



Akademie věd České republiky

Teze doktorské disertační práce
k získání vědeckého titulu „doktor věd“
ve skupině věd molekulárně biologických a lékařských

Příčiny vzniku vrozených vad, jejich léčba a prevence

Komise pro obhajoby doktorských disertací v oboru biomedicína

MUDr. Miroslav Peterka, CSc.

Ústav experimentální medicíny AVČR, Praha

Praha, září 2005

Obsah

1. Summary.....	3
2. Úvod.....	5
3. Příčiny vzniku vrozených vad.....	5
4. Základní podmínky vzniku vývojového poškození.....	7
4.1. Kritická perioda.....	7
4.2. Sensitivní perioda.....	7
4.3. Závislost na farmakokinetice a biotransformaci látky.....	7
5. Základní projevy vývojového poškození.....	7
5.1. Letalita – prenatální ztráty.....	8
5.2. Velké vrozené vady – tvarová odchylka od normy.....	8
5.2.1 Prenatální ztráty plodů s velkou vrozenou vadou.....	9
5.3. Malé vrozené vady – manifestující se funkčním defektem.....	9
5.4. Intrauterinní růstová retardace a nízká porodní váha.....	10
6. Testování embryotoxicity a detekce teratogenů.....	10
6.1. Testy na laboratorních savcích.....	11
6.2. Alternativní testy.....	11
6.3. Testování na zárodku kuřete – metoda CHEST.....	12
7. Residuální teratogenese a epidemiologie vrozených vad.....	12
7.1. Incidence VV a epidemiologie rozštěpů.....	13
8. Sex ratio.....	14
8.1. Prenatální sex ratio.....	14
8.2. Novorozenecké sex ratio a zranitelnost mužských embryí/fetů.....	15
9. Následky havárie v Černobylu na prenatální populaci v ČR.....	15
9.1. Radioaktivní mrak a celotělová radioaktivita	16
9.2. Novorozenecké sex ratio – listopad 1986.....	16
9.3. Prenatální kritická perioda účinku radiace.....	17
9.4. Hypotéza a příčinách selektivních ztrát mužských plodů.....	17
10. Možnosti prevence vrozených vad.....	17
10.1. Rodiny s genetickým rizikem.....	18
10.2. Rodiny bez genetického rizika.....	19
11. Závěry.....	20
12. Použitá literatura.....	21
13. Seznam vybraných impaktovaných publikací autora.....	29

1. Summary

The dissertation is engaged in problems of experimental and clinical teratology with the aim of contributing to knowledge on the etiopathogenesis of developmental defects and their prevention. Only a small part of inborn defects in man is explained either by prenatal exposure to a harmful external factor (15% of cases) or by genetic reasons (20% of cases). Most developmental defects (65%) are thought to result from prenatal exposure to the combined effect of several sub-threshold doses of external factors that act either simultaneously or sequentially; a genetic predisposition is presumed in some of these cases. In the last century, several very dangerous teratogens were detected, such as the rubella virus in 1941, thalidomide in 1959-1961, and accutane in 1982. After the thalidomide affair, many countries began a careful and systematic recording of the numbers of congenital malformations. A national monitoring system of congenital malformations was established in the Czech Republic in 1961. However, although the amount of toxic chemicals in the environment has dramatically increased during the last decades, the incidence of malformations in newborns has remained low. Does this mean that thalidomide and accutane were extremely rare exceptions, or is the incidence of congenital malformations, when considered alone, not a reliable indicator of environmental risk? This dissertation firstly surveys the basic manifestations of developmental damage (lethality, growth retardation and malformation) and discusses the problem of dose-response dependence in teratogenesis. It is documented that relying upon only the incidence of malformed newborns (so-called residual teratogenesis) is not sufficient for monitoring environmental risk. Even the number of spontaneous abortions (prenatal deaths) does not represent a more reliable indicator: a precise record of the number of abortions is not available and an unknown proportion of such abortions results from purely maternal factors. The newborn sex ratio (birth rate of boys to girls) is a very stable parameter in healthy populations and is known to decrease due to increased environmental stress. A vulnerability to prenatal damage leading to abortion is greater in male embryos (or fetuses) than in females. A decrease of the male birth fraction has been reported after prenatal exposure to environmental chemical factors. A question rose whether the low male birth fraction can also indicate exposition to a physical factor - low radiation. After the explosion in the Chernobyl power station on April 26, 1986, an increase in whole body radioactivity was detected in inhabitants of our country. The following hypothesis was tested: the male birth fraction decreased in our country in consequence of the increased radioactivity after the Chernobyl disaster. The absolute number of newborn boys and girls was determined in each 600 consecutive month from 1950 to 1999. In 599 months, there were always more newborn boys than girls. The only exception was November 1986, when the number of newborn boys significantly decreased. We can speculate on possible reasons for the miscarriages after the Chernobyl explosion. One reason might be the radionuclide iodine¹³¹, whose concentration in radioactive clouds was very high, and which can cause fetal death when administered to pregnant women after the eighth week of pregnancy. These data strongly support using of the newborn sex ratio as a further standard tool of evaluation of reproduction quality. Combined analyses of the incidence of newborn malformations, the incidence of spontaneous abortions, the number of stillbirths, intrauterine growth retardation and the newborn sex ratio will help to compensate for the imperfections associated with each of these parameters individually and will provide a more complete understanding of the extent of prenatal risk induced by environmental factors.

The experimental research was focused to the origin of developmental disturbances induced by either external or genetic factors in two models - chick embryogenesis and mouse odontogenesis, respectively. In the chick embryo, we developed a screening test evaluating exposition to harmful external factors. This original test allows estimation of minimum embryotoxic doses for chemical substances (drugs, harmful chemical and physical factors). Besides, we currently use the developing chick embryo to address specific questions on experimental teratology. Origin of the cleft beak in chick embryos was employed as a model to verify the hypothesis that a sub-threshold dose of an external harmful factor can also induce a developmental disturbance provided it acts repeatedly or in combination with other factors.

The origin of developmental defects induced by genetic factors was investigated in the mouse model: development of tooth anomalies in mutant mice. Firstly, classical data on tooth development in normal mice had to be revisited using computer aided 3D reconstructions. We found that the functional dentition in normal adult mice originates by secondary reduction of the embryonic, more numerous, dental pattern. Apoptosis was involved in the reduction of tooth primordia. We revealed that the large tooth primordium, generally considered as the first molar, is, in fact, a vestigial premolar. This vestige fused with the anterior part of the first molar in normal mice. In contrast, the premolar vestige was not incorporated into the first molar in mouse mutants and its autonomous development gave rise to the supernumerary tooth. In a similar way, the supernumerary upper lateral incisor can arise in human. We documented that the upper lateral incisor in human comprises two components originating in the respective medial nasal and maxillary facial outgrowth. Failing fusion of these components can cause their independent development resulting in duplication of the upper lateral incisor. This anomaly is the most frequent in the patients with cleft lip and/or jaw.

In patients with orofacial developmental disturbances, roentgenometric and anthropometric methods were used to assess the effectiveness of surgical and orthodontic procedures and to evaluate the adequacy of their outcome. Attention was paid to facial growth patterns and their effect on the therapeutic results. In the patients with isolated cleft palate, a shortening of the mandible occurs, being associated with a higher frequency of hypodontia in the lower jaw. This situation was explained in the mouse model: experimentally induced hypoplasia of the lower jaw caused origin of an isolated cleft palate. The correspondence between experimental and clinical findings suggests that the mechanisms involved in the origin of a cleft palate in experimental animals operate also in man.

The results of the experimental and clinical studies summarized and discussed in the present dissertation have contributed to understanding of manifestations of prenatal disturbances at all the population, organism, organ and tissue levels. Such knowledge is a prerequisite for the primary and secondary prevention of developmental defects in human.

2. Úvod

Vrozené vady diagnostikované u novorozenců, či v průběhu dalšího života jedince, jsou trvalá prenatálně vzniklá vývojová poškození, které si jedinec nese po celý život. Spontánně se vrozené vady nemohou vyléčit a proto představují pro zdravotnictví a tím i pro celou společnost obtížně řešitelný problém. Prenatální narušení vývoje zárodku nemusí vyústit jenom ve zjevnou vrozenou vadu. Nelze vyloučit, že se u prenatálně oslabeného jedince v dospělosti snadněji vyčerpají rezervy pro kompenzaci nepříznivých účinků škodlivých faktorů zevního prostředí. To by mohlo vést ke vzniku predispozice pro pozdější onemocnění jako jsou alergie, nádorové bujení či onemocnění oběhové soustavy. U jedinců s rodinnou (dědičnou) zátěží je predispozice pro určitou chorobu evidentní. Případy narození malformovaných dětí jsou známy od nepaměti. Stáří nalezené sošky srostlých dvouhlavých dvojčat je odhadováno na 6500 let př. Kr. Tato soška pravděpodobně představuje nejstarší známý archeologický záznam vrozené monstrosity (Warkany, 1977). To tedy znamená, že se děti s vývojovou vadou rodily již před nástupem průmyslové revoluce a zhoršováním podmínek životního prostředí. Nevíme však, proč a jak vznikaly tyto vývojové vady, zdali spontánně nebo následkem infekce, podvýživy, stresu či z příčin genetických.

