, Thakur S.** 2007. Genetic causes. *In Arora M*, editor. Recurrent pregnancy loss. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers. p 25-31.
- Vokurka M, Hugo J a kolektiv.** 2004. Velký lékařský slovník. Praha: Maxdorf. p 838, 932, 933.

- Vorhees CV, Brunner RL, McDaniel CR, Butcher RE.** 1978. The relationship of gestational age to vitamin A induced postnatal dysfunction. *Teratology* 17: 271-275.
- Waddington CH.** 1932. Experiments on the development of chick and duck embryos, cultivated in vitro. *Phil Trans R Soc B* 221:179-230.
- Walker NE.** 1967. Distribution of chemicals injected into fertile eggs and its effect upon apparent toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 10: 290-299.
- Weidanz WP, Schaffer MF.** 1962. Hypoglycemia in chick embryos infected with *S. typhosa* via the allantoic cavity. *Proc Soc Exp Biol Med* 111: 655-659.
- WHO.** 1967. Principles for testing of drugs for teratogenicity: report of a WHO scientific group. *WHO Tech Rep Ser* 364: 1-18.
- Wiley MJ.** 1983. The pathogenesis of retinoic acid-induced vertebral abnormalities in Golden Syrian hamster fetuses. *Teratology* 28: 341-353.
- Wilhelm F.** 1988. *Vitamins*. Berlin: Walter de Gruyter.
- Wong CK, Lin CS.** 1988. Remarkable response of lipoid proteinosis to oral dimethyl sulphoxide. *Br J Dermatol* 119: 541-544.
- Wood DC, Wood J.** 1975. Pharmacologic and biochemical considerations of dimethyl sulfoxide. *Ann NY Acad Sci* 243: 7-19.
- Yip JE, Kokich VG, Shepard TH.** 1980. The effect of high doses of retinoic acid on prenatal craniofacial development in *Macaca nemestrina*. *Teratology* 21: 29-38.

internetové odkazy:

- URL 1** <[http://www.tyden.cz/rubriky/media/stolety-kuryr/srostla-dvojcata-se-soudi-s-drahami-staci-jim-jeden-listek\\_191388.html?showTab=nejnovejsi](http://www.tyden.cz/rubriky/media/stolety-kuryr/srostla-dvojcata-se-soudi-s-drahami-staci-jim-jeden-listek_191388.html?showTab=nejnovejsi)> *citováno* 9.12.2011.

## **9 SEZNAM PŘÍLOH**

Příloha 1: Biologická aktivita vitamínu A.

Příloha 2: Fotodokumentace postupu metody SANDWICH.