

Středoškolská odborná činnost

Vývoj obličeje a příčiny vzniku jeho poruch

Michala Polínková

Brno 2011

# Středoškolská odborná činnost

Obor SOČ: 04. Biologie

## Vývoj obličeje a příčiny vzniku jeho poruch

Autor: Michala Polínková

Škola: Gymnázium, Brno-Řečkovice,  
Terezy Novákové 2  
621 00 Brno  
Jihomoravský kraj  
Sexta A

Konzultanti: Doc. RNDr. Marcela Buchtová, Ph.D.  
RNDr. Kateřina Cibulková

Brno 2011

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svou práci vypracovala samostatně, použila jsem pouze podklady (literaturu, elektronické dokumenty, záznamy z rozhlasu atd.) citované v práci a uvedené v příloženém seznamu a postup při zpracování práce je v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

V Brně dne 25. února 2011

podpis: \_\_\_\_\_

## **Poděkování**

Děkuji paní doc. RNDr. Marcele Buchtové, Ph.D. za vedení mé práce, za odbornou pomoc a podnětné připomínky, které mi udělovala. Také bych ráda poděkovala paní RNDr. Kateřině Cibulkové za pomoc při sestavování formální stránky práce. Bez jejich vstřícného přístupu by tato práce vůbec nemohla vzniknout. V neposlední řadě bych chtěla také poděkovat Jihomoravskému kraji, za jehož finanční podpory byla práce vypracována.

## **Anotace**

V práci jsem se zabývala popisem procesu vývoje obličeje a příčinami vzniku jeho poruch. V teoretické části práce se zaměřuji na embryonální vývoj obličeje člověka a na původ buněk jednotlivých prominencí, které na jeho tvorbě podílejí. Následně se zabývám možnostmi operace rozštěpových vad u člověka. Při vlastním výzkumu jsem nejprve provedla pitvu kuřete pro seznámení s morfologií trávicí soustavy ptáků. Dále jsem sledovala vliv různých koncentrací inhibitoru follistatinu a chordinu na vývoj u kuřecích embryí. U obou látek jsem prokázala vliv na embryonální vývoj.

## **Klíčová slova**

obličejové vady, rozštěp, follistatin, chordin, pitva kuřete

## Obsah

<b>1 Úvod</b> .....	<b>7</b>
<b>2 Teoretická část</b> .....	<b>8</b>
2.1 Vývoj obličeje .....	8
2.2 Zárodečné listy.....	11
2.3 Obličejové vady .....	12
2.3.1 Rozštěp rtu.....	14
2.3.2 Rozštěp patra.....	15
2.3.3 Vývojové vady nosu .....	17
2.3.4 Rozštěpy tváří.....	17
2.3.5 Operační zákroky a pooperační léčba rozštěpů obličeje	18
2.4 Follistatin .....	20
<b>3 Vlastní průzkum</b> .....	<b>22</b>
3.1 Pitva kuřete .....	23
3.2 Mikroinjektáž follistatinu do kuřecích embryí .....	26
3.3 Barvení skeletů.....	32
3.4 Analýza výsledků.....	34
<b>4 Závěry</b> .....	<b>39</b>
<b>Seznam použité literatury</b> .....	<b>41</b>
<b>Přílohy</b> .....	<b>43</b>

# 1 Úvod

Vývoj lidského obličeje je složitý proces, během kterého může snadno dojít k poruchám a následně ke vzniku obličejových vad. Obličejovými vadami jsou myšleny rozštěpy obličeje nebo vady nosu. Může tedy nastat rozpolcení rtu, patra, tváře nebo může dojít k nedokonalému vyvinutí nosu. V dnešní době je možné rozštěpovou vadu rozeznat již na začátku těhotenství díky ultrazvuku. Tyto poruchy je možné operovat a umožnit tak člověku nebo dítěti normální plnohodnotný život.

Jednou z příčin vzniku postižení obličeje jsou toxické látky. V této práci jsem se zejména zaměřila na jednu z kandidátních látek ovlivňujících embryonální vývoj – follistatin. Tento inhibitor je běžnou součástí lidského organismu a v současné době je rovněž nabízen sportovcům v podobě potravinových doplňků pro zlepšení kvality svalů. Nicméně follistatin může být příčinou vzniku rozštěpů, a právě touto problematikou se zabývám ve své praktické části práce.

Mými cíly bylo popsat vývoj lidského obličeje a shrnout důvody vzniku rozštěpových vad, dále zjistit, zda může být follistatin jednou z příčin vzniku obličejových poruch a současně vytvořit výukový materiál o průběhu pitvy kuřete pro studenty VFU v Brně. Následně také přidat článek o follistatinu na internet v češtině.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Vývoj obličeje

Na formování obličeje se podílí tři embryonální zárodečné listy – ektoderm, entoderm a mezoderm (viz. kapitola 2.2). Doba pro vytváření základů obličejových struktur je od 4. do 8. týdne vývoje zárodku a ve 12. týdnu je vývoj obličeje plně dokončen.

Začátkem 5. týdne již existuje prvotní ústní jamka – stomodeum. Kolem stomodea se nachází pět obličejových základů ve formě výběžků:

- jeden velký, zaoblený val - frontonasální masa (ohraničuje kraniální okraj stomodea)
- dva maxilární výběžky (na laterálních stranách stomodea)
- dva mandibulární výběžky (kaudální okraj stomodea)

Těchto pět prominencí neustále roste a vyvíjí se. Zhušťováním ektodermu v laterálních částech frontonasálního výběžku vznikají čichové plakody. V dalším vývoji se zvětšují maxilární výběžky, zároveň rostou nosní váčky, které se mezi ně zasouvají. Dalším růstem maxilárních výběžků jsou nosní prominence stlačovány k sobě, takže postupně srůstají a tvoří tzv. *intermaxilární segment*, který po stranách následně splývá s maxilárními výběžky. Tímto způsobem vznikne společný základ pro horní ret a horní čelist. Maxilární výběžky se následně rozrostou a vznikají tváře. Základy zrakového orgánu se nejdříve nachází po bocích hlavy (laterálně) a později se u člověka díky růstu přemísťují na přední stranu (rostrálně).



Vývoj horního patra se dělí do dvou stádií:

- vývoj primárního patra (formuje se přední a střední část maxily, která tvoří malou část tvrdého patra u dospělého člověka)
- vývoj sekundárního patra (z něj je následně vytvořeno měkké patro i zbytek tvrdého patra)

Celý tento vývoj začíná v šestém týdnu těhotenství. Kritická období jsou od konce šestého týdne do začátku devátého týdne. Zatímco mandibulární výběžky se spojují už o týden dříve (5. týden) a dávají tak vznik dolnímu rtu a dolní čelisti.

Nos vzniká z pěti částí:

- kořen nosu a část hřbetu – z nepárové části frontonasální masy
- zbývající mediální část nosu s hrotem – z párových částí mediálních nosních výběžků
- nosní křídla – z párových laterálních nosních výběžků

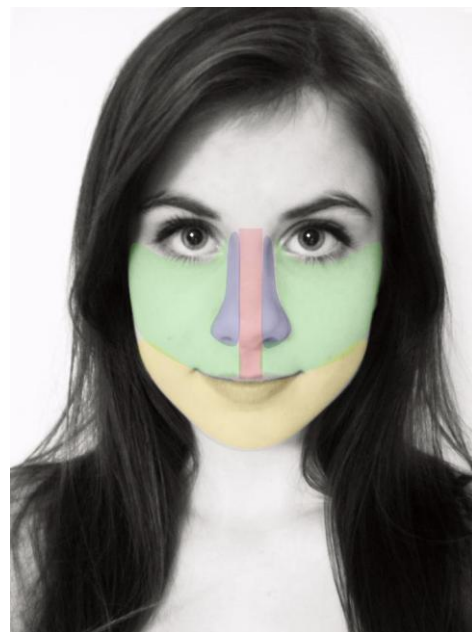
Prohlubováním nosních jamek (plakod) vznikají nosní otvory.

Základ uší je zpočátku uložen kaudálně v oblasti krku a teprve dalším vývojem se dostává do konečné polohy.

Koncem embryonálního období je vytvořen již základní tvar obličeje, ale jeho proporce jsou ještě od stavu v dospělosti odlišné. Obličejová část je celkově menší, nos je nižší a plochý a dolní čelist úzká.

Tato morfologická odlišnost je způsobena zejména díky těmto faktorům:

- zuby nejsou ještě prořezány
- obě čelisti ještě nejsou plně vyvinuty
- nosní dutiny jsou poměrně malé a jejich vývoj je definitivně dokončen až v pubertě



**Obrázek 1:** Jednotlivé části obličeje v 6. týdnu embryonálního vývoje (vlevo) a u člověka s vyvinutým obličejem (vpravo). Je zde patrný vývoj různých částí obličeje a jejich příspěvek k tvorbě horní a dolní čelisti během prenatálního vývoje. Vysvětlivky: červeně – mediální nosní prominence, modře – laterální nosní prominence, zeleně – maxilární prominence, žlutě – mandibulární prominence

## 2.2 Zárodečné listy

Zárodečný list je souvislá vrstva epitelu patrná v zárodečném terčíku od druhého týdne vývoje embrya. Diferenciací epitelu zárodečného listu se postupně vyvíjí další typy tkání a základy orgánů. Během prenatalního vývoje se vytváří tři zárodečné listy – *entoderm*, *ektoderm*, *mezoderm*.

- *Entoderm* (= endoderm) je vnitřní zárodečný list, ze kterého se vyvíjí epitel Eustachovy trubice, část středního ucha, epitel některých sliznic, žláz, zažívacího a částečně močopohlavního systému.
- *Mezoderm* (= mesoderm) je střední zárodečný list. Je tvořen proliferujícími buňkami (množícími se buňkami) ektodermu, které aktivně migrují mezi ektodermem a entodermem. Je zdrojem pojiv, svalstva, cév, srdce, převážné části orgánů močového a pohlavního systému.
- *Ektoderm* je vnější zárodečný list. Vzniká z něj mimo jiné většina epitelů, pokožka a její deriváty (vlasy, nehty), zuby, výstelka začátku zažívací trubice, čichové buňky, mozeček, tyčinky a čípky, nervová soustava, rohovka a čočka oka.

### 2.3 Obličejové vady

Obličejovými poruchami jsou myšleny rozštěpy obličeje. Rozštěp obličeje je vrozená vada, která způsobuje rozpolcení rtu, tváře nebo patra. Vyskytují se samostatně nebo kombinovaně, mohou být úplné nebo jen částečné a podle svislé osy obličeje může být postižení jednostranné - unilaterální, oboustranné - bilaterální nebo ve střední linii - mediální.

Na vzniku rozštěpových vad se podílí faktory zevní, vnitřní (genetické) a nebo jejich kombinace. Vznikají poruchou mechanismů, které vedou ke spojení výběžků, formování patra a tvaru obličeje. Způsob jejich vzniku a období, ve kterém vznikají, jsou rozdílné. Rozštěpy rtů a tváří vznikají poruchami při migrování buněk z neurální lišty, poruchami tvorby jazyka či při poruše buněčné komunikace mezi jednotlivými obličejovými prominencemi, kdy následně nedochází k jejich spojení. Rozštěp samotného rtu se označuje jako *cheiloschisis*, rozštěp rtu a čelisti – *cheilognatoschisis*, rozštěp rtu, patra a čelisti – *cheilognatopalatoschisis*, rozštěp samotného patra – *palatoschisis*.

Jak je zmíněno výše, rozštěpy se vytváří díky genetickým predispozicím (uvádí se 20%) nebo díky zevnímu vlivu. Mezi zevní faktory patří hlavně vlivy fyzikální a chemické. Je prokázán špatný vliv některých léčiv (antiepileptik a sedativ) podávaných během těhotenství (především v prvním trimestru), které mohou zvyšovat pravděpodobnost výskytu rozštěpu rtu a patra dvakrát až třikrát.