3. Příčiny vzniku vrozených vad

V minulém století bylo detekováno několik velmi nebezpečných teratogenů jako **virus zarděnek** v roce 1941 (Gregg, 1941), **thalidomid** v roce 1959-1961 (Lenz, 1961; Mc Bride, 1961; Lenz a Knapp, 1962) nebo **accutane (syntetický analog vitamínu A)** v roce 1982 (Rosa, 1983). Po thalidomidové aféře začalo mnoho zemí pečlivě a systematicky zaznamenávat počty vrozených vad. V České republice byl založen **národní monitorovací systém v roce 1961**. Hlášení o vrozených vadách bylo pro lékaře dobrovolné do roku 1964 a od roku 1965 se stalo povinným (Kučera, 1989). Do národního monitorovacího systému vrozených vad bylo vloženo mnoho nadějí. Věřilo se totiž, že monitorovací systém by mohl pomoci včas detekovat nové nebezpečné faktory zevního prostředí na základě nárůstu počtu vrozených vad nad jejich basální incidenci. Přestože se v posledních desetiletích množství toxických chemikálií v životním prostředí dramaticky zvýšilo, **incidence vrozených vad zůstala prakticky nezměněna** (Peterka et al., 1995; Peterka et al., 1996a; Peterka et al., 2000). Znamená to tedy, že byl thalidomid a accutane pouhou výjimkou, a nebo incidence vrozených vad není vhodným indikátorem zhoršení zevního prostředí?

Vrozené vady se v české populaci registrují asi u 1 - 3% novorozenců. K tomuto číslu se později přidává nejméně 5% dalších vrozených vad, které jsou postupně odhalovány v průběhu vývoje dítěte (Kučera, 1989). Jde hlavně o vady vnitřních orgánů, metabolismu a chování, které při narození dítěte nelze ještě spolehlivě diagnostikovat. Někteří autoři udávají mnohem větší čísla. Výsledek registrace vrozených vad je ovlivněn především tím, které druhy vrozených vad jsou do registrace zařazovány, nejednotnou klasifikací vrozených vad, a v nemalé řadě i důsledností hlášení pediatrů. Tato fakta byla prokázána při detailním monitorování počtu novorozenců s vrozenou vadou přímo v nemocnicích na okrese Zlín za roky 1989-1990. Incidence stejného spektra malformací byla ve srovnání s oficiálním registrem zvýšena 2x na hodnotu 4.5% (Niklová, 1992). Po započtení všech viditelných malformací diagnostikovaných a zaznamenaných pediatrem do 7 dnů po porodu dosahovala incidence vrozených vad až 17.8% (Niklová, 1992)! V maďarských registrech lze například zjistit běžně počet vrozených vad při narození u 13% dětí, neboť jsou započítány i děti s luxací kyčelního kloubu apod. (Peterka a Jelínek, 1989).

Příčiny vzniku vrozených vad se tradičně dělí na **genetické a epigenetické (zevní)**. Soudí se, že genetické faktory se uplatňují při vzniku asi 20% vrozených vad, izolované zevní faktory asi v 10%. U 70% vrozených vad se jednoznačná příčina nenachází. Jedná se zde patrně o kombinaci několika slabších epigenetických a genetických faktorů, tedy o **faktorový komplex**. Z toho vyplývá, že naprostá většina vrozených vad není dědičná (Peterka et al., 1985a; Peterka et al., 1985b; Peterka, 1988).

Zkoumání příčin vzniku vrozených vad se u lidské populace běžně provádí **retrospektivním anamnestickým šetřením**, které má však v některých případech jen omezenou výpovědní hodnotu. Většina strukturálních vrozených vad vzniká během 20.- 60. dne prenatalního vývoje a od této doby uplyne do narození dítěte dalších 220 dní. Po tak relativně dlouhé době může být velmi často validita výpovědi rodičů velice nízká (Peterka, 1988).

Prospektivní studie, kdy je průběh těhotenství po celou dobu pečlivě sledován lékařem, vážnou na jiném faktu. Chceme-li nashromáždit dostatečně velký soubor – např. 100 těhotenství končících narozením dítěte s určitým typem vrozené vady, musíme sledovat 100 000 těhotných, což je v praxi téměř neuskutečnitelné. Proto jsou naše vědomosti o příčinách vzniku vrozených vad u člověka značně kusé a o žádném léčivu dnes neumíme s úplnou jistotou říci, že je zcela neškodné (Peterka a Jelínek, 1989).

Na druhé straně je epidemiologickými metodami nesmírně obtížné objektivně prokázat, že některý lék či jiný zevní faktor vrozené vady skutečně vyvolává. S tímto omezením Brent (2004) udává výčet příčin vzniku vrozených vad následujícím způsobem: 1% léky a záření, 2% mechanické interference (poškození plodových obalů), 3% infekce, 4% chorobný stav matky, 15-20% genetické příčiny a v 65 - 70% jsou příčiny neznámé. Počet vrozených vad prokazatelně vyvolaných léky je tedy relativně velmi malý. Lék je většinou podáván pod kontrolou lékaře v přísně vymezeném dávkovém rozmezí. V tom se zásadně liší od ostatních škodlivých faktorů prostředí. Navíc je třeba mít na mysli, že lék je podáván z důvodů onemocnění matky. Znamená to tedy, že působení léku je zpravidla doprovázeno změnou vnitřních podmínek organismu, například zvýšenou teplotou, přítomností bakteriálního toxinu, popřípadě nechutenstvím a tím i nedostatečnou výživou (Peterka et al., 1994c). Vznik vrozené vady po podávání léku v těhotenství tedy nemusí být vyvolán pouze působením léčiva samotného.

Avšak nebezpečí některých typů léků je jednak v jejich vysokém riziku teratogenního účinku, jednak v jejich indikaci právě gravidním ženám. V případě thalidomidu, který byl určen pro podávání v těhotenství jako tišící prostředek na zklidnění organismu a proti zvracení v těhotenství, mělo jeho podávání za následek narození několika tisíc dětí s VV. Málo se ví o tom, že 40% dětí, jejichž matky užívaly thalidomid během těhotenství, zemřelo ihned po narození (Lenz, 1961). U žijících dětí pak byly zjištěny mnohočetné malformace. Typické malformace vyvolané thalidomidem byly velmi nápadné a týkaly se především horních a dolních končetin. Z široké palety končetinových vad byly nejčastěji zaznamenány **úplné nebo částečné chybění horních končetin** v kombinaci s normálními dolními končetinami. Nejméně časté bylo postižení dolních končetin v kombinaci se zcela normálními horními končetinami.

Ve stínu nápadných končetinových vad se však zapomíná na to, že thalidomid způsoboval **celé spektrum dalších vad**, které postihovaly uši, oči, obličej, CNS, dýchací trubice, srdce, velké cévy a skoro všechny abdominální orgány. Ruffing (1977) uvádí příklad některých vrozených vad, které se netýkaly malformací končetin, v pořadí podle četnosti výskytu diagnostikované u 200 žijících pacientů:

Ztráta sluchu	57
Paralýza nervus abducens (otáčivý oční nerv)	40
Paralýza nervus facialis (lícní nerv)	28
Anotia (chybění ucha)	26
Malformace ledvin	17
Microtia (zmenšený boltec)	15
Hernia inguinální	11
Stenosa až atresia anu	5
Stenoza pyloru	4
Stenoza nebo atresia duodena	2

Všechny malformace vznikly po podávání thalidomidu mezi 34.-50. dnem těhotenství počítáno od prvního dne poslední menstruace (Lenz a Knapp 1962).

Zvlášť závažná situace nastává u **chorobných stavů matek**, kdy je třeba podávat lék po celou dobu těhotenství (epilepsie, diabetes, onemocnění štítné žlázy). U diabetiček je incidence vrozených vad 3x častější než u nediabetiček. Zda je na vině podávaný inzulín, či vysoká glykémie je stále předmětem diskuze. V rozsáhlé maďarské epidemiologické studii bylo u diabetiček zjištěno signifikantní zvýšení vrozených vad ledvin, močového ústrojí, srdečních vad a mnohočetných malformací (Nielsen et al., 2005).

4. Základní podmínky vzniku vývojového poškození

Nepříznivý zevní faktor je schopen vyvolat vývojový defekt tehdy, když se kritická perioda cílového orgánu **překrývá** s periodou sensitivity buněk stejného cílového orgánu pro daný zevní faktor.

4.1. Kritická perioda

Z hlediska individua je **teratogenese jevem prahovým**. Začátek, rozvinutí a finální stav teratogenese závisí na počáteční proporcii poškozených buněk v cílovém orgánu. Každá struktura zárodku je zakládána s určitou buněčnou rezervou. Aby mohl vzniknout vývojový defekt, musí být poškozeno určité kritické množství buněk zárodečné komponenty. Toho nelze dosáhnout v libovolnou dobu, ale zevním faktorem je nutné působit v určitých vývojových stádiích. Tato limitující fáze vývoje, kdy je určitý orgán (zárodečná komponenta) zvlášť citlivý na jakákoli poškození se nazývá **kritická perioda**. Je to proto, že vývoj dospívá k určitému prahu. Dosažením prahu končí kritická morfogenetická perioda a vývojový defekt nelze během dalšího vývoje vyvolat. Tento **terminační bod** pro individuální kritickou periodu je v populaci zárodků stejného stáří normálně časově rozložen. Jde tedy o **časový interval**, který odpovídá klasické terminační periodě. Příkladem terminační periody je období srůstu patrových plotének (Fergusson, 1991). V průběhu dalšího vývoje již nelze rozštěp patra nikdy vyvolat.

4.2. Sensitivní perioda

Nezávisle na kritických periodách existují tzv. periody sensitivní. Sensitivní periody definujeme jako vývojové fáze, během nichž se **diferencující buňky stávají citlivými** na podávání toxického agens (např. diferenciací specifických receptorů). Rozsah sensitivní periody je závislý **na povaze faktoru a na jeho dávce**. Pomocí sensitivních period můžeme vysvětlit, proč některé substance vyvolávají pouze rozštěpy patra, jiné malformace končetin a jiné zase malformace velkých cév, i když působíme v období kritických period výše uvedených struktur.

4.3. Závislost na farmakokinetice a biotransformaci látky

U savců, tedy i u člověka, je expozice zárodků plně závislá na farmakokinetice a biotransformaci látky v mateřském organismu. Farmakokinetika a biotransformace látky vykazuje značné mezidruhové, vnitrodruhové a individuální rozdíly, podmíněné (mimo jiné) mateřským genotypem. K cílové struktuře se tedy látka nemusí dostat jenom ve své původní podobě, ale i ve formě **specifických metabolitů** vznikajících v mateřském organismu, placentě anebo samotném zárodku.

5. Základní projevy vývojového poškození

Vývojové poškození embrya nebo fětu na základě genetickém nebo škodlivými faktory prostředí se manifestuje třemi základními projevy: letalita, růstová retardace, a vrozená vada (malformace). Vrozená vada (strukturální vývojový defekt) může být buď závažná (velká, tzv. major malformation) nebo méně závažná (malá, tzv. minor malformation). Velké vrozené vady se projevují na úrovni organismu, orgánové soustavy nebo orgánu a jsou viditelné pouhým okem (lupou). Malé vrozené vady jsou patrné na úrovni tkáně, buňky a subcelulární a nejsou viditelné

na první pohled (Moore a Persaud, 1993). Wilson (1977) zahrnul letalitu, malformace a růstovou retardaci (pokud jsou vyvolány faktory prostředí) pod společný termín „embryotoxicita“. Všechny tři základní projevy vývojového poškození se mohou kombinovat u téhož embrya či fétu.

5.1. Letalita – prenatální ztráty

Podle odhadů Leridona (1977) jsou prenatální ztráty u chtěných těhotenství nejintenzivnější během prvního týdne po ovulaci: 16% zralých oocytů není oplodněno vůbec. U fertilizovaných oocytů je 42% ztraceno před, během nebo krátce po implantaci. Během dalšího průběhu těhotenství pokračují prenatální ztráty mnohem pomaleji a do konce těhotenství je jich pouze 11% (Obr. 5). Miller et al. (1980) vyčíslili rané prenatální ztráty na základě hodnot HCG a našli 43% potratů krátce po implantaci. Lohstroh et al. (2005) studovali také osud 62 těhotenství detekovaných také pomocí HCG testu. Podle jejich dat 35% velmi raných těhotenství skončilo spontánním abortem. Anamnesticky bylo zjištěno, že riziko spontánního abortu se zvyšuje s **věkem matky** a s předchozím **spontánním potratem** v anamnéze (Leridon, 1987). Výše uvedená data dokládají, že k největším prenatálním ztrátám dochází na samém počátku těhotenství. Všeobecně se uznává, že hlavní příčinou časných prenatálních ztrát jsou **chromozomální aberace** (Gardo, 1993; Brent, 2004) a narušení procesu implantace (Racowsky, 2002; Caglar et al., 2005). Mezi další důvody abortů se zahrnují například těžké vývojové vady neslučitelné s dalším vývojem plodu, problémy vývoje související s placentou a pupečníkem, nebo hormonální nevyváženost a choroby matky. Prenatální ztráty jsou jevem heterogenním a nemají jednotnou kritickou periodu.

Oficiální český statistický monitorovací systém zaznamenává počty spontánních abortů. Avšak tento registr zahrnuje pouze ty spontánní aborty, které proběhly v **nemocnicích** a povinně byly hlášeny lékařem. Spontánní aborty, které proběhly mimo zdravotnická zařízení, v tomto registru chybí. Počty registrovaných spontánních abortů dosahují maxima 8. týden těhotenství a klesají téměř na nulu do 28. týdne těhotenství, neboť pak jsou již klasifikovány jako předčasně porody. Protože nemáme k dispozici data o počtu spontánních abortů během prvních dvou týdnů těhotenství (těhotenství v této době ještě není diagnostikováno a časně embryonální ztráty jsou maskovány menstruací), pokusili jsme se je odhadnout matematickou extrapolací. Míra spontánních abortů během prvních dvou týdnů těhotenství byla odhadnuta přibližně na 50% (Peterka et al., in press).

5.2. Velké vrozené vady – tvarová odchylka od normy

Každá embryonální komponenta má kritickou periodu, kdy je možné její morfogenesu (vývoj) narušit a vývojové vady může vzniknout. Velké vrozené vady (monstrosity) jsou strukturální vývojové defekty, které jsou zřejmé na první pohled (např. orofaciální rozštěpy, amelia, anencefalie). Velké vývojové vady vznikají během **embryonální a časně fetální fáze** prenatálního vývoje. Během této doby se odehrávají kritické periody vývoje, během nichž se vytváří vnější morfologie těla, zakládají se orgánové systémy a jednotlivé orgány, které procházejí kritickými periodami svého vývoje. Po skončení těchto kritických period už velké strukturální malformace nemohou nikdy vzniknout. Například kritická perioda pro utváření centrálního nervového systému začíná 3. prenatální týden. Obyčejně je neurální trubice kompletně uzavřena mezi 25. - 27. embryonálním dnem (Kimmel a Buelke-Sam, 1981). Z toho plyne, že defekt **neurální trubice** (např. exencefalie nebo spina bifida) nemůže vzniknout po skončení prvního prenatálního měsíce. Naproti tomu kritická perioda pro vznik vnějších genitálií u mužského fétu končí až během druhé poloviny 3. prenatálního měsíce. **Hypospadié** mužské uretry může vzniknout během 9. - 12. prenatálního týdne, ale ne později. Během vývoje mnohem komplexnějších struktur se mohou kritické vývojové periody kombinovat a překrývat, jak může být dokumentováno na příkladu orofaciálního vývoje. Celá kritická perioda, kdy mohou vzniknout různé typy **orofaciálních rozštěpů**, se rozprostírá přibližně od 27. do 60. dne prenatálního vývoje (Peterka et al., 1985a).

Do 43. dne prenatalního vývoje splynou mediální nasální a maxilární obličejové výběžky s výjimkou dentálního epitelu (Hovorakova et al., 2005a; Hovorakova et al., 2005b). Hypoplasie a následné nespojení těchto výběžků vede ke vzniku **rozštěpu rtu a čelisti**, což bylo prokázáno v experimentech na zvířecích modelech (Peterka a Jelínek 1983; Peterka et al., 1997b). Během 37. - 40. dne prenatalního vývoje se objevují patrové ploténky a rostou vertikálně dolů po stranách jazyka do 55. dne embryonálního vývoje. Poté se rychle zvednou do horizontální polohy (proces horizontalizace) nad hřbet jazyka. Jestliže jsou dostatečně velké obě patrové ploténky splynou ve střední čáře během 60. dne těhotenství (Fergusson, 1991).

Hypoplasie patrových plotének je jednou z možných příčin jejich nespojení, které vede ke vzniku izolovaného rozštěpu patra (Peterka a Dostál, 1977; Peterka a Jelínek, 1978). Nicméně experimenty na myších dále ukázaly, že izolovaný rozštěp patra může vzniknout i tehdy, když patrové ploténky nejsou hypoplastické. Tyto rozštěpy vznikají zablokováním samotného procesu **horizontalizace** (Jelínek a Peterka, 1977). Oddálení jazyka od stropu primitivní dutiny ústní a tím vytvoření volného prostoru nad jazykem je podmínkou horizontalizace patrových plotének. Volný prostor nad jazykem vzniká v důsledku rychlého růstu dolní čelisti (Meckelovy chrupavky) směrem vpřed. **Meckelova chrupavka táhne jazyk** dolů a vpřed od stropu primitivní dutiny ústní (Jelínek a Peterka, 1977).