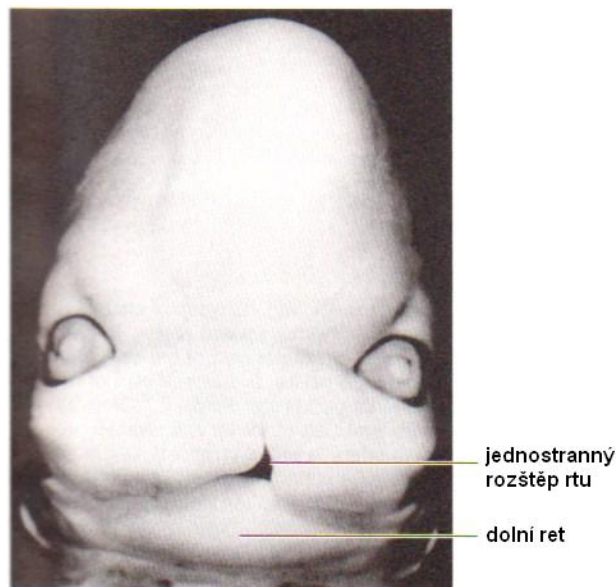
### Příčiny vzniku rozštěpových vad:

1. dědičná dispozice – asi 20 % pacientů
2. zevní příčiny – asi 60-70 % pacientů
  - vliv toxických látek
    - chemikálie
    - alkohol
    - léky
    - další teratogenní látky
  - vliv fyzikálních příčin
    - úrazy v době těhotenství
    - vysoká teplota
  - vliv biologických faktorů
    - infekce
    - poruchy ve výživě plodu
      - abnormality těhotenství
      - vícečetná těhotenství
    - vyšší věk matky
    - další onemocnění matky
      - poruchy výživy
      - gynekologická onemocnění
      - stres, nervové vlivy
3. kombinované příčiny – asi 10-20 % pacientů

### 2.3.1 Rozštěp rtu

Tato vývojová vada postihuje převážně horní ret a je poměrně častá. Větší pravděpodobnost výskytu je u chlapců a zvyšuje se s věkem matky. V průměru je asi jedno z 1000 narozených dětí postižené. Rozštěp horního rtu může být úplný nebo neúplný a dále jednostranný (vlevo nebo vpravo), oboustranný nebo mediánní, ale ten je velice vzácný.

Oproti tomu je rozštěp dolního rtu poměrně ojedinělý a vyskytuje se pouze v mediánní rovině, protože spodní ret vzniká spojením dvou mandibulárních výběžků.



**Obrázek 2:** Jednostranný rozštěp rtu u lidského embrya starého asi 51 dní (stádium 20) [1]

### 2.3.2 Rozštěp patra

Tato porucha se vyskytuje méně často než rozštěp rtu a není ovlivněna věkem matky. Frekvence jeho výskytu je 1 : 2500 a je častější u děvčat než u chlapců. Podle lokalizace jej rozdělujeme na:

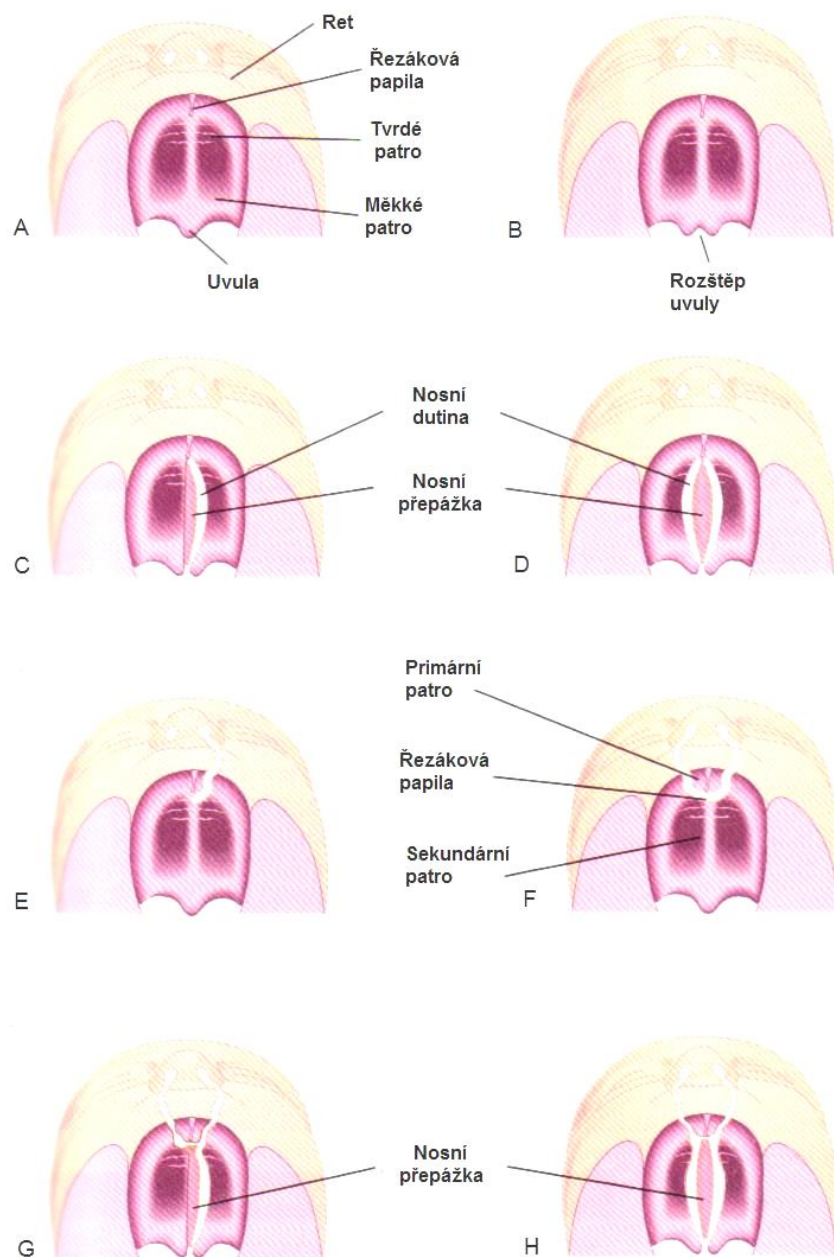
**a) Přední rozštěp** – před *foramen incisivum* – defekt ve vývoji primárního patra. Nedojde-li ke spojení intermaxilárního výběžku s maxilárním výběžkem, pak vzniká tato vada. Může být unilaterální nebo bilaterální a vždy je kombinován s rozštěpem rtu a čelisti (*cheilognapalatoschisis*).

**b) Zadní rozštěp** – za *foramen incisivum* – rozštěp sekundárního patra. Vzniká tím, že nedojde ke spojení patrových výběžků a nosní přepážky (nasálního septa) unilaterálně nebo bilaterálně. Uzavírání štěrbin postupuje směrem dozadu, a proto může být tento defekt jen částečný. Projeví se jen rozštěpem měkkého patra nebo samotné uvuly<sup>1</sup>. Na rozdíl od předního rozštěpu se může vyskytovat i izolovaně, protože spojování patrových výběžků probíhá asi o týden později než splývání výběžků, které tvoří horní ret a čelist.

**c) Kombinovaný rozštěp** – vzniká před i za *foramen incisivum* – je kombinovaný s rozštěpem rtu i čelisti. Může jít o unilaterální rozštěp primárního a sekundárního patra nebo bilaterální rozštěp primárního patra kombinovaný s unilaterálním rozštěpem sekundárního patra, případně kompletní bilaterální rozštěp primárního i sekundárního patra.

---

<sup>1</sup> Volně visící výběžek ve střední oblasti zadního okraje měkkého patra.



**Obrázek 3:** Různé typy rozštěpů rtu a patra. A) normální ret a patro. B) rozštěp uvuly. C) unilaterální rozštěp sekundárního patra. D) bilaterální rozštěp sekundárního patra. E) kompletní unilaterální rozštěp rtu s unilaterálním rozštěpem primárního patra. F) kompletní bilaterální rozštěp rtu s bilaterálním rozštěpem primárního patra G) bilaterální rozštěp rtu s bilaterálním rozštěpem primárního patra a unilaterálním rozštěpem sekundárního patra. H) bilaterální rozštěp rtu s bilaterálním rozštěpem primárního patra a bilaterálním rozštěpem sekundárního patra [1]



### 2.3.3 Vývojové vady nosu

V praxi nejsou moc časté. Vznikají v případě, že nedojde ke splynutí mediálních nosních výběžků. Takto vzniká na nosním hřbetu různě hluboká rýha. Jestliže je rýha hlubší, nosní otvory jsou dále od sebe a vzniká rozdělená nosní přepážka. Nedojde-li k vytvoření jedné čichové plakody, vzniká nos pouze s jedním otvorem a chybí-li čichové plakody obě, pak chybí nos úplně.

### 2.3.4 Rozštěpy tváří

a) **Šikmý rozštěp tváře** vzniká tehdy, neuzavře-li se rýha mezi maxilárním výběžkem a laterálním nosním výběžkem. Táhne se od vnitřního koutku oka k nosnímu křídlu a zpravidla pokračuje rozštěpem horního rtu. Může být unilaterální nebo častěji bilaterální.

b) **Příčný (laterální) rozštěp tváře** se ještě rozděluje na dvě kraniofaciální vady:

1. *Makrostomie* – vzniká, pokud se úplně nespojí maxilární s mandibulárním výběžkem, takže ústní štěrbina je velice široká. Může být bilaterální nebo jen unilaterální.
2. *Mikrostomie* – opak výše popisované anomálie. Dochází zde ke splynutí maxilárního a mandibulárního výběžku ve větším rozsahu než normálně a tak je ústní otvor zúžený. Může být spojena s nedokonalým vývojem spodní čelisti nebo velice ojediněle s defekty nosu.

### 2.3.5 Operační zákroky a pooperační léčba rozštěpů obličeje

Plastika a pooperační léčba rozštěpových vad se provádí přímo na plastické nebo maxilofaciální (čelistní) chirurgii. V České republice existují centra, kde se tyto zákroky provádí, např.: v Praze na Klinice plastické chirurgie FN Královské Vinohrady a v Brně ve FN u sv. Anny – na Klinice plastické a estetické chirurgie.

K úspěšnému vyléčení rozštěpové vady je nezbytná spolupráce několika specializovaných lékařů. Mezi ně patří pediatr (sleduje celkový vývoj dítěte), foniatr a logoped (náprava řeči), ušní lékař (lidé s rozštěpy mají problémy s opakovanými záněty středního ucha, může dojít ke snížení kvality sluchu, a proto je důležitý dohled otologa), stomatolog (dohled na poruchy zubů, jelikož se takto postiženým lidem více kazí zuby), ortodont (kontroluje správný vývoj čelisti a rovnání zubů), genetik (vyšetřuje příčinu vady) a neméně důležité jsou ve většině případů návštěvy psychologa.

Operace rozštěpu rtu se většinou provádí ve věku tří měsíců, operace patra pak většinou od devíti měsíců do jednoho roku. Záleží ovšem na fyzickém a zdravotním stavu dítěte. Pokud je rekonstrukce rtu nebo patra prováděna dříve než má dítě alespoň 5 kg, je operace riziková. V časném novorozeneckém období jsou totiž svaly, srdce, játra i plíce dítěte nezralé, a proto je anestezie i pooperační péče náročná. Doporučuje se s plastikou počkat, dokud ji dítě není schopno zvládat lépe. Novorozenci, kteří jsou odoperováni časně, jsou hospitalizováni na jednotce JIP, následně jsou umístěni do inkubátorů a napojeni na umělou plicní ventilaci. Starší děti (tři měsíce a více) jsou také hospitalizováni a pozorováni na jednotce JIP, ale většinou pouze do večera a poté jsou převezeni na standartní oddělení. Tudíž je délka odloučení dítěte od matky minimální.

Před operací je pacient uveden do celkové narkózy a je intubován RAE trubicí (right-angle endotracheal tube = pravoúhlá endotracheální trubice),

kteřá je zavedena nosem do jícnu. Samotný zákrok zpočívá v sešití rtu, případně i patra. Po operaci je pacient převezzen na jednotku JIP (viz. výše). Pokud proběhla pouze operace rtu, je dítě při dobrém průběhu hojení propuštěno do domácí péče (po vytažení stehů, asi 6-8 dnů po operačním zákroku). Po rekonstrukci rozštěpu patra se dítě za ideálních okolností propouští do domácího ošetření 5-7 dní po zákroku. Doma je pak nutné provádět speciální masáže rtu nebo patra ke zmírnění otoku a změknutí jizvy. Dále se musí provádět dechová a logopedická cvičení. Rekonstrukce rtu a hlavně patra je důležitá pro správné vyslovování. Děti s neuzavřeným patrem neumí vyslovovat souhlásky, a pokud se je snaží nějakým nesprávným způsobem vyslovit, má jejich hlas mečivé zabarvení.

V místě, kde je rozštěpem zasažena kost horní čelisti nastávají problémy s prořezáváním základů trvalých zubů. Chybí tím totiž značná část kosti a je tedy nutné ji doplnit. Po konzultaci s plastickým chirurgem se implantuje (zasazuje) kostní štěp (provádí se nejdříve v osmi letech dítěte, aby nebylo zasaženo do vývoje čelisti). Operace se provádí tak, že se odebere malý kousek z kyčelní kosti a po obnažení sliznice se do zubního oblouku tento kousek kosti vklíní.

Během celého života musí takto postižený člověk pravidelně navštěvovat specializované lékaře, a pokud jsou zde ještě nějaké funkční nebo estetické nedostatky, lze je po dokončení vývoje určité části obličeje a po poradě s lékaři opravit.

## 2.4 Follistatin

Follistatin, také známý jako aktivin vázající protein (= activin-binding protein), je bílkovina, která je v lidském těle kódovaná FST (follistatinovým) genem. Follistatin je autokrinní<sup>2</sup> glykoprotein, který je aktivní v téměř všech tkáních fylogeneticky vyšších zvířat.

Follistatin je produkován folikuly stimulujícími buňkami předního laloku hypofýzy a ty jsou v kontaktu s endokrinními<sup>3</sup> buňkami předního laloku hypofýzy (adenohypofýzy).

Follistatin byl zpočátku izolován z folikulární tekutiny a identifikován jako protein, který inhibuje sekreci folikuly stimulujícího hormonu (FSH) z předního laloku hypofýzy. Také je znám jako FSH-suprimující (potlačující) protein (FSP). Primární funkcí follistatinu je vazba a bionutralizace členů TGF- $\beta$  rodiny, s primárním účinkem na aktivin – parakrinní<sup>4</sup> hormon (TGF- $\beta$  člen), který zvyšuje sekreci FSH v předním laloku hypofýzy. Nejvyšší koncentrace follistatinu byla tedy nalezena v ženském vaječníku a dále v kůži. Ví se, že je follistatin obsažen také v krevní plazmě, ale doposud nevíme, co je jeho zdrojem. Spekuluje se o tom, že by producenty mohly být endotelové buňky (buňky vystýlající cévy) nebo makrofágy a monocyty, které také cirkulují v krvi. Follistatin byl prokázán při detekci polycystického ovarialního syndromu (PCOS) a vědci se domnívají, že může mít řídicí roli v tomto onemocnění způsobujícím neplodnost. Follistatin a kostní morfogenetické proteiny (BMPs) – multifunkční faktory růstu, jsou členy TGF- $\beta$  rodiny a hrají také roli při vývoji ovarialních folikulů uvnitř

---

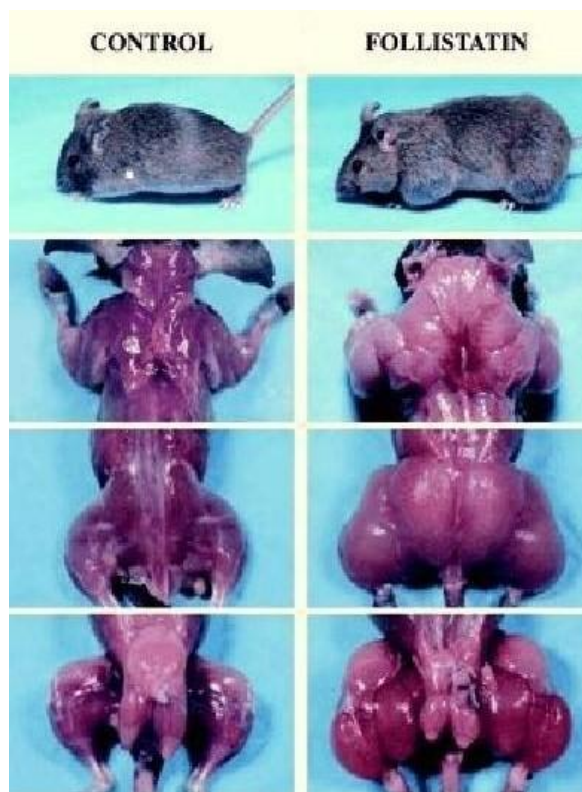
<sup>2</sup> vyloučená látka z buňky působí na buňku samou, tzn. působí na receptory na téže buňce

<sup>3</sup> sekret je z těchto buněk předáván do krve a ta ho roznáší po těle k cílovým buňkám

<sup>4</sup> účinkuje pouze na sousední buňky a jejich receptory

vaječníků.

Přítomnost follistatinu a jeho funkce byla rovněž zkoumána u myši, kde byla zjištěna jeho úloha v regulaci růstu svalů, jako antagonisty myostatinu, který inhibuje (snižuje) růst svalů. Pokud follistatin v těle chybí, tak není prováděná regulace myostatinu, plod přežije do narození, ale během pár hodin po té umírá. Organismus neroste, je různě deformovaný, má zeslabený krevní oběh a nervový systém je také porušen. Myš, na které byl pokus prováděn, měla lesklou kůži, malformované hmatové chlupy a nepravidelnosti v tvorbě měkkého a tvrdého patra (Phillips a De Kretser 1998). Pokud je v těle naopak follistatinu nadbytek, dochází k přílišnému nárůstu svalů.



**Obrázek 4:** Vlevo - tělo normální myši, vpravo – tělo myši s nadbytkem follistatinu. [2]

### 3 Vlastní průzkum

Vlastní průzkum byl zaměřen na průkaz, zda inhibitor s názvem follistatin může ovlivnit vývoj určité části těla. Je známo, že je FST obsažen v potravinových doplňcích pro zlepšení kvality svalů a také se nyní stává velkým trendem v chovu masných plemen hospodářských zvířat. Díky zvýšené hladině FST (ať už uměle či přirozeně) má zvíře více svalové hmoty, a proto je pro farmáře takovýto dobytek finančně výhodnější. Tyto případy jsou zatím známé zejména u prasat a skotu. Mým cílem bylo prozkoumat, jestli má follistatin negativní vliv na embryo a jeho vývoj.

Ve výzkumu jsem se zaměřila na oblast maxily. Použila jsem kuřecí embrya, jelikož kur má vývoj horní čelisti velice podobný člověku a navíc embrya jsou snadno přístupná manipulacím pro testování různých morfogenů. V případě průkazu škodlivého účinku chemikálií na kuřecí embrya, lze tedy interpretovat získané poznatky na člověka.

Celý výzkum se skládal z několika částí. Nejdříve jsem chtěla poznat kompletní fyzickou stavbu kura domácího, zvláště jeho horního patra a zobáku, na který se zaměřuji. K tomu mi pomohla pitva, kterou jsem provedla na VFU v Brně. Fotodokumentaci pitvy jsem poskytla studentům VFU jako výukový materiál přístupný na webových stránkách univerzity. Hlavní částí mého experimentu pak byla mikroinjektáž follistatinu do oblasti budoucí maxily kuřecích embryí. Během své práce jsem rovněž injikovala další inhibitor chordin, nicméně díky malému množství získaných vzorků, neuvádím detaily experimentu v této práci a své budoucí experimenty plánuji zaměřit zejména na tuto látku. Získané vzorky jsem obarvila pro usnadnění analýzy defektů na skeletu kuřat na Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd České republiky.

Na závěr tohoto úvodu do mé praktické části bych chtěla zdůraznit, že při vypracování práce jsem dodržela zákony platné v České republice týkající se práce s experimentálními zvířaty, které zabraňují týrání zvířat.

### **3.1 Pitva kuřete**

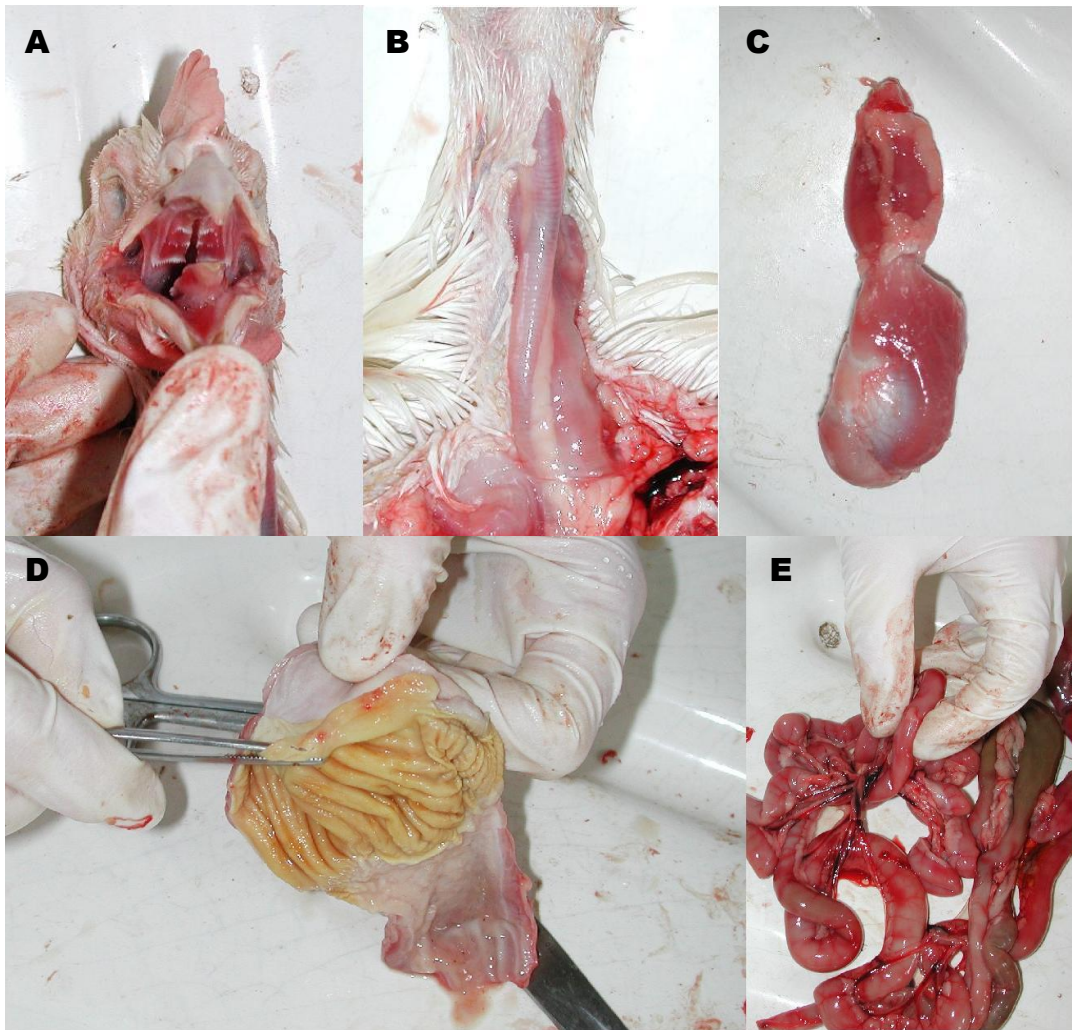
Pitva byla provedena na uhynulém jedinci (z jatek Brno-Modřice), který byl v porážkovém věku (42 dní). K těmto pitvám, které jsou určeny ke vzdělávání studentů na VFU Brno, slouží zvířata, která zemřela samovolně nebo při nehodě během transportu.

Hlavním důvodem pitvy mladého kohoutka bylo studium morfologie trávicí soustavy, která začíná právě zobákem a ústní dutinou, která může být postižena rozštěpovými vadami. Výsledkem bylo rovněž vytvoření výukového materiálu pro studenty VFU v Brně. Co se týče vývoje maxily a mandibuly, je kur v tomto podobný člověku, a proto se pokusy spojené s rozštěpy obličeje (zejména rtu) dělají právě na něm. Je zde ovšem rozdíl ve struktuře sekundárního patra, které kur nemá uzavřené (obr. 5A), a proto je nemožné kuřata využívat ke studiu tvorby sekundárního patra.