Růstová retardace dolní čelisti může tak být překvapivě dalším důvodem vzniku izolovaného rozštěpu patra, protože jazyk zůstane blokován mezi patrovými ploténkami a mechanicky zabrání procesu horizontalizace patrových plotének, které mohou mít normální velikost (Jelínek a Peterka, 1977; Peterka a Jelínek, 1978). Vznik volného prostoru nad jazykem byl také dokumentován u lidských embryí (Slípka et al., 1980; Diewert, 1983). Vznik izolovaného rozštěpu patra doprovázený hypoplazií mandibuly u dětí s Pierre-Robinovým syndromem (Pratt, 1966) byl vysvětlen výše popsáním mechanismem (Jelínek a Peterka, 1977).

5.2.1. Prenatální ztráty plodů s velkou vrozenou vadou

Je dobře známo, že ne všechny malformované zárodky přežijí až do narození. Velká část embryí/fetů s vývojovou vadou je spontánně potracena (Brent a Beckman, 1994). Následkem toho počet **vrozených vad** u novorozenců představuje pouze malou část **vývojových vad**, které prenatalně vznikly a je nazýván „**residuální teratogenezi**“ (Kučera, 1989). U orofaciálních rozštěpů jsou odhadovány prenatální ztráty na 90% (Kučera, 1989). Podobné výsledky lze získat v experimentu. Studovali jsme teratogenní efekt vyšší inkubační teploty na vývoj kuřecích zárodků. Nalezli jsme vyšší incidenci vývojových vad u mrtvých embryí než u embryí žijících (Peterka et al., 1996b).

Není pochyb o tom, že **příčinou smrti embrya** nesoucího velkou vývojovou vadu, může být vývojová vada samotná, pokud je neslučitelná s dalším vývojem embrya (např. anencephalie, kaudální regrese a těžké srdeční defekty). Ale jak vysvětlíme prenatální ztráty embryí, která jsou postižena malformacemi slučitelnými s dalším vývojem zárodku (např. syndaktylie nebo rozštěp rtu). Můžeme spekulovat o dalším, asociovaném a mnohem závažnějším vývojovém poškození (např. o malformaci malé – viz níže), jež není viditelná na první pohled.

5.3. Malé vrozené vady – manifestující se funkčním defektem.

Malé vývojové vady (minor malformation) jsou menší strukturální defekty, které vznikají během fetální a časně postnatální fáze vývoje (Obr. 5), tj. během kritické periody histodiferenciace a terminální cytodiferenciace v orgánech. Tyto orgány nemusejí mít velký strukturální defekt (tj. byly založeny normálně). Malé strukturální defekty mohou být patrné na **tkáňové, buněčné nebo subcelulární** úrovni a obvykle jsou detekovány díky **narušené funkci** postiženého orgánu (např. behaviorální defekty, slepota, hluchota).

Lékaři, kteří léčí ženy na konci těhotenství, během porodu a během časně postnatální periody, často podceňují riziko možného vzniku malých strukturálních defektů u dětí. Během této periody mohou například vzniknout malé mozkové defekty, které vedou k souboru příznaků nazývaných **lehká mozková dysfunkce** (LMD). Jedná se o poruchy pozornosti a soustředění, učení a

chování, řeči a motoriky, které pramení z oslabení nervového systému. Odhaduje se, že touto poruchou trpí asi 20% dětí (Matějček et al., 1991).

5.4. Intrauterinní růstová retardace a nízká porodní váha

Tělesná váha reprezentuje nejfrekventovaněji užívaný parametr pro měření růstové rychlosti a vyžrávání jednotlivých zárodečných komponent. V experimentu používáme **váhu embrya** jako nejpřesnější parametr pro určení detailního stádia vývoje. Vývojové stadium embrya určené chronologicky dnem březosti je právě možné dále rozdělit mnohem přesněji podle váhových kategorií. Vážením zárodků může úspěšně provádět detailní stádiování i pracovník nezkušený v embryologii.

Díky rozdělení zárodků do jednotlivých váhových kategorií bylo možné detailně studovat, růst patrových plotének a proces horizontalizace u zárodku myši (Peterka a Dostál, 1977; Jelínek a Peterka 1977; Peterka a Jelínek, 1978) a u zárodku kuřete i proces splývání obličejových výběžků (Peterka a Jelínek, 1983). V poslední době jsme detailní stádiování myších zárodků pomocí dne březosti v kombinaci s váhou zárodku použili k detailní analýze vývoje základů raných stádií myších molárů (Peterka et al., 2002, Peterková et al., 2003, Peterková et al., 2005).

Porodní váha novorozence je odrazem intrauterinního růstu během prenatální periody. Intrauterinní růst embrya/fétu je multifaktoriální proces, který je citlivý na endogenní a exogenní vlivy. Porodní váha závisí **na pohlaví** (dívky jsou vždy lehčí), **etnických a rasových faktorech**. Ve Švédsku vzrostla průměrná porodní váha za posledních 27 let u dívek i u chlapců asi o 500mg. V roce 2000 byla průměrná porodní váha u chlapců 3600g a u dívek 3470g (Odlind et al., 2003). V porovnání se Švédskem měli čeští novorozenci v letech 1989-1991 nižší porodní váhu: chlapci pouze 3522g a dívky 3310g (Koupilova et al., 1998). V populaci českých Rómů je u novorozenců narozených v řádném porodním termínu průměrná porodní váha ještě nižší: u chlapců 2939g a u dívek 2816g (Bernasovsky et al., 1975). Literární data dokumentují, že porodní váha je různá mezi rasovými a etnickými skupinami (Alexander et al., 1999), a proto limity pro fyziologickou a patologickou porodní váhu musí být stanoveny empiricky pro každou individuální populaci. Ve speciálních případech je pro hodnocení porodní váhy třeba vzít v úvahu i **antropologické parametry rodičů**.

Porodní váha je odrazem gestačního stáří (Alexander et al., 1999). **Nízká** porodní váha (menší než 2500g), **velmi nízká** porodní váha (méně než 1500g) a **extrémně nízká** porodní váha (méně než 1000g) je pravidelně nacházena u dětí **narozených předčasně** (tj. před 40. týdnem těhotenství) (např. Grandi et al., 2005; Hack et al., 2005; Knops et al., 2005). Jestliže snížení porodní váhy koreluje s časnějším gestačním věkem novorozence, nelze nižší porodní váhu klasifikovat jako **intrauterinní růstovou retardaci (IUGR)**.

Termín IUGR můžeme užít pouze v těch případech, kdy intrauterinní růstová rychlost je menší než můžeme očekávat v závislosti na gestačním věku embrya/fétu. IUGR je úzce spjata s teratogenezí a pravidelně se nachází u novorozenců s velkou či malou strukturální vadou (Brent, 1977). Růstová retardace však může být nalezena i u dětí bez zjevné strukturální malformace, např. po expozici záření po výbuchu atomové bomby v Japonsku (Brent, 1977). Na rozdíl od strukturálních defektů, **IUGR nemá kritickou periodu** a může být vyvolána kdykoli během těhotenství. Ergas et al., (2005) sumarizoval příčiny IUGR následujícím způsobem:

1) mateřské faktory (podvýživa, chronické choroby matky, pořadí porodu, vícečetné těhotenství a rodičovské genetické faktory); 2) placentální patologie (především placentální vaskulární poruchy vedoucí k insuficienci placenty); 3) infekce a specifické fetální syndromy včetně chromozomálních aberací; 4) rodičovský životní styl (kouření, alkohol). Jedinci postižení IUGR mají nižší porodní váhu, než bychom mohli očekávat vzhledem k jejich gestačnímu stáří.

6. Testování embryotoxicity a detekce teratogenů

V současné době musí každý nový lék projít baterií testů předklinických i klinických. Součástí předklinických testů jsou i toxikologické studie mezi něž patří tzv. speciální toxikologické zkoušky, které ověřují účinky preparátu na reprodukci, karcinogenitu a mutagenitu. Testování embryotoxicity (teratogenicity) léku se tedy provádí v rámci **testů na reprodukční toxicitu**.

6.1. Testy na laboratorních savcích

Podle doporučení WHO (1967) se k testování embryotoxicity běžně používají dva druhy laboratorních savců a látka je aplikována cestou uvažovanou v klinické praxi ve vysoké (subtoxické), střední a nízké dávce. Nízká dávka zhruba odpovídá zamýšlené dávce terapeutické. V roce 1979 vyšel nově upravený předpis pod názvem FDA Bill 1979 (Dorsen a Miller, 1979). K detekci teratogenů a ověření **testů na laboratorních savcích** se využívají i výsledky **epidemiologických studií v lidské populaci**. Na základě konfrontace výsledků těchto dvou přístupů se látka dělí do pěti kategorií.

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

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

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

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

Kategorie X: Zahrnuje látky v těhotenství zásadně kontraindikované, protože způsobují abnormality u zvířat i u člověka a potenciální riziko vzniku vady jasně převažuje nad přínosem léčby.

Hlavní nedostatky současných oficiálních testů na laboratorních savcích jsou:

- a) Testy nepočítají s teratogenesí jako s **prahovým jevem** a tím popírají existenci **neúčinného dávkového pásma**. Prakticky to znamená, že za teratogen může být označována jakákoli látka, u níž byl v pokuse na zvířeti prokázán teratogenní efekt, přestože účinné dávky daleko přesáhly maximální možnou expozici u člověka (u léků maximální terapeutickou dávkou).
- b) Výsledky testů na laboratorních savcích **nelze na člověka spolehlivě přenášet**. Dokládají to např. výsledky testování pěti prokázaných lidských teratogenů, z nichž byly kupříkladu u opice byly z nich účinné pouze dva!

Hlavní příčina mezidruhových rozdílů v reakci na zkoušenou látku netkví v samotných zárodcích, ani v zásadně odlišném způsobu transportu látek placentární bariérou, nýbrž ve **farmakokinetických odlišnostech mateřských organismů**. K zárodku se obvykle látka nedostává pouze ve své původní podobě, ale i ve formě **specifických metabolitů** charakteristických pro daný živočišný druh. U člověka však takové metabolity vůbec nemusejí vznikat anebo vznikají v menším či větším množství.

Na závěr malá poznámka. Všechny léky jsou testovány na **zdravých zvířatech**. Člověku je naopak indikujeme při nejrůznějších onemocněních a reakce zdravého a nemocného organismu nemusí být stejná. Rozhodně se jedná vždy o interakci nemocného organismu s lékem (Peterka et al., 1985a, Peterka et al., 1985b, Peterka et al., 1994c).

6.2. Alternativní testy

Protože **mateřský organismus** je prokázaným **zdrojem mezidruhové variability** testování látek, proto byla vyvinuta řada alternativních metod, které vylučují transport látky k zárodku mateřským organismem, zahrnujících především systémy in vitro. Celý savčí zárodek nebo pouze jednotlivé orgány (např. končetiny) jsou pěstovány v umělém výživném mediu, do kterého se přidává testovaná látka (New, 1966). Testuje se nejen na zárodcích savců, ale i na mimosavcích zárodcích jako je hydra (Johnson et al., 1988), embryonální buňky drosophily (Bournias-Vardiabasis a Teplitz, 1982) atd. Systémy in vitro se dělí do několika kategorií: a) buněčné linie včetně kmenových buněk, b) buněčná mikromasa (mesenchymových buněk, embryonální končetina, buňky CNS), c) nižší obratlovci (ryby, žáby) a bezobratlí (např. cvrček, drosophila, mořský krab), d) zárodek kuřete in ovo e) kultivace celých savčích embryí (Brown

et al., 1995). Jiný způsob jak obejít mateřský organismus je použití metody přímé intraamniální aplikace u laboratorních savců. Zkoumaná látka je vstříkována přímo k zárodku do **amniotického vaku zárodku myši či krysy** u žijících březích samic (Dostál a Jelínek, 1971).

6.3. Testování na zárodku kuřete – metoda CHEST

V naší Teratologické laboratoři byla vyvinuta alternativní metoda testování **CHick Embryotoxicity Screening Test (CHEST)**, která používá k testování embryotoxicity zárodek kuřete v přirozeném prostředí in ovo. Metoda CHEST má řadu výhod: a) zárodek se vyvíjí ve svém **přirozeném prostředí** a není třeba používat žádná umělá výživná media, b) testování je možné provádět na celém zárodku po dostatečně dlouhou dobu, která pokryje **všechny kritické orgánové periody**, c) vývoj zárodka je možné **kontrolovat zrakem** před vlastním testováním i po experimentálním zásahu až do skončení pokusu, d) testovat lze látky nejen ve **vodě rozpustné**, ale i látky ve vodě **nerozpustné** ve formě suspenze, e) **je levný**.

Princip této metody byl poprvé publikován Jelínkem (1977). Tato metoda pak byla patentována kolektivem autorů Jelínek, Rychter, Peterka v USA (1977), ve Velké Británii (1977) a v CSR (1976 a 1982). První výsledky testování metodou CHEST byly publikovány v prestižní monografii o alternativních metodách (Jelínek a Peterka, 1981a; Jelínek a Peterka, 1981b). Pomocí této metody jsme doposud otestovali několik stovek substancí (Peterka et al., 1980; Jelínek et al., 1985; Peterka a Jelínek, 1990; Peterka et al., 1992; Peterka et al., 1994a; Peterka et al., 1994b; Peterka et al., 1994c; Peterka et al., 1996b; Peterka et al., 1996c; Peterka et al., 1997a; Peterka et al., 1997b; Peterka a Klepáček, 2001; Klepáček et al., 2001; Peterka et al., 2002b). Hodnocení výsledků testování metodou CHEST je provedeno na základě součtu malformovaných a mrtvých zárodků pro každou zkoumanou dávku a embryonální den. Obdržíme tak závislost odpovědi jednak **na dávce** a jednak **na stádiu** vývoje zárodka. Po vynesení hodnot do grafu pak můžeme zjistit **začátek pásma embryotoxicity**, to jest první nejmenší zkoumanou dávku, která již významně zvýší projevy embryotoxicity proti kontrole. Tato hodnota je velmi důležitá pro určení **pásma bezpečnosti**. Pásmo bezpečnosti pak určujeme jako rozdíl mezi maximální terapeutickou denní dávkou a začátkem pásma embryotoxicity. Velikost pásma bezpečnosti si ukážeme na příkladu 8 známých vitamínů (Peterka a Fára, 1990). U sedmi vitamínů je pásmo bezpečnosti alespoň jeden dávkový řád a můžeme konstatovat, že jejich podávání v těhotenství je poměrně bezpečné. Jedinou výjimku tvoří známý lidský teratogen **vitamín A**, kde se maximální denní terapeutická dávka překrývá se začátkem pásma embryotoxicity a pásmo bezpečnosti nabývá záporných hodnot. Z tohoto výsledků plyne, že léčebné dávky vitamínu A podávané v koncentrované podobě ve formě kapsle, jsou zároveň nebezpečné pro vyvíjející se plod. Prokázali jsme tedy, že metoda CHEST je schopna odhalit takový teratogen, jakým je pro člověka vitamin A (Peterka a Fára, 1990). Na druhé straně konzumace vitamínu A v přirozené stravě ve formě beta karotenu je poměrně bezpečná. Prokázali jsme, že β -karoten samotný není embryotoxický ani v nejvyšších testovaných dávkách (Peterka et al., 1997a). Nebezpečí by mohl β -karoten přinést až po rozštěpení pomocí specifických enzymů v tenkém střevě na vitamin A. Avšak množství vitamínu A získaného konzumací a štěpením β -karotenu je tak malé, že během těhotenství nemůže vyvíjející se zárodek ohrozit. Abychom dosáhli nebezpečné dávky vitamínu A, která je obsažena v **jedné tobolce vitamínu A**, museli bychom najednou zkonzumovat např. 100 litrů mléka nebo 30 vajec. Relativně větší nebezpečí z předávkování vitamínem A hrozí při konzumaci zvířecích jater, kde se tvoří jeho přirozená zásoba. Klasickým příkladem je otrava vitamínem A u polárních badatelů po pozření jater ledního medvěda. U dospělých je však otrava reversibilní a bez větších následků. V případě konzumace jater v těhotenství je však vývojový defekt embrya ireversibilní.

7. Residuální teratogeneze a epidemiologie vrozených vad

Počet novorozenců s malformací reprezentuje pouze malou část (asi 10%) všech malformovaných embryí, které prenatalně vznikly. Proto počet novorozenců s vrozenou vadou je nazýván „**residuální teratogeneze**“ (Kučera, 1989). Náhlý vzestup počtu novorozenců

s vrozenou strukturální vadou umožnil detekovat nový teratogen thalidomid. Domníváme se, že se tak stalo díky třem specifickým okolnostem: 1) Thalidomid byl užíván tisíci těhotnými ženami, což je dostatečně velký a homogenní vzorek populace, aby se efekt projevil na populační úrovni. 2) Typická malformace končetin indukovaná thalidomidem, stejně tak jako malformace další, zjevně nevedly k napadení životních funkcí u většiny embryí/fetů, takže mnoho z nich se dožilo narození. 3) Malformace končetin byly tak nápadné, že je nebylo možné přehlédnout.

Khoury a Holtzman (1987) se pokusili odhadnout čas, jenž je zapotřebí pro detekci takového nového teratogenu jakým byl thalidomid. Díky běžícím programům na monitorování incidence vrozených vad by bylo možné odhalit takto nebezpečný teratogen **asi za dva týdny**. Bohužel ve většině ostatních případů nelze očekávat tak rychlou detekci. Odhalení i tak nebezpečných teratogenů jako jsou valproová kyselina a isotretinoin (accutane) by vyžadovalo **více než 20 let** monitorování, neboť relativně malý počet těhotných žen byl léčen těmito preparáty (Khoury a Holtzman, 1987).