Kohoutka jsem si položila hrudním košem nahoru a očistila jsem mu krk od peří. Nastříhla jsem kůži na krku, abych ji poté mohla až po okraj hrudního koše rozříznout a okryt další vrstvou, kterou tvoří prsní svalstvo. Když jsem měla odhalené prsní svaly, nahmatala jsem hřeben hrudní kosti (*carina*) a podél ní jsem vedla dva řezy napříč svalovinou. Žebra jsem přestříhala a celou hrudní kost s prsními svaly jsem vyjmula. Takto jsem si kohoutka otevřela a mohla jsem pozorovat uložení jednotlivých orgánů. Celá trávicí soustava začíná ústním otvorem, u ptáků zobákem. Abych si mohla lépe prohlédnout patro, rozstříhla jsem ústní koutky, které tvoří spojnicí horní a dolní čelisti a následně zobák rozevřela. Už na první pohled je zřejmé, že ptáci mají fyziologický rozštěp sekundárního patra – ústní dutina komunikuje úzkou štěrbinou s nosní dutinou (obr. 5A). Dále si můžeme

povšimnout, že hltan je vroubkovaný (obr. 5B), přechází v jícn a ten ústí do žaludku. Když se žaludek vyjme z těla a očistí od tuků, které ho obalují, můžeme dobře vidět, že je tvořen hladkým svalstvem (obr. 5C). Pokud ho rozřízneme a vyčistíme, vidíme, že vnitřní část žaludku je chráněna kutikulou (obr. 5D), kterou lze snadno sloupnout (takto očištěný žaludek, bez kutikuly se prodává v obchodech). Žaludek má dvě části – svalnatý a žláznatý (obr. 5C). Natrávená potrava pokračuje z žaludku do střev a posledním koncem celé této soustavy je kloaka s konečníkem. Pokud se blíže zaměříme na střeva, můžeme pozorovat, že jsou k sobě připoutaná vazivem a nalezneme zde dvě dlouhá slepá střeva. Asi 30 cm od těchto slepých střev je malý výstupek na stěně střeva – pozůstatek po žlutkové kouli (obr. 5E). Detailní fotodokumentace celé pitvy je k dispozici v příloze.





**Obrázek 5:** Trávicí soustava ptáků: A - tvrdé patro u ptáků, B – trachea a hltan, C – dvoudílný žaludek z hladké svaloviny, D – kutikula vystýlající svalnatý žaludek, E - střevo

### 3.2 Mikroinjektáž follistatinu do kuřecích embryí

K injektáži potřebujeme kuřecí embrya, která se nachází ve stádiu 14-25 (tj. embryo staré 50-72 hodin) (Hamburger a Hamilton, 1951). Stáří se určuje podle počtu somitů<sup>5</sup> a podle celkové fyzické stavby embrya.



**Obrázek 6:** Použitá stádia embryí 14 – 22. [4].

---

<sup>5</sup> Mezodermové párové segmenty (úseky)

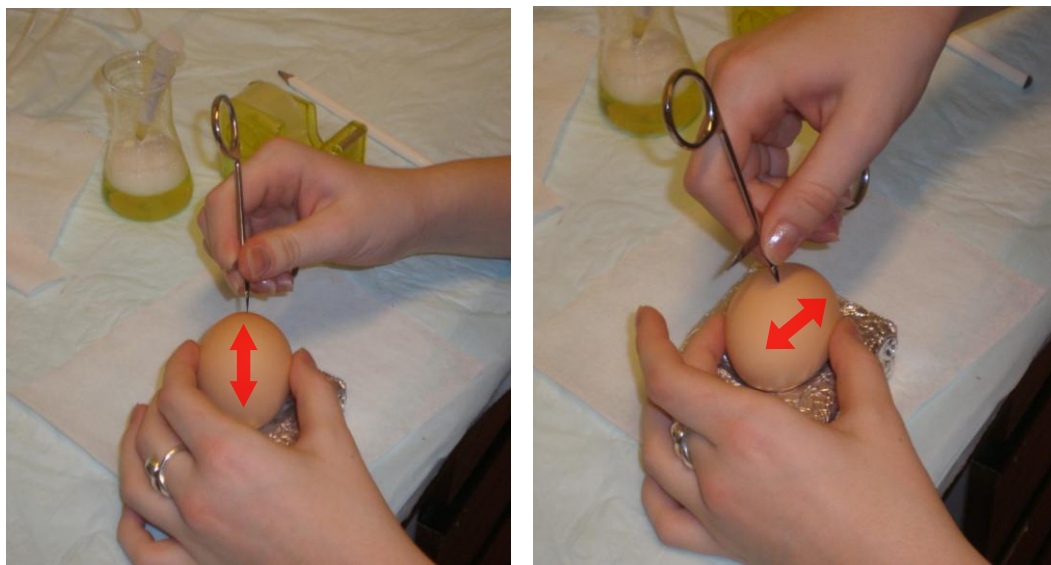
Vajíčka přechováváme v inkubátoru, kde je teplota přesně 100F (37,8°C).



**Obrázek 7:** Inkubátory na kuřecí embrya

Koncentrace follistatinu (viz. kapitola 2.4), který jsem injektovala do embryí, se v jednotlivých experimentech lišil. Vzhledem ke skutečnosti, že nejsou přesně známé koncentrace follistatinu a jejich vliv na embryonální vývoj v jednotlivých stádiích, rozhodla jsem se testovat účinek tohoto inhibitoru na kuřecích embryích. Ve svém vlastním průzkumu jsem zkoumala účinek osmi různých koncentrací FST na jedenácti vývojových stádiích (přesné údaje k nahlédnutí v příloze).

Nejdříve vyjmeme vajíčka z inkubátoru a otevřeme je. Samotné otvírání zahájíme propíchnutím skořápky nůžkami na tupém konci vajíčka, kde se nachází vzduchová komůrka. Druhý otvor uděláme na horní straně vodorovně položeného vajíčka (obr. 8).



**Obrázek 8:** Propichování skořápky

Injekční stříkačkou vysajeme 1 ml bílku, aby embryo kleslo níže a my mohli bez problémů vystříhnout okénko k umožnění injektáže. Embryo si pod mikroskopem (Leica, Německo) obarvíme neutrální červení, abychom ho lépe viděli, a opatrně pinzetou odstraníme embryonální obaly (amnion a chorion) z oblasti hlavy.



**Obrázek 9:** Vlevo vysávání bílku, vpravo vystřihávání otvoru ve skořápce.

Nyní už můžeme pomalu zavést mikroinjektažní skleněnou jehlu naplněnou roztokem do oblasti budoucí maxily a následně pomocí mikroinjektažního zařízení (Eppendorf, Německo) vstříknout follistatin do mezenchymu embrya.

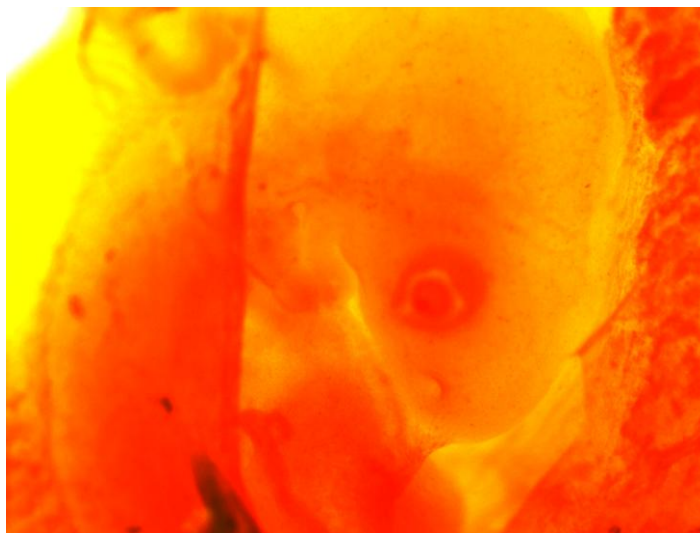


**Obrázek 10:** Mikroskop a přístroje potřebné k mikroinjektaži.

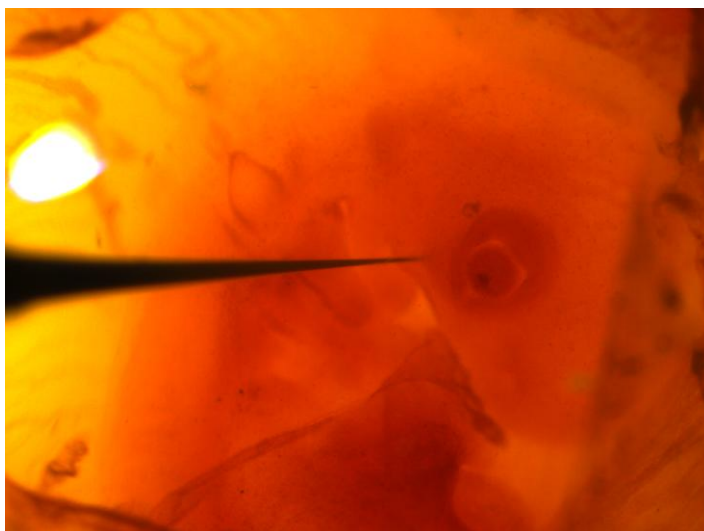
K přesnějšímu vpichu použijeme mikromanipulátor (Leica, Německo), ve kterém je jehla zasazena (obr. 10). Po provedení injekece vajíčko opět zavřeme, tedy zalepíme otvor izolepou a vložíme zpět do inkubátoru.



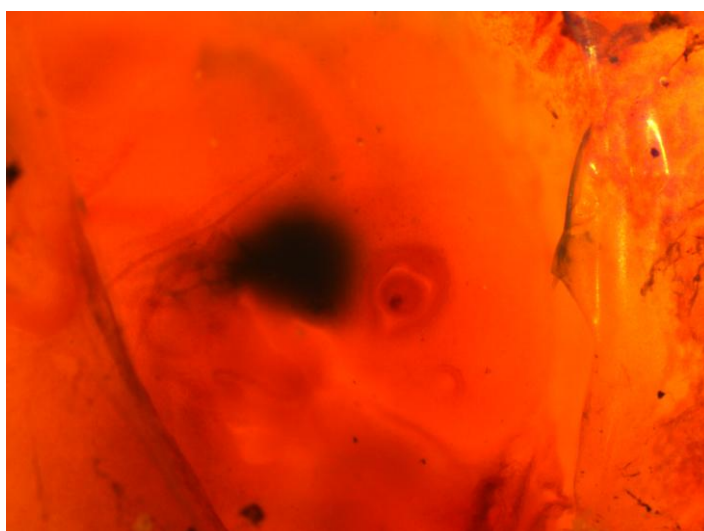
**Obrázek 11:** Odlamování zacelené špičky mikroinjekční jehly.



**Obrázek 12:** Kuřecí embryo po odstranění embryonálních obalů, stádium 17.



**Obrázek 13:** Totéž kuřecí embryo při mikroinjektáži do oblasti budoucí maxily.



**Obrázek 14:** Embryo po injektáži. Modrá barva vyznačuje oblast, ve které se nachází follistatin.

### 3.3 Barvení skeletů

Jeden týden před vylíhnutím vyndáme vajíčka z inkubátoru, znovu otevřeme, vyjmeme hlavu, odstříhneme a ponoříme ji minimálně na tři dny do 100% etanolu ( $C_2H_5OH$ ). Takto se vzorky zafixují a zabrání se rozpadu tkáně. Z každé hlavy nejdříve stáhneme kůži, odstraníme oči a po té vložíme do acetonu ( $CH_3COCH_3$ ). Ten způsobuje dehydrataci zbylé tkáně. Po čtyřech dnech hlavy propláchneme destilovanou vodou a přistupujeme k samotnému barvení. Barvicí roztok se připravuje pokaždé čerstvý a barvičky se před smícháním filtrují. Roztok se skládá z jednoho dílu 3% alciánové modři v 70% etanolu, šesti dílů 0,1% alizarínové červeně v 70% etanolu, jednoho dílu kyseliny octové ( $CH_3COOH$ ) a ze 17 dílů 70% etanolu. Do jedné odběrovky se vejde asi 10 ml roztoku.