Po prenatalní expozici velmi vysokým dávkám nebezpečných látek mohou všechna malformovaná embrya zemřít před dokončením prenatalního vývoje (Wilson, 1977). Jestliže budeme hodnotit prenatalní riziko environmentálních faktorů pouze na základě počtu malformovaných novorozenců, nemusíme paradoxně v nejvyšší zamořených oblastech najít nejvyšší hodnoty tohoto indikátoru. To by mohlo vysvětlit poněkud paradoxní závěry Mastroiacovo et al., (1988), kteří nenalezli v nejvyšší kontaminovaných oblastech **Seveza dioxinem** žádnou malformaci. Frekvence velkých malformací v oblasti málo kontaminované byla 29,9/1000 a v oblasti velmi málo kontaminované 22,1/1000. Protože frekvence malformací v kontrolní nekontaminované oblasti byla 27,7/1000, uvedená zjištění nemohla potvrdit zvýšení rizika vrozených vad v souvislosti s kontaminací 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (Mastroiacovo et al., 1988). Tato epidemiologická data lze však interpretovat zcela odlišně na základě našich zkušeností z experimentů (Peterka et al., 1986). Může tedy nastat situace, kdy počet malformovaných jedinců je stejný, ale dávka nebezpečného faktoru zevního prostředí i množství mrtvých zárodků je v případě B mnohem vyšší než v případě A:

Expozice nejvyšším dávkám vede pouze k prenatalní smrti. Pomocí experimentů na zárodcích kuřete jsme modelovali závislost dávky a odpovědi pro člověka, kdy máme k dispozici data pouze o počtu malformovaných jedinců, zatímco data o počtu spontánních abortů chybějí. Ukázali jsme, proč je informace o incidenci vrozených vad nedostatečná pro správné hodnocení škodlivého účinku zevního faktoru. Tuto informaci by bylo potřeba doplnit o údaje o spontánních abortech

7.1. Incidence orofaciálních rozštěpů v Čechách

Kolik se rodí dětí s rozštěpem na území Čech? Máme k dispozici velmi přesné počty novorozenců s touto vadou za posledních 30 let. Absolutní počet dětí s rozštěpovou vadou narozených v jednom kalendářním roce se během let měnil a to především v závislosti na celkové porodnosti. Od roku 1965 do roku 1975 se roční absolutní počet novorozenců s obličejovým rozštěpem zvýšil přibližně ze 120 na 230 tj. téměř na dvojnásobek (Peterka et al., 1995). Od roku 1976 až do současnosti se jejich roční počty trvale snižují. Pokles počtu narozených dětí s obličejovým rozštěpem během posledních let je odrazem nezadržitelného snižování porodnosti v naší republice. Roční incidence novorozenců s obličejovými rozštěpy je však poměrně stabilní a kolísá okolo dlouhodobého průměru 1,8 na 1000 porodů.

Analyzovali jsme počty novorozenců s orofaciálním rozštěpem podle jejich narození v jednotlivých 52 českých okresech a to v období 1983-1997. Cílem bylo zjistit zda existují signifikantní rozdíly v incidenci orofaciálních rozštěpů mezi okresy. Bude-li tomu tak, bude třeba pátrat v budoucnu po tom, zda případný rozdíl v incidenci nesouvisí s embryotoxickým faktorem, který operuje na populační úrovni (kontaminace vody, škodliviny prostředí a podobně). Okresy jsme rozdělili do tří skupin podle signifikantních rozdílů v incidenci orofaciálních rozštěpů (CL/P) pomocí konfidenčního intervalu (Dixon a Massey, 1969). Nejnižší incidence CL/P byla zjištěna v okresech Svitavy (0,62/1000) a Louny (0,96/1000). Nejvyšší průměrná incidence pak byla nalezena v okrese **Klatovy** (2,86/1000). Kromě okresu

Klatovy jsme vysokou incidencí CL/P (více než 1,79/1000) zaznamenali rovněž o kresech **Beroun, Mělník, Tábor, Kolín, Semily, Česká Lípa, Sokolov, Rokycany, Český Krumlov, Pardubice, Prachatice, Příbram, Chomutov and Teplice.**

Variabilita průměrné incidence CL/P mezi okresy je relativně vysoká (0.62-2.86 na 1000 novorozenců). Tato variabilita může pramenit buď z regionálních rozdílů v genetickém pozadí obou populací, nebo z možné expozice škodlivým zevním faktorům. Oba faktory by musely působit dlouhodobě aby dokázaly způsobit dlouhodobé zvýšení incidence CL/P na populační úrovni v jednotlivých okresech (např. radiace, kontaminace vody).

Těhotné ženy žijící v jednotlivých okresech jsou navíc exponovány specifickým embryotoxickým faktorům (např. infekci, zvýšené tělesné teplotě, lékům, rentgenovému záření, chronickým chorobám a profesionální expozici). Tyto faktory však působí pouze přechodně a přísně individuálně a mohou působit škodlivě pouze během kritické periody tj. 27. – 60. den těhotenství.

V této studii (Peterka et al., 2000) jsme našli negativní korelaci mezi incidencí CL/P a počtem porodů: incidence CL/P byla vyšší v okresech s nižší porodností a nižší v okresech s vyšší porodností. Zvýšená porodnost může indikovat lepší podmínky pro těhotenství v okresech, kde je nižší hladina embryotoxických faktorů. Můžeme hypoteticky uvažovat o závislosti: nižší hladina embryotoxických faktorů – vyšší porodnost – nižší incidence CL/P. Protikladem by mohla být nižší porodnost související se sníženou fertilitou a větším počtem spontánních abortů jako výsledek zvýšeného environmentálního stresu. Podle toho by pak mohla být zvýšená i incidence CL/P.

Pokusili jsme se rozšířit tuto studii ještě o děti narozené v letech 1964-1982 a vytipovat okresy s nejvyšší a nejnižší průměrnou incidencí CL/P za celé období až do roku 1997. Na obrázku 27 jsou označeny bíle okresy, kde byl vždy signifikantně nižší počet CL/P. Černě jsme označili okresy, kde byl počet novorozenců s rozštěpem signifikantně vyšší.

8. Sex ratio

Protože epidemiologická data o novorozencích s vrozenou vadou představují pouze část prenatalně vzniklých vývojových vad a údaje o abortech nejsou k dispozici, pokusili jsme se najít další parametr, který by pomohl odhalit prenatalní ztráty. Testovali jsme zda novorozenecké sex ratio může představovat užitečný indikátor prenatalního rizika expozice nebezpečným environmentálním faktorům.

Sex ratio je termín vyjadřující relativní proporce jedinců mužského a ženského pohlaví, které můžeme vztáhnout k prenatalní nebo postnatalní periodě. Budeme dokumentovat, že novorozenecké sex ratio může být velice užitečným nástrojem pro hodnocení kvality reprodukce, podobně jako porodní váha, nebo incidence malformací, spontánních abortů a mrtvorozených plodů.

8.1. Prenatální sex ratio

Literární data dokumentují, že výrazně vyšší počet mužských než ženských plodů vzniká při početí (Wells, 2000). Sex ratio (podíl chlapci : dívky) 2.5 bylo určeno během 4. - 5. měsíce těhotenství. Tento poměr postupně klesal během dalšího prenatalního vývoje, a v devátém měsíci byl pouze 1.17 (Vatten a Skjaerven, 2004). Z toho plyne, že mužská embrya a plody jsou potráceny častěji, než embrya a plody ženské (Obr. 28).

Vyšší sex ratio 1.3 (odpovídá 56.52% mužských a 43.48% ženských plodů) bylo určeno u spontánních abortů s normálním karyotypem (Hassold et al., 1983; Mizuno, 2000). V letech 1950-1972 byla v USA analyzována data o rozdílné mortalitě fětu a dětí zemřelých perinatálně. Originální (primární sex ratio po početí) bylo opakovaně stanoveno na 120:100 (McMillen, 1979).

8.2. Novorozenecké sex ratio a zranitelnost mužských embryí/fetů

I po ukončení prenatálního vývoje zůstává počet narozených chlapců vyšší než počet narozených dívek. V České republice se po dlouhou dobu rodí v průměru 105 chlapců na 100 dívek - t.j. novorozenecké sex ratio 1.05 (data převzata z Českého statistického úřadu). Podobné novorozenecké sex ratio bylo nalezeno i v jiných populacích. Např. ve Švédsku, Německu, Norsku, Finsku, Holandsku, Dánsku, Kanadě a v USA bylo nalezeno sex ratio 1.06 (Davis et al., 1998) což odpovídá 51.46% chlapců a 48.54% dívek.

Bylo zjištěno několik škodlivých environmentálních faktorů, které jsou známé tím, že mohou změnit sex ratio u potomstva. Snížení podílu narozených chlapců bylo hlášeno po dlouhodobé expozici chemickým faktorům prostředí (Nicolich et al., 2000). Například u dětí, jejichž rodiče byli kontaminováni TCCD – dioxinem, byl zaznamenán menší podíl novorozených chlapců (Mocarelli et al., 1996; Mocarelli et al., 2000). Podobně tomu bylo i u rodičů, kteří kouřili více jak 20 cigaret denně (Fukuda et al., 2002).

Jedno vysvětlení pro snížení podílu mužských novorozenců navrhuje Jamesova hypotéza (James, 1996). Geneticky je pohlaví určeno během oplodnění. Koncentrace rodičovských hormonů v období koncepcie může částečně ovlivnit pohlaví u potomků: nízká koncentrace testosteronu a estrogenů může souviset se vznikem dívčích plodů (James, 1996). Anti-estrogenní a anti-androgenní vlastnosti dioxinu (Jongbloet et al., 2002) a anti-estrogenní efekt kouření je dobře znám (Michnovicz et al., 1988). Oba tyto nebezpečné faktory mohou redukovat počet mužských plodů během pre- nebo peri-koceptčního období a změnit tak sex ratio na úplném začátku těhotenství (James, 2002a; James, 2002b).

Vyšší citlivost chlapeckých plodů na prenatální poškození environmentálním stresem vyústí v jejich aborty (Hassold et al., 1983; Mizuno, 2000; Wells, 2000) což může vysvětlit rozdíl mezi sex ratiem při početí a při narození. Větší zranitelnost vyústí v převládající ztráty mužských plodů (Wells, 2000) a ve vyšší incidenci novorozenců mužského pohlaví s vývojovou malformací.

V České republice je dlouhodobé sex ratio u všech malformovaných novorozenců 1.5 (Česká zdravotnická statistika). Podle našich údajů se sex ratio u všech novorozenců s orofaciálním rozštěpem v Čechách pohybuje okolo hodnoty 1.3 (Peterka et al., 1995; Peterka et al., 1996a; Peterka et al., 2000).

Vzhledem k tomu, že mužské plody jsou zranitelnější, dlouhodobě trvající signifikantně vyšší podíl novorozených chlapců reprezentuje vhodný indikátor reprodukční stability a zdraví (Davis et al., 1998; Vartiainen et al., 1999; Campbell, 2001).

Protože environmentální stres může poškodit prenatálně chlapce mnohem vážněji než dívky, použili jsme novorozenecké sex ratio pro hodnocení následků Černobylské havárie v České republice.

9. Následky havárie v Černobyli na prenatální populaci v ČR

Exploze Černobylské atomové elektrárny v dubnu 1986 způsobila rozsáhlou kontaminaci radioaktivním spadem na mnoha místech po celém světě (Brodway et al., 1988; Shizuma et al., 1987). V místě exploze způsobila radiace smrt přibližně 100 lidí a prudce vzrostl nárůst rakoviny štítné žlázy především u dětí v Bělorusku a na Ukrajině (Nikiforof et al., 1994; Jakob et al., 2000; Leenhouts et al., 2000). Vzrostl také počet vývojových malformací (Lazjuk et al., 1977; Gavyliuk et al., 1992; Romanova et al., 1998), spontánních abortů (Gavyliuk et al., 1992; Karakashian et al., 1997) a chromozomálních aberací (Gavyliuk et al., 1992). Vzestup počtu spontánních abortů nebyl nalezen jenom v přilehlých oblastech (Gavyliuk et al., 1992; Karakashian et al., 1997), ale také ve Finsku (Auvinen et al., 2001) a Norsku (Ulstein et al., 1990; Irgens et al., 1991). V Německu byl zaznamenán po výbuchu vzestup perinatální mortality (Scherb et al., 2000) a trisomie 21 (Sperling et al., 1994). Zvýšení počtu dětí s Downovým syndromem a leukémií byl zaznamenán ve Švédsku (Ericsson a Kallen, 1994). Nárůst počtu dětí s onemocněním štítné žlázy pak byl hlášen z Maďarska (Lukacs et al., 1997). Přímá vzdálenost mezi Českou republikou a Černobyli je přibližně 1000 km. Avšak kontaminace různých míst radionuklidy nezávisela pouze na geografické vzdálenosti, ale především na aktuální lokální

meteorologické situaci: na větru, který unášel radioaktivní mrak a na dešti, který transportoval radionuklidy na zem (Bangert et al., 1986).

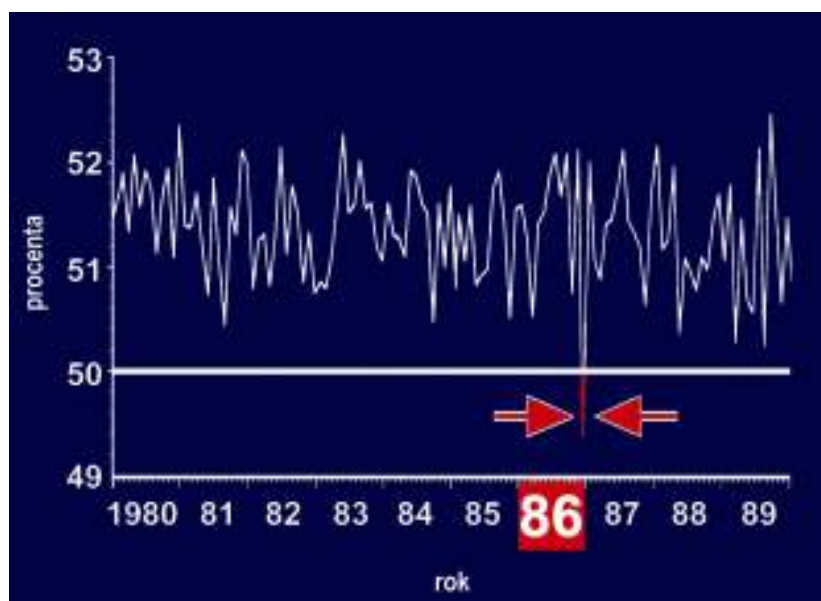
9.1. Radioaktivní mrak a celotělová radioaktivita

Tři vlny radioaktivních mraků byly zaregistrovány monitorovacími systémy v květnu 1986 v České republice na základě koncentrace radionuklidů zachycených ze vzduchu (Kunz, 1986). Během průchodu první vlny radioaktivního mraku 30. dubna byly naměřeny maximální hodnoty radiace okolo 257 Bq/m^3 . Poté radiace klesala a při průchodu druhého radioaktivního mraku 4. května byla koncentrace 6 krát nižší a dosáhla hodnoty pouze 38 Bq/m^3 . Třetí vlna radiace přišlo kolem 7. května kdy radiace naměřená ve vzduchu byla pouze 7 Bq/m^3 .

Monitorování celotělové radiace začalo až 4. května, tedy v době průchodu druhého radioaktivního mraku, a průměrné hodnoty celotělové radiace činily okolo 4000 Bq/s . Pro časový úsek mezi 30. dubnem až 3. květnem byla celotělová radiace odhadnuta na hodnotu vyšší asi 9000 Bq/s (Kunz, 1986). Pokles radioaktivity v prostředí byl s určitým opožděním následován i postupným poklesem celotělové radiace u lidí během následujících dvou týdnů počínaje od 4. května (Kunz, 1986).

9.2. Novorozenecké sex ratio – listopad 1986

Novorozenecké sex ratio je v České republice velmi stabilním jevem. Ověřovali jsme absolutní počty novorozených dívek a chlapců v každém ze 600 měsíců po sobě jdoucích od roku 1950-1999. V 599 měsících se vždy narodilo více chlapců než dívek. V průměru to bylo 51.42% chlapců a 48.58% dívek, což v absolutních hodnotách představovalo průměrně o 342.1 chlapců navíc. Pouze jedinou výjimku tvoří listopad 1986 (Obr.1), kdy novorozenecké sex ratio bylo obrácené. Narodilo se signifikantně méně chlapců než dívek ($p < 0.05$): 49.35% chlapců a 50.65% dívek. Tento měsíc byl také jediný kdy, procento novorozených chlapců bylo nižší než 50% v celém období 1950-1999. Pokles novorozených chlapců v listopadu 1986 nemůže být vysvětlen předčasným narozením chlapců o měsíc či dva dříve, neboť v září ani v říjnu nebyl počet novorozených chlapců zvýšen ($p > 0.05$). Feminizace externích genitálií není také pravděpodobná neboť počet narozených dívek v listopadu 1986 nebyl zvýšen ($p > 0.05$) v porovnání s ostatními listopady v předchozích letech. Pokles počtu novorozených chlapců v listopadu 1986 byl absolutní. Celkový počet chybějících chlapců v listopadu 1986 byl odhadnut na 467 (Peterka et al., 2004).



Obr. 1: Novorozenecké sex ratio. A. Podíl mužských novorozenců každý měsíc během let 1980-1989. Šipky ukazují obrácené sex ratio v listopadu 1986.

Můžeme tedy předpokládat negativní vliv relativně nízkých dávek záření na prenatální populaci, která se manifestovala selektivní ztrátou části mužských plodů (Peterka et al., 2004). Tento závěr je v souladu se zvýšeným počtem abortů zaznamenaných ve Finsku (Auvinen et al., 2001) a v Norsku (Ulstein et al., 1990; Irgens, 1991) po Černobylské havárii.

9.3. Prenatální kritická perioda účinku radiace

V oblastech naší republiky zamořených radiací po Černobylské explozi byly těhotné ženy od 1. do 9. měsíce těhotenství. Děti, které se narodily během listopadu 1986, byly počaty mezi 8. únorem a 10. březnem 1986. V době vrcholu radiace (od 30. dubna do 7. května) byl jejich prenatální věk 8. – 12. týdnů. Tedy ve věku, kdy je sex zárodku dávno determinován a změna sex ratio nemůže být vysvětlena výše zmíněnou hypotézou Jamese (1996). Během třetího měsíce těhotenství byla zjištěna zvýšená citlivost plodů na možnost poškození mozku radiací, což bylo hlášeno po výbuchu atomových bomb v Hirošimě a Nagasaki (Yamazaki a Schull, 1990). Účinek radiace byl vysvětlován poškozením migrace nezralých neuronů do mozkové kůry v období mezi 8. – 15. týdnem prenatálního vývoje (Yamazaki a Schull, 1990). Není vyloučeno, že poškození vývoje mozku se mohlo podílet i na ztrátě mužských plodů po Černobylské explozi.