1 díl	3 % alciánová modř v 70% etanolu	4 ml
6 dílů	0,1 % alizarínová červeně v 70% etanolu	24 ml
1 díl	kyselina octová	4 ml
17 dílů	70% etanol	68 ml
		<b>100 ml</b>

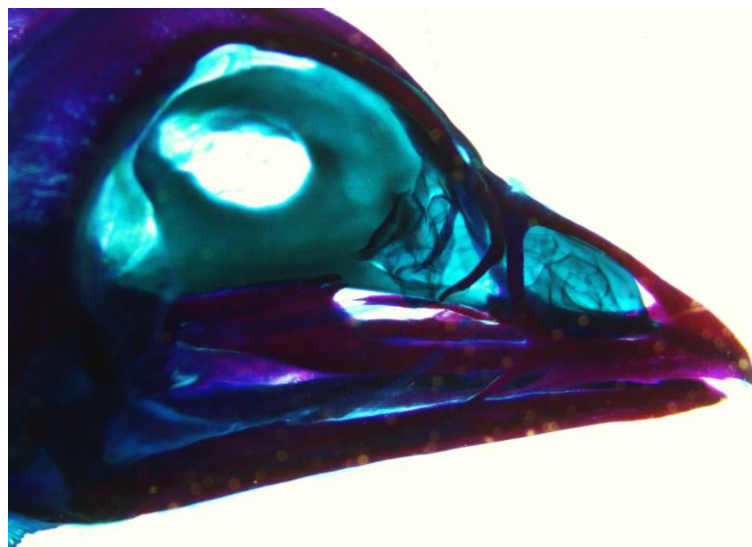
**Tabulka 1:** Přesné hodnoty jednoho z mých barvení pro 10 vzorků.

Po ponoření vzorků do barvicího roztoku je necháme při pokojové teplotě 10 dní na třepačce (BIOSAN Os–10) pro důkladné obarvení. Alciánová modř prokazuje, že se v chrupavkách nachází mukopolysacharidy (tvoří většinu mezibuněčné hmoty obsažené v pojivové tkáni), a proto se chrupavky zbarví modře. Alizarínová červeně je látka, která se váže na tkáně obsahující vápník, s kterým vytváří červený komplex, a z tohoto důvodu se kosti zbarví červeně. Dále se v roztoku vyskytuje etanol, který napomáhá zkvalitnit promíchání obou barviček. Červeně potřebuje k obarvení kyslejší prostředí



(nižší pH), a proto se do roztoku přidává i kyselina octová. Po deseti dnech sundáme odběrovky z třepačky, propláchneme hlavy destilovanou vodou a přidáváme k nim připravený 20% glycerol s 2% KOH. Takto vzorky uchováváme zhruba jeden týden při pokojové teplotě, dokud není tkáň jasná. Pokud je hlava větší, roztok měníme a zprůhledňování tkání trvá delší dobu. Musíme hlídat, aby se hlava vlivem chemikálií nerozpadla. Předposledním krokem je ponechání lebek v 50% glycerolu cca 7-14 dní, dokud tkáň úplně nezprůsvitní a nejsou jasně vidět obarvené kosti a chrupavky. Nakonec vzorky vložíme do 100% glycerolu a tak je uchováváme.

Výsledkem barvení je obarvená lebka, kde jsou rozlišené kosti (červená) a chrupavky (modrá), a proto můžeme lépe posoudit, jestli vývoj probíhal normálně nebo jestli došlo k tvorbě abnormalit.



**Obrázek 15:** Normální, obarvená hlava kuřete. Červená – kosti, modrá – chrupavky.

### **3.4 Analýza výsledků**

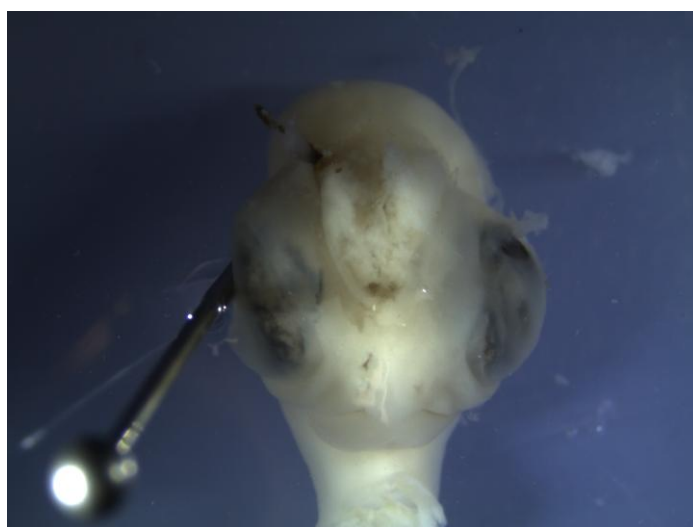
Během experimentů jsem zjistila, že pro tento výzkum je nejvhodnější používat kuřecí embrya, která jsou ve stádiu 16 – 18. Pro mladší embrya, tedy ta, která jsou ve stádiu 14 nebo 15, je nutná nižší koncentrace follistatinu než 90 µl/ml. Pod vlivem vyšší koncentrace umírají.

Ze 171 nainjektovaných kuřat jsem odebrala 25 vzorků. Z toho 14 kuřat jsem po obarvení skeletu shledala normálními (MP 10, 33, 35, 39, 56, 58, 59, 77, 98, 101, 109, 144, 145, 146), šest kuřat mělo otevřenou hrudní a břišní dutinu, pravděpodobně kvůli narušení epitelu při mikroinjektáži (MP 21, 150, 153, 154, 155, 158). Většinou tato embrya zemřela v raném stádiu, proto jsem je nefixovala ve 100% etanolu, ale ve 4% formaldehydu a skelet jsem nebarvila, jelikož to nebylo možné. U vzorků MP 154, 155 a 158 jsem zaznamenala kromě neuzavřené břišní a hrudní dutiny také jiné vady.

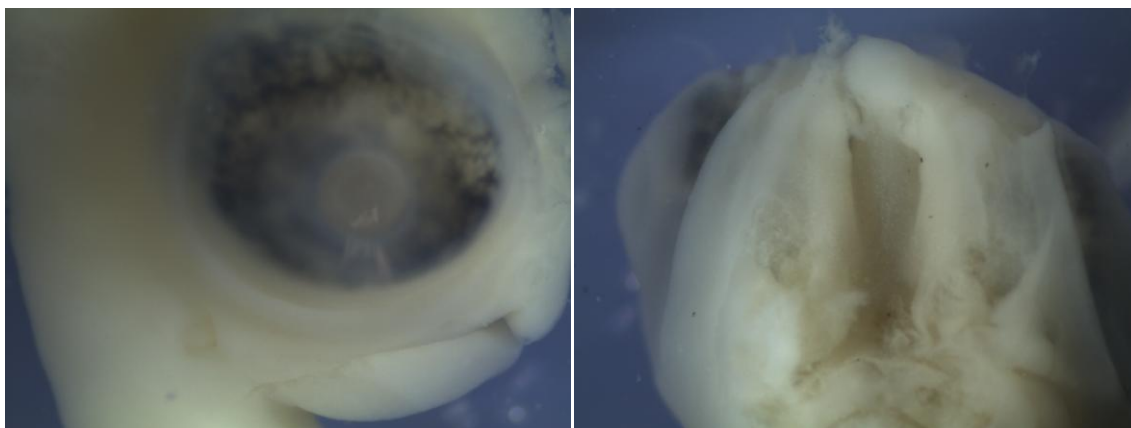
Embryo MP 154 zemřelo ve stádiu 29. Kromě hrudní a břišní dutiny se mu také neuzavřela lebeční klenba a bylo postižené tzv. hydrocefalem. Dále jsem pozorovala abnormální pravou končetinu – nevyvinuté autopódium. Díky svým poznámkám během experimentů vím, že jsem při injektáži follistatin rovněž vstříkla do cévy a tak byl zasažen i mozek, jehož následkem vzniknul hydrocefalus a cévou pronikl follistatin i do postižené končetiny.



**Obrázek 16:** Embryo MP 154 s nevyvinutým autopódiem (pravá končetina) a s otevřenou hrudní a břišní dutinou.



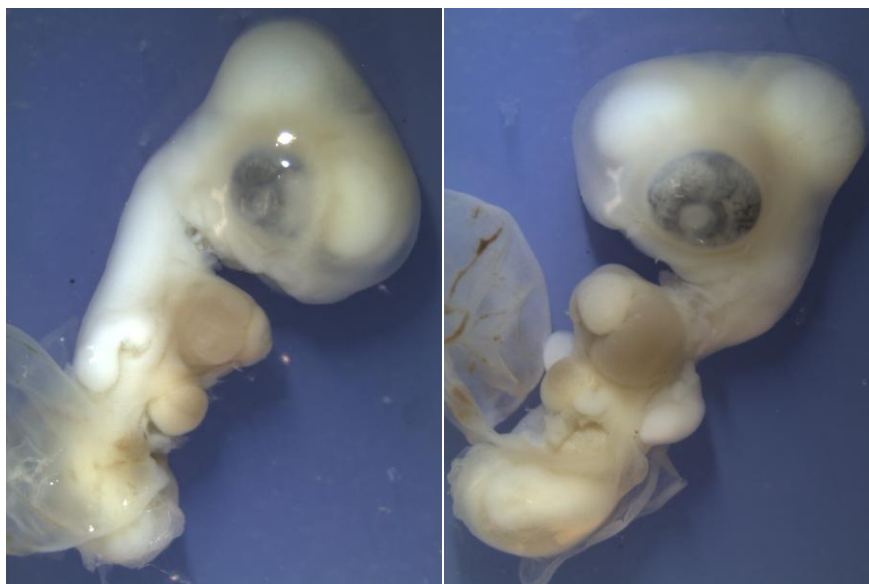
**Obrázek 17:** Embryo MP 154 - hydrocefalus



**Obrázek 18:** Embryo MP 154 - jednostranný rozštěp rtu

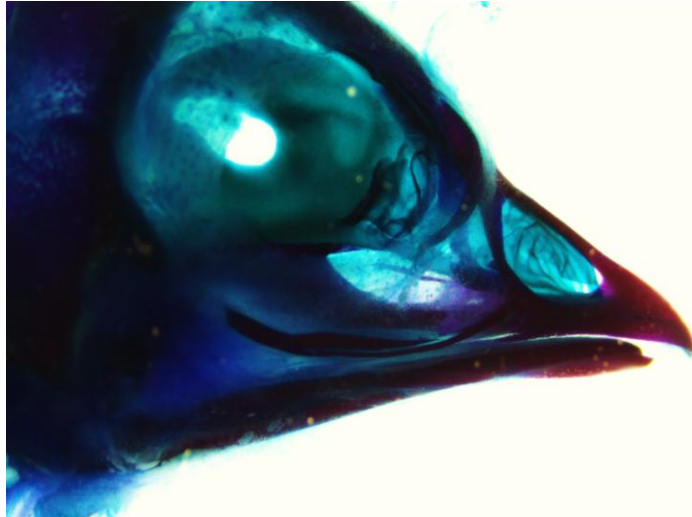
Embryo MP 155 zemřelo také ve stádiu 29. Vzhledem k začínajícímu rozkladu nebylo odebráno a dále zpracováno. Nalezla jsem u něj mikrooftalmii (pravé oko menší než levé) a otevřené obě dutiny.

U embrya MP 158 jsem shledala abnormální morfologii mozku, opět mikrooftalmii (pravé oko menší) a také neuzavřenou hrudní a břišní dutinu.



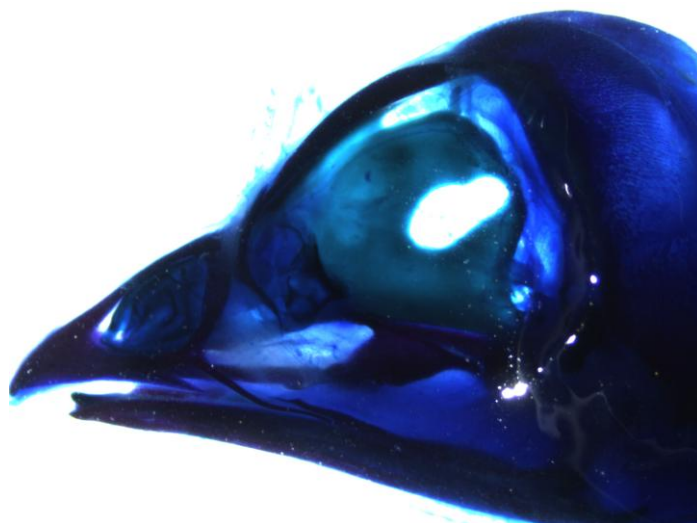
**Obrázek 19:** Embryo MP 158 s abnormálním mozkiem, mikrooftalmií, otevřenou břišní a hrudní dutinou.

Do embrya MP 57 jsem neinjektovala follistatin, ale jen samotnou Trypanovou modř. I přesto jsem na tomto kuřeti shledala absenci peří v koutcích úst, abnormální quadratojugální kost a kratší mandibulu. Vysvětluji si to opět poškozením embrya při injektáži.



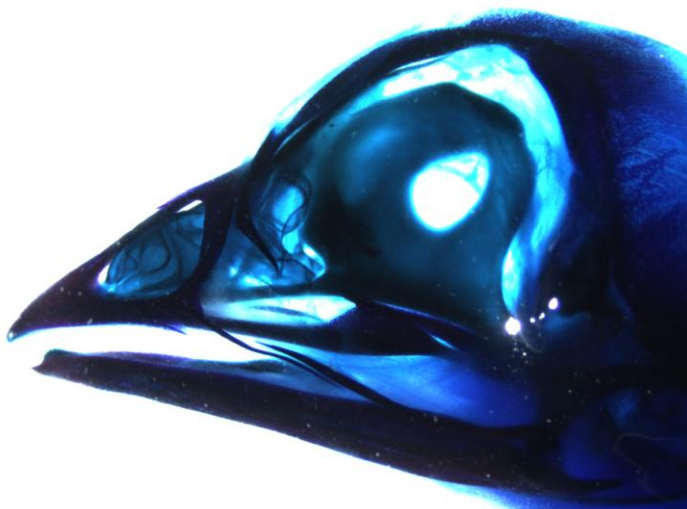
**Obrázek 20:** Obarvená lebka kuřete – MP 57. Abnormální quadratojugální kost, kratší mandibula.

Po obarvení skeletu kuřete MP 139 jsem zjistila kratší dolní čelist. Neinjektovala jsem ovšem follistatin, nýbrž jsem na několika vzorcích testovala chemikálii chordin. Pravděpodobně právě tato látka způsobila zakrnění mandibuly.



**Obrázek 21:** Obarvená lebka kuřete – MP 139. Kratší mandibula.

Dalším kuřetem, na kterém jsem testovala chordin, bylo MP 147. U tohoto vzorku jsem po obarvení skeletu zaznamenala delší maxilu, než je obvyklé.



**Obrázek 22:** Obarvená lebka kuřete – MP 147. Abnormální maxila.

Embryo MP 168 má patrové ploténky od sebe vzdálené více, než je normální. Pravděpodobně to bylo způsobeno vlivem follistatinu.

Embryo MP 170 je zatím posledním postiženým kuřetem. Po odebrání jsem u něj pozorovala hydrocefalus (tedy neuzavřenou lebeční klenbu). Jinak bylo toto kuře fenotypově normální.

## 4 Závěry

Při studiu literatury jsem zjistila, že vývoj obličeje je velice komplikovaný proces, během kterého poměrně snadno může dojít k tvorbě vývojových vad. Každá žena by se tedy měla v průběhu těhotenství vyvarovat fyzické zátěže, chránit se před nemocemi, nebrat zbytečné léky, nepít alkohol, ani nepožívat jiné návykové látky. Problém vidím v tom, že nejdůležitějším obdobím pro vývoj obličeje jsou první týdny těhotenství a v této době většina budoucích maminek neví, že jsou těhotné. Samozřejmě jiným případem je genetická dispozice, kterou matka nemůže ovlivnit.

Pokud se ovšem dítě narodí s rozštěpem (jak rtu, patra nebo tváře) nebo s vadou nosu, není to pro dnešní medicínu velký problém. Poruchy jsou operabilní a dítě může vést normální život. Jestliže se plastika obličejové vady neprovede, co nejdříve po narození, je možné ji provést i v pozdějším věku, kdy již nedochází ke změnám morfologie obličeje (tj. zhruba ve věku dvaceti let).

Mezi mými cíly bylo vytvoření článku o follistatinu pro internet v českém jazyce a dále připravit výukový materiál o pitvě kuřete pro studenty VFU v Brně. Nyní je tento článek o follistatinu dostupný na následující webové stránce: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Follistatin> a fotodokumentace z pitvy, která je přiložena v příloze, je přístupná studentům na stránkách VFU: [www.vfu.cz](http://www.vfu.cz).

V praktické části jsem se zaměřila na průkaz, zda bílkovina follistatin může ovlivnit vývoj maxily. Vzhledem k malému množství výsledků nemohu

s jistotou tvrdit, že follistatin způsobuje rozštěpové vady. Během experimentu jsem dospěla k závěru, že nejvhodnější pro mikroinjektáž follistatinu jsou kuřecí embrya ve stádiu 16 – 18. Embrya ve stádiu 14 a 15 při vyšší koncentraci, než je 90  $\mu\text{l/ml}$  většinou umírají.

Ze 171 nainjektovaných embryí bylo možné odebrat pouze 25 a to z toho důvodu, že další kuřata umřela v raném stádiu vývoje, a tudíž na nich nebylo možné blíže pozorovat vady. Příčinou velké úmrtnosti pravděpodobně bylo poškození embrya při injektáži, zanesení infekce do vajíčka, embryo rovněž špatně snáší vyšší koncentrace neutrální červeně nebo samotnou chemickou látku.

Ve výzkumu zabývajícím se vlivem follistatinu a chordinu na embryonální vývoj plánuji nadále pokračovat.



## Seznam použité literatury

MALÍNSKÝ, J. Histologie a embryologie orofaciální oblasti. Skripta pro studenty. Olomouc: Vydavatelství Univerzity Palackého, 1995.

VOKURKA, M., HUGO, J. a kolektiv. Velký lékařský slovník. 9. aktualizované vydání. Praha: MAXDORF s.r.o. Edice JESSENIUS, 2009.

DVOŘÁK, Z. Výskyt a riziko vzniku [online]. Na webových stránkách Operativa [online]. Cit. 9.1.2011. Dostupné z URL: <http://www.operativa.cz/modules.php?name=News&file=article&sid=131>.

DVOŘÁK, Z. Rozštěpy [online]. Na webových stránkách Operativa [online]. Cit. 6.1.2011. Dostupné z URL: <http://www.operativa.cz>.

HAMBURGER, V., HAMILTON, H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. WILEY-LISS, INC., 1993. Reprinted from the Journal of Morphology Vol. 88, No. 1, January 1951.

MOORE, K. L., PERSAUD, T. V. N. The developing human. 8th Edition. SAUNDERS ELSEVIER, 2003.

PHILIPS, D. J., DE KRETZER, D. M. Follistatin: A multifunctional Regulatory Protein. By Academic Press, 1998.

Wikipedia: internetová encyklopedie [online]. Cit. 20. 9. 2010. Dostupné z URL: <http://en.wikipedia.org/wiki/Follistatin>.

LEE, S., MCPHERRON, A. C. Regulation of myostatin activity and muscle growth [online]. In Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America = PNAS [online]. Cit. 29.12. 2010.

Dostupné z URL: <http://www.pnas.org/content/98/16/9306.longsec-1>.

## **Zdroje použitého obrazového materiálu**

[1] MOORE, K. L., PERSAUD, T. V. N. The developing human. 8th Edition. SAUNDERS ELSEVIER, 2003.

[2] LEE, S., MCPHERRON, A. C. Regulation of myostatin activity and muscle growth [online]. In Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America = PNAS [online]. Cit. 29.12. 2010.

Dostupné z URL: <http://www.pnas.org/content/98/16/9306.longsec-1>.

[3] CEBRA-THOMAS, J. Developmental Biology Labs [online], 2004.

Cit. 10.1.2011. Dostupné z URL:

[http://www.swarthmore.edu/NatSci/sgilber1/DB\\_lab/Chick/Chick\\_web\\_pages/EBChickEmbryos%20Final/EBChickEmbryos\\_dev.html](http://www.swarthmore.edu/NatSci/sgilber1/DB_lab/Chick/Chick_web_pages/EBChickEmbryos%20Final/EBChickEmbryos_dev.html).

[4] HAMBURGER, V., HAMILTON, H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. WILEY-LISS, INC., 1993. Reprinted from the Journal of Morphology Vol. 88, No. 1, January 1951.

Ostatní použitá fotodokumentace pochází z vlastních zdrojů.

## **Přílohy**

### **Seznam příloh:**

1. Tabulka použitých koncentrací follistatinu a stádií embryí
2. Fotodokumentace z pitvy kuřete

**Příloha č. 1 – Tabulka použitých koncentrací follistatinu a  
chordinu u jednotlivých vzorků embryí**

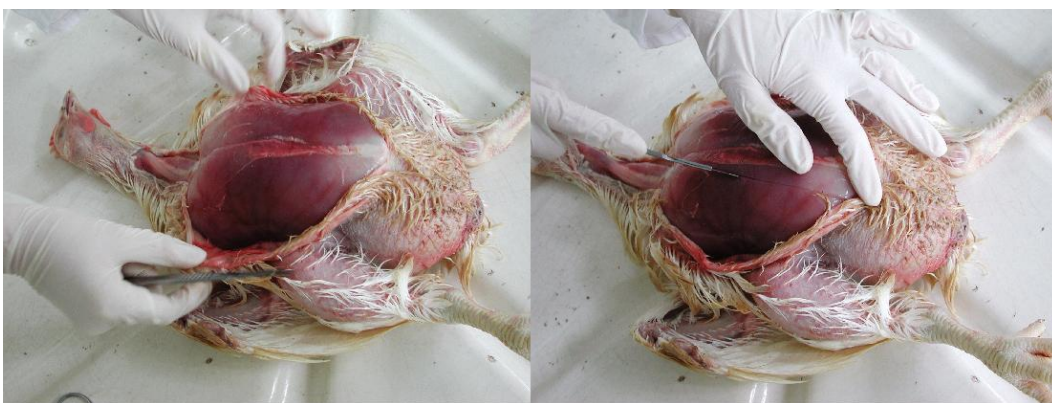
## **Příloha č. 2 – Fotodokumentace pitvy kuřete**



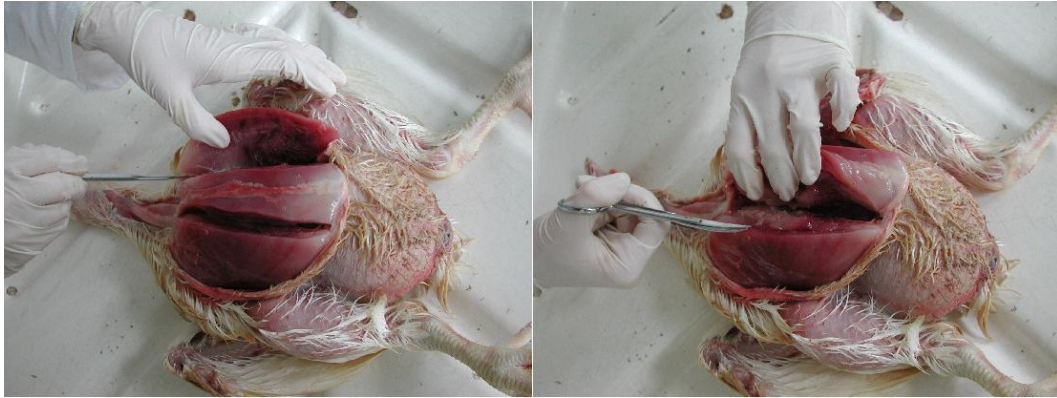
**Obrázek 1:** Rozstřihávání kůže na hrudním koši