9.4. Hypotéza o příčinách selektivních ztrát mužských plodů

Můžeme spekulovat o možných příčinách potratů mužských plodů po Černobylské katastrofě. Jedním z možných kandidátů je radionuklid jódu¹³¹, jehož koncentrace v radioaktivním mraku byla po explozi velmi vysoká (Broadway et al., 1988; Shizuma et al., 1987; Stenke et al., 1987; Gembicki et al., 1991). Eheman et al., (2003) zdůraznil riziko autoimunitního onemocnění štítné žlázy v souvislosti s expozicí environmentální radiací. Radioaktivní jódu¹³¹ může způsobit hypothyreózu a zvýšit u budoucí matky riziko předčasného potratu (Tatham et al., 2002) nebo spontánního abortu (Grossmann et al., 1996). Je všeobecně známo, že choroby štítné žlázy během těhotenství mohou vést k potratu, mrtvorozenosti, neonatální smrti a snížené porodní váze. Proto je užití radioaktivního jódu absolutně kontraindikované během těhotenství (Bishnoi a Sachmechi, 1996; Ogris, 1997). Navíc, vývoj mozku u fétu je velmi citlivý na exces i deficit thyroïdního hormonu u matky (Zoeller et al., 2002; Poppe a Glinöer, 2003). Hypoteticky lze soudit, že přechodné zvýšení jódu¹³¹ může poškodit štítnou žlázu u matky a/nebo u plodu a způsobit spontánní abort u nejvíce zranitelné části prenatální populace.

10. Možnosti prevence vrozených vad

Uvažovat o vymýcení obličejových rozštěpů na úrovni populační je v současné době nad možnosti medicíny a dlouho ještě bude (Peterka a Jelínek, 1989). Ale uvažovat o prevenci vad v jednotlivých rodinách se zvýšeným rizikem (tj. zabránění opakování vzniku vady) je představa reálná již v dnešní době. Účinnost preventivních metod závisí na stupni našich znalostí a v neposlední řadě na moderním technickém vybavení. V zásadě existují dvě možnosti jak zabránit narození dítěte s vrozenou vadou. První možnost se týká **primární aktivní prevence** vzniku vrozené vady během kritického období. Druhá možnost zahrnuje **sekundární pasivní prevenci** založenou na včasné prenatální diagnostice vady již vzniklé. V indikovaných případech je pak možné zabránit narození dítěte s těžkou rozštěpovou vadou obličej (např. v kombinaci s dalšími vývojovými vadami, obličejový rozštěp s vysokým rizikem dědičnosti) doporučením umělého přerušování těhotenství (Peterka a Jelínek, 1989; Peterka et al., 1985a; Peterka et al., 1985b).

V průběhu kritických period lze vývojové vady vyvolat napadením buněčných populací orgánů celým spektrem nejrůznějších faktorů, které mohou působit na biochemismus buněk nespočetnými mechanismy. Spektrum teratogenů je podstatně širší než spektrum mutagenů. **Neexistuje tedy jediný faktor** ani mechanismus vzniku, který bychom mohli označit jako universální příčinu vývojových vad. Proto **není možné existovat žádná universální metoda prevence** a není logické ji ani v budoucnu hledat. Na druhé straně je třeba připomenout, že

jeden faktor je zpravidla schopen vyvolat celou řadu vývojových vad. Proto epidemiologické studie, které se soustřeďují na jeden malformační typ, k němuž se snaží přiřadit jediný etiologický faktor, mají velmi malou naději na úspěch. Takto lze odhalit jen velmi silné teratogeny. Na zjištění příčin vrozených vad nemá velkou naději registrace vrozených vad z velké spádové oblasti, např. z celých Čech, ale spíše z malých lokalit po relativně krátké období. Na tom místě, kde byla změna ve výskytu vrozených vad zachycena, lze u malého vzorku populace důkladně prošetřit anamnesu těhotenství, zatímco obdobná analýza je u většího souboru obtížná (Peterka et al., 1994c ; Peterka et al., 1995).

Příčiny vzniku vrozených vad se tradičně dělí na **dědičné** (20%), na silné **zevní** faktory (10%), a u 70% vad se příčina nedá jednoznačně určit. Z toho vyplývá, že pouze u 30% máme objektivní podklad pro poskytnutí účinné preventivní péče o další těhotenství. Ostatní nezjištěné příčiny pokládáme za **multifaktoriální - polygenní**, což znamená, že jde o interakci několika slabších faktorů prostředí najednou s dědičnou predisposicí, determinovanou celou řadou genů. Nelze také opomenout možnost **spontánní chyby** vývoje nedědičné povahy, nazývané někdy jako vývojový šum.

Je pravda, že vrozené vady byly registrovány ve všech populacích a po celou dobu existence člověka (pokud jsme schopni rozluštit nejstarší záznamy o vrozených vadách), rozhodně daleko předtím, než začala průmyslová revoluce. Předpokládá se, že s narůstajícím znečišťováním životního prostředí docházelo k selekci v populaci živočichů, a tedy i člověka, a narození se dočkali pouze nejodolnější jedinci. **Selekce** je skvěle fungujícím nástrojem k adaptaci populací na změněné životní prostředí, avšak vyžaduje dostatek času a rozsáhlý genofond. Může však působit jen do určité intenzity embryotoxického potenciálu prostředí, dokud dovoluje přežití alespoň části jedinců. S vrozenou vadou anebo smrtí se setkáme u těch zárodků, kde je poškozeno nadprahové množství buněk určitého orgánu, jinak řečeno, když všechny **rezervy** na vytvoření určité struktury byly vyčerpány. **Selekcí se populace adaptuje a čistí** v tom smyslu, že na zevní nepříznivý faktor reagují nejprve jedinci s nejmenší schopností regulace, která je dána především geneticky. Je třeba si připomenout, že 90% vadou postižených zárodků spontánně zaniká. Selekcí je tedy přirozeným a prozatím nejúčinnějším nástrojem prevence vrozené vady. My můžeme přirozenou selekci podpořit a v indikovaných případech na základě přesné prenatální diagnostiky doporučit umělé přerušování těhotenství, nebo se aktivně (primárně) snažit o eliminaci nepříznivých zevních faktorů ještě před vznikem vady. Druhá cesta je však nezbytná, nemá-li snížení efektivity reprodukce, která se nyní odhaduje na pouhých 30%, ohrozit populační vývoj. V každém případě je však třeba zamezit dalšímu vzrůstu embryotoxického potenciálu prostředí. Pokusme se vysvětlit, které případy je dnes lépe řešit primárními či sekundárními metodami prevence.

10.1. Rodiny s genetickým rizikem

U většiny dědičných strukturálních vad dosud není defekt lokalizován na úrovni DNA. Je dokonce pravděpodobné, že u fenotypicky stejných vad nalezneme celé spektrum typů poškození, tak jako je tomu v případě zevních faktorů. Každá struktura je totiž determinována velkým počtem genů. V rodinách s **vysokým genetickým rizikem** vzniku strukturální vady jsme proto zatím odkázáni jen na metodu **sekundární prevence**, která je závislá na výsledku prenatální diagnostiky. Prenatální diagnostika vrozených vad má k dispozici několik metod. **Ultrazvukem** je možné odhalit některé hrubé strukturální malformace (anencephalie, defekty končetin, srdeční anomálie, rozštěpy rtu atd.). **Amniocentesa** - odběr plodové vody, či kultivace choriových klků umožňuje odhalit jedince s cytogenetickými defekty (Downova choroba, Klinefelterův syndrom, Turnerův syndrom a mnoho dalších). Podstatně příznivější je situace u vývojových vad metabolických, kdy metody molekulární genetiky (především DNA sondy) umožňují přesnou prenatální diagnosu. Metody prenatální diagnostiky se stále zdokonalují, ale nelze jimi zjistit všechny strukturální vývojové vady.

Některé vývojové vady jsou vázány na pohlaví plodu (Kučera, 1989). To lze dnes poměrně přesně zjistit prenatálně, a je tedy možné narození dítěte s vrozenou vadou vázanou na sex chromosom zabránit. Podobná situace byla popsána i u orofaciálních rozštěpů, kde existuje větší predisposice u chlapců pro vznik rozštěpu rtu a rozštěpů celkových. U dívek je zase mnohem více případů, které mají izolovaný rozštěp patra (Fog-Andersen 1942; Peterka et al.,

1996a; Peterka et al., 2000). Navíc bylo prokázáno, že v rodinách s genetickým rizikem se rodí většinou pouze jeden typ rozštěpů. Buď jsou to rozštěpy zahrnující rozštěp rtu, nebo jsou to izolované rozštěpy patra. **Volbou pohlaví** prekoncepčně nebo během těhotenství pomocí ultrazvuku, lze do jisté