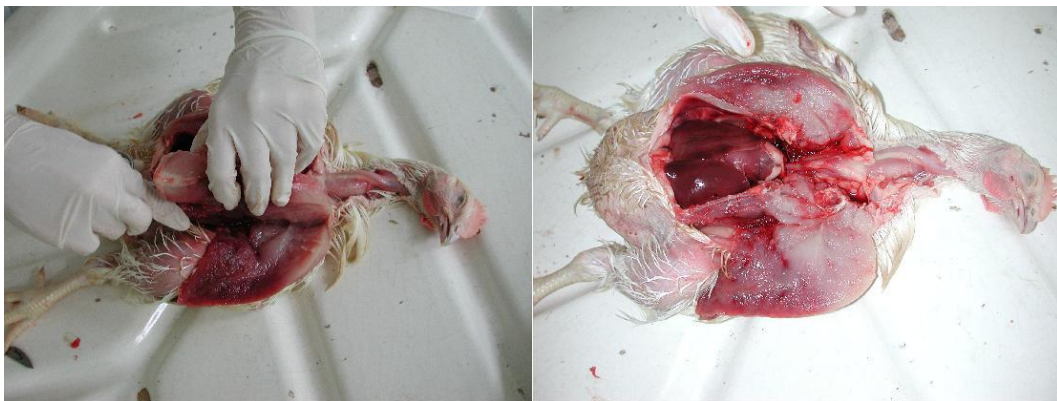
**Obrázek 2:** Oddělování kůže od prsních svalů



**Obrázek 3:** Vyřezávání hrudní kosti (carina)



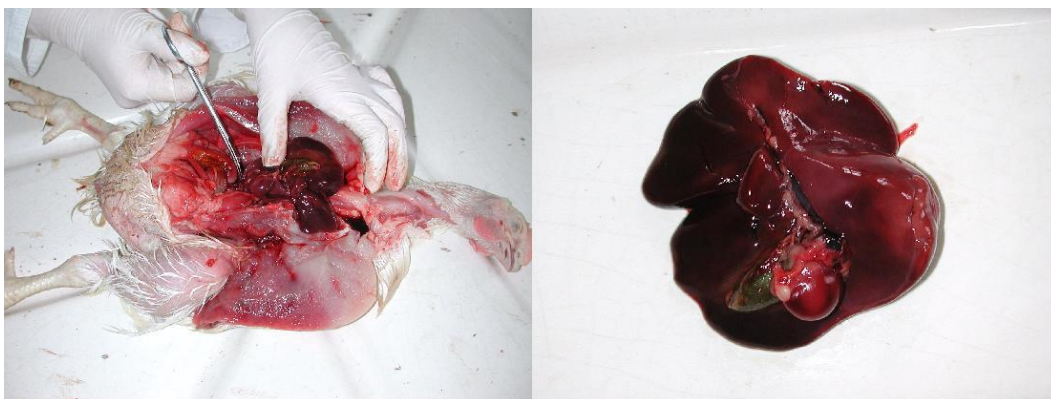
**Obrázek 4:** Přestřihávání žebber



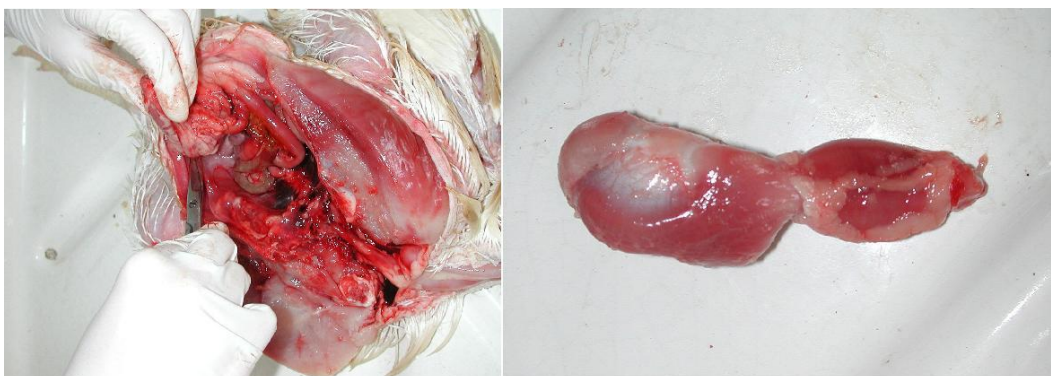
**Obrázek 5:** Otevření hrudní dutiny vyjmutím hrudní kosti



**Obrázek 6:** Srdce



**Obrázek 7:** Játra, žlučník, slezina

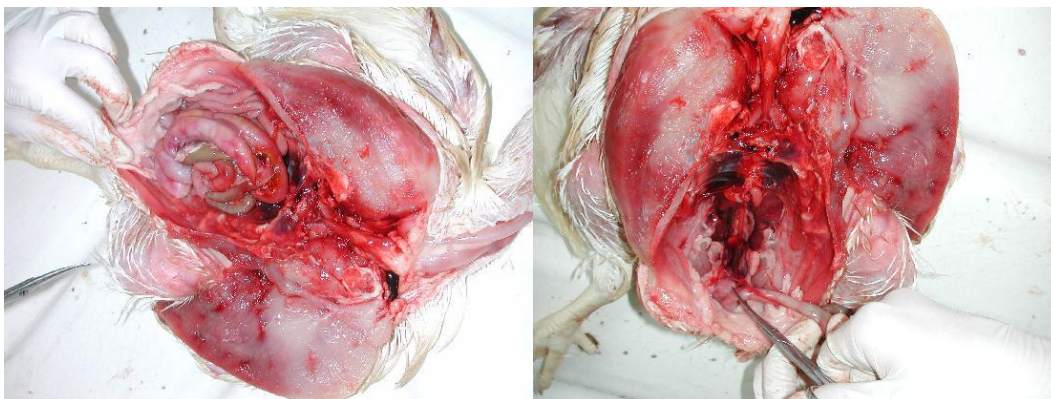


**Obrázek 8:** Žaludek



**Obrázek 9:** Podélné rozstříhnutí žaludku

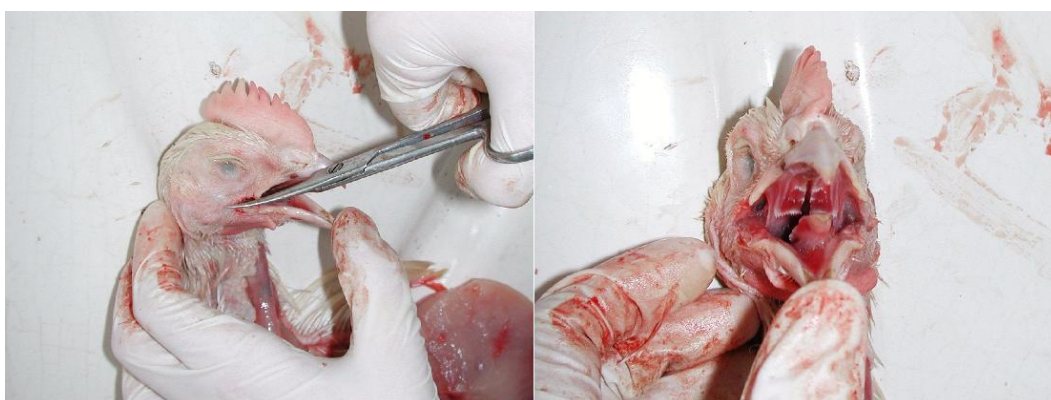




**Obrázek 10:** Střeva



**Obrázek 11:** Vlevo střeva, vpravo profil hlavy zdravého kohoutka



**Obrázek 12:** Tvrdé patro

Označení	Datum injektáže	Koncentrace follistatinu	Další složky roztoku	Stáří embryí při aplikaci	Datum odběru	Fixace	Fenotyp
MP 1	25.3.2010	83,3 µg/ml	Trypanová modř, PBS	24 somitů - st. 15	26.3.2010		
MP 2	25.3.2010	83,3 µg/ml	Trypanová modř, PBS	25 somitů - st. 15	26.3.2010		
MP 3	25.3.2010	83,3 µg/ml	Trypanová modř, PBS	25 somitů - st. 15	26.3.2010		
MP 4	25.3.2010	83,3 µg/ml	Trypanová modř, PBS	26 somitů - st. 15	26.3.2010		
MP 5	25.3.2010	83,3 µg/ml	Trypanová modř, PBS	24 somitů - st. 15	26.3.2010		
MP 6	25.3.2010	83,3 µg/ml	Trypanová modř, PBS	25 somitů - st. 15	26.3.2010		
MP 7	25.3.2010	83,3 µg/ml	Trypanová modř, PBS	25 somitů - st. 15	26.3.2010		
MP 8	25.3.2010	83,3 µg/ml	Trypanová modř, PBS	24 somitů - st. 15	26.3.2010		
MP 9	25.3.2010	83,3 µg/ml	Trypanová modř, PBS	25 somitů - st. 15	26.3.2010		
MP 10	25.3.2010	83,3 µg/ml	Trypanová modř, PBS	23 somitů - st. 14	9.4.2010	100% etanol	normální
MP 11	25.3.2010	83,3 µg/ml	Trypanová modř, PBS	24 somitů - st. 15	26.3.2010		
MP 12	1.4.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	25 somitů - st. 15	9.4.2010		
MP 13	1.4.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	24 somitů - st. 15	9.4.2010		
MP 14	1.4.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	23 somitů - st. 14	9.4.2010		
MP 15	1.4.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	23 somitů - st. 14	9.4.2010		
MP 16	1.4.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	24 somitů - st. 15	6.4.2010		
MP 17	1.4.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	24 somitů - st. 15	9.4.2010		
MP 18	1.4.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	25 somitů - st. 15	15.4.2010		
MP 19	1.4.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	23 somitů - st. 14	9.4.2010		
MP 20	1.4.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	23 somitů - st. 14	9.4.2010		
MP 21	1.4.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	24 somitů - st. 15	15.4.2010	100% etanol	otevřená břišní a hrudní dutina
MP 22	1.4.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	24 somitů - st. 15	9.4.2010		
MP 23	1.4.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	24 somitů - st. 15	15.4.2010		

Označení	Datum injektáže	Koncentrace follistatinu	Další složky roztoku	Stáří embryí při aplikaci	Datum odběru	Fixace	Fenotyp
MP 24	1.4.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	24 somitů - st. 15	9.4.2010		
MP 25	15.4.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	25 somitů - st. 15	16.4.2010		
MP 26	15.4.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	24 somitů - st. 15	16.4.2010		
MP 27	15.4.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	24 somitů - st. 15	20.4.2010		
MP 28	15.4.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	24 somitů - st. 15	16.4.2010		
MP 29	15.4.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	24 somitů - st. 15	19.4.2010		
MP 30	15.4.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	24 somitů - st. 15	16.4.2010		
MP 31	15.4.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	25 somitů - st. 15	17.4.2010		
MP 32	15.4.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	24 somitů - st. 15	17.4.2010		
MP 33	15.4.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	24 somitů - st. 15	27.4.2010	100% etanol	normální
MP 34	15.4.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	24 somitů - st. 15	16.4.2010		
MP 35	29.4.2010	1 mg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 18	13.5.2010	100% etanol	normální
MP 36	29.4.2010	1 mg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 18	6.5.2010		
MP 37	29.4.2010	99,0 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 18	2.5.2010		
MP 38	29.4.2010	99,0 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 18	2.5.2010		
MP 39	29.4.2010	99,0 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 18	10.5.2010	100% etanol	normální
MP 40	29.4.2010	99,0 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 18	2.5.2010		
MP 41	29.4.2010	99,0 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 18	2.5.2010		
MP 42	29.4.2010	99,0 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 18	2.5.2010		
MP 43	29.4.2010	99,0 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 17	9.5.2010		
MP 44	29.4.2010	99,0 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 18	2.5.2010		
MP 45	29.4.2010	99,0 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 18	6.5.2010		
MP 46	29.4.2010	99,0 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 18	2.5.2010		
MP 47	29.4.2010	99,0 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 17	2.5.2010		
MP 48	29.4.2010	99,0 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 17	2.5.2010		
MP 49	29.4.2010	99,0 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 17	2.5.2010		

Označení	Datum injektáže	Koncentrace follistatinu	Další složky roztoku	Stáří embryí při aplikaci	Datum odběru	Fixace	Fenotyp
MP 50	29.4.2010	99,0 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 18	2.5.2010		
MP 51	29.4.2010	99,0 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 18	2.5.2010		
MP 52	29.4.2010	99,0 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 17	2.5.2010		
MP 53	29.4.2010	99,0 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 17	2.5.2010		
MP 54	13.5.2010	-	Trypanová modř	st. 18	16.5.2010		
MP 55	13.5.2010	-	Trypanová modř	st. 18	16.5.2010		
MP 56	13.5.2010	-	Trypanová modř	st. 18	25.5.2010	100% etanol	normální
MP 57	13.5.2010	-	Trypanová modř	st. 18	25.5.2010	100% etanol	poškozena kůže, v koutcích absence peří, abnormální quadratojugální kost, kratší mandibula
MP 58	13.5.2010	-	Trypanová modř	st. 18	25.5.2010	100% etanol	normální
MP 59	13.5.2010	-	Trypanová modř	st. 18	25.5.2010	100% etanol	normální
MP 60	13.5.2010	-	Trypanová modř	st. 18	16.5.2010		
MP 61	13.5.2010	-	Trypanová modř	st. 17	20.5.2010		
MP 62	13.5.2010	-	Trypanová modř	25 somitů - st. 15	23.5.2010		
MP 63	13.5.2010	-	Trypanová modř	st. 18	20.5.2010		
MP 64	13.5.2010	-	Trypanová modř	st. 17	20.5.2010		
MP 65	10.6.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	24 somitů - st. 15	16.6.2010		
MP 66	10.6.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	25 somitů - st. 15	16.6.2010		
MP 67	10.6.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 17	16.6.2010		
MP 68	10.6.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 17	16.6.2010		
MP 69	10.6.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	25 somitů - st. 15	16.6.2010		

Označení	Datum injektáže	Koncentrace follistatinu	Další složky roztoku	Stáří embryí při aplikaci	Datum odběru	Fixace	Fenotyp
MP 70	10.6.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	25 somitů - st. 15	16.6.2010		
MP 71	10.6.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	24 somitů - st. 15	16.6.2010		
MP 72	10.6.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	24 somitů - st. 15	16.6.2010		
MP 73	10.6.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	25 somitů - st. 15	16.6.2010		
MP 74	24.6.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	24 somitů - st. 15	26.6.2010		
MP 75	24.6.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	24 somitů - st. 15	26.6.2010		
MP 76	24.6.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 17	26.6.2010		
MP 77	24.6.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 18	6.7.2010	100% etanol	normální
MP 78	24.6.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	25 somitů - st. 15	26.6.2010		
MP 79	24.6.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 20	26.6.2010		
MP 80	24.6.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	25 somitů - st. 15	26.6.2010		
MP 81	24.6.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	24 somitů - st. 15	26.6.2010		
MP 82	24.6.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	24 somitů - st. 15	26.6.2010		
MP 83	24.6.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	24 somitů - st. 15	26.6.2010		
MP 84	24.6.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 17	26.6.2010		
MP 85	24.6.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	24 somitů - st. 15	26.6.2010		
MP 86	14.9.2010	92,6 µg/ml	Trypanová modř, PBS, Fugene	26 somitů - st. 15	21.9.2010		
MP 87	14.9.2010	92,6 µg/ml	Trypanová modř, PBS, Fugene	25 somitů - st. 15	21.9.2010		
MP 88	14.9.2010	92,6 µg/ml	Trypanová modř, PBS, Fugene	25 somitů - st. 15	21.9.2010		
MP 89	14.9.2010	92,6 µg/ml	Trypanová modř, PBS, Fugene	26 somitů - st. 15	21.9.2010		
MP 90	14.9.2010	92,6 µg/ml	Trypanová modř, PBS, Fugene	27 somitů - st. 15	21.9.2010		

Označení	Datum injektáže	Koncentrace follistatinu	Další složky roztoku	Stáří embryí při aplikaci	Datum odběru	Fixace	Fenotyp
MP 91	14.9.2010	92,6 µg/ml	Trypanová modř, PBS, Fugene	26 somitů - st. 15	21.9.2010		
MP 92	14.9.2010	92,6 µg/ml	Trypanová modř, PBS, Fugene	25 somitů - st. 15	21.9.2010		
MP 93	14.9.2010	92,6 µg/ml	Trypanová modř, PBS, Fugene	30 somitů - st. 17	21.9.2010		
MP 94	14.9.2010	92,6 µg/ml	Trypanová modř, PBS, Fugene	24 somitů - st. 15	21.9.2010		
MP 95	14.9.2010	92,6 µg/ml	Trypanová modř, PBS, Fugene	25 somitů - st. 15	21.9.2010		
MP 96	30.9.2010	94,3 µg/ml	Trypanová modř, PBS, Fugene	26 somitů - st. 15	5.10.2010		
MP 97	30.9.2010	94,3 µg/ml	Trypanová modř, PBS, Fugene	26 somitů - st. 15	5.10.2010		
MP 98	30.9.2010	94,3 µg/ml	Trypanová modř, PBS, Fugene	26 somitů - st. 15	12.10.2010	100% etanol	normální
MP 99	30.9.2010	94,3 µg/ml	Trypanová modř, PBS, Fugene	26 somitů - st. 15	7.10.2010		
MP 100	30.9.2010	94,3 µg/ml	Trypanová modř, PBS, Fugene	26 somitů - st. 15	7.10.2010		
MP 101	30.9.2010	94,3 µg/ml	Trypanová modř, PBS, Fugene	26 somitů - st. 15	12.10.2010	100% etanol	normální
MP 102	30.9.2010	94,3 µg/ml	Trypanová modř, PBS, Fugene	26 somitů - st. 15	5.10.2010		
MP 103	30.9.2010	94,3 µg/ml	Trypanová modř, PBS, Fugene	26 somitů - st. 15	5.10.2010		

Označení	Datum injektáže	Koncentrace follistatinu	Další složky roztoku	Stáří embryí při aplikaci	Datum odběru	Fixace	Fenotyp
MP 104	30.9.2010	94,3 µg/ml	Trypanová modř, PBS, Fugene	26 somitů - st. 15	5.10.2010		
MP 105	30.9.2010	94,3 µg/ml	Trypanová modř, PBS, Fugene	26 somitů - st. 15	5.10.2010		
MP 106	30.9.2010	94,3 µg/ml	Trypanová modř, PBS, Fugene	26 somitů - st. 15	7.10.2010		
MP 107	30.9.2010	94,3 µg/ml	Trypanová modř, PBS, Fugene	st. 18	5.10.2010		
MP 108	30.9.2010	94,3 µg/ml	Trypanová modř, PBS, Fugene	28 somitů - st. 16	5.10.2010		
MP 109	30.9.2010	94,3 µg/ml	Trypanová modř, PBS, Fugene	26 somitů - st. 15	12.10.2010	100% etanol	normální
MP 110	30.9.2010	94,3 µg/ml	Trypanová modř, PBS, Fugene	26 somitů - st. 15	5.10.2010		
MP 111	14.10.2010	476,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS, kys. retinová	st. 17	18.10.2010		
MP 112	14.10.2010	476,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS, kys. retinová	24 somitů - st. 15	18.10.2010		
MP 113	14.10.2010	476,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS, kys. retinová	26 somitů - st. 15	18.10.2010		
MP 114	14.10.2010	476,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS, kys. retinová	25 somitů - st. 15	18.10.2010		
MP 115	14.10.2010	476,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS, kys. retinová	25 somitů - st. 15	18.10.2010		
MP 116	14.10.2010	476,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS, kys. retinová	25 somitů - st. 15	18.10.2010		

Označení	Datum injektáže	Koncentrace follistatinu	Další složky roztoku	Stáří embryí při aplikaci	Datum odběru	Fixace	Fenotyp
MP 117	14.10.2010	476,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS, kys. retinová	25 somitů - st. 15	15.10.2010		
MP 118	14.10.2010	476,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS, kys. retinová	25 somitů - st. 15	18.10.2010		
MP 119	14.10.2010	476,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS, kys. retinová	25 somitů - st. 15	18.10.2010		
MP 120	14.10.2010	476,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS, kys. retinová	26 somitů - st. 15	18.10.2010		
MP 121	28.10.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 23	3.11.2010		
MP 122	28.10.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 24	3.11.2010		
MP 123	28.10.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 24	3.11.2010		
MP 124	28.10.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 25	3.11.2010		
MP 125	28.10.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 24	3.11.2010		
MP 126	28.10.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 24	29.10.2010		
MP 127	28.10.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 24	3.11.2010		
MP 128	28.10.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 24	3.11.2010		
MP 129	28.10.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 24	3.11.2010		
MP 130	28.10.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 24	29.10.2010		
MP 131	28.10.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 24	3.11.2010		
MP 132	28.10.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 24	29.10.2010		
MP 133	28.10.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 24	3.11.2010		
MP 134	28.10.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 24	3.11.2010		
MP 135	28.10.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 24	3.11.2010		
MP 136	25.11.2010	-	Chordin (190,5 µg/ml), Trypanová modř	st. 18	3.12.2010		



Označení	Datum injektáže	Koncentrace follistatinu	Další složky roztoku	Stáří embryí při aplikaci	Datum odběru	Fixace	Fenotyp
MP 137	25.11.2010	-	Chordin (190,5 µg/ml), Trypanová modř	st. 17	3.12.2010		
MP 138	25.11.2010	-	Chordin (190,5 µg/ml), Trypanová modř	st. 17	29.11.2010		
MP 139	25.11.2010	-	Chordin (190,5 µg/ml), Trypanová modř	st. 16	7.12.2010	100% etanol	kratší spodní čelist
MP 140	25.11.2010	-	Chordin (190,5 µg/ml), Trypanová modř	st. 16	3.12.2010		
MP 141	25.11.2010	-	Chordin (190,5 µg/ml), Trypanová modř	st. 17	9.12.2010		
MP 142	25.11.2010	-	Chordin (190,5 µg/ml), Trypanová modř	st. 19	29.11.2010		
MP 143	25.11.2010	-	Chordin (190,5 µg/ml), Trypanová modř	st. 17	29.11.2010		
MP 144	25.11.2010	-	Chordin (190,5 µg/ml), Trypanová modř	st. 18	7.12.2010	100% etanol	normální

Označení	Datum injektáže	Koncentrace follistatinu	Další složky roztoku	Stáří embryí při aplikaci	Datum odběru	Fixace	Fenotyp
MP 145	25.11.2010	-	Chordin (190,5 µg/ml), Trypanová modř	st. 17	3.12.2010	100% etanol	normální
MP 146	25.11.2010	-	Chordin (190,5 µg/ml), Trypanová modř	st. 18	7.12.2010	100% etanol	normální
MP 147	25.11.2010	-	Chordin (190,5 µg/ml), Trypanová modř	st. 18	7.12.2010	100% etanol	abnormální maxila - delší
MP 148	9.12.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 17	13.12.2010		
MP 149	9.12.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 17	13.12.2010		
MP 150	9.12.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 21	17.12.2010		otevřená břišní a hrudní dutina
MP 151	9.12.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 18	13.12.2010		
MP 152	9.12.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 17	13.12.2010		
MP 153	9.12.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 17	17.12.2010		otevřená břišní a hrudní dutina
MP 154	9.12.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 17	17.12.2010	4% formaldehyd	otevřená břišní a hrudní dutina, hydrocefalus, pravé křídlo nevyvinuté autopódium, rozštěp na pravé straně

Označení	Datum injektáže	Koncentrace follistatinu	Další složky roztoku	Stáří embryí při aplikaci	Datum odběru	Fixace	Fenotyp
MP 155	9.12.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 17	17.12.2010		otevřená břišní a hrudní dutina, pravé oko menší
MP 156	9.12.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 18	17.12.2010		
MP 157	9.12.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 17	13.12.2010		
MP 158	9.12.2010	96,2 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 17	17.12.2010	4% formaldehyd	otevřená hrudní a břišní dutina, pravé oko menší, abnormální mozek
MP 159	15.1.2011	322,6 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 14	27.1.2011		
MP 160	15.1.2011	322,6 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 14	16.1.2011		
MP 161	15.1.2011	322,6 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 14	20.1.2011		
MP 162	15.1.2011	322,6 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 14	27.1.2011		
MP 163	15.1.2011	322,6 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 14	16.1.2011		
MP 164	15.1.2011	322,6 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 15	16.1.2011		
MP 165	15.1.2011	322,6 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 15	20.1.2011		
MP 166	15.1.2011	322,6 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 15	16.1.2011		
MP 167	15.1.2011	322,6 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 16	16.1.2011		
MP 168	15.1.2011	322,6 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 16	27.1.2011	100% etanol	patrové ploténky od sebe mírně vzdálené
MP 169	15.1.2011	322,6 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 16	16.1.2011		
MP 170	15.1.2011	322,6 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 15	27.1.2011	100% etanol	hydrocefalus
MP 171	15.1.2011	322,6 µg/ml	Trypanová modř, PBS	st. 16	16.1.2011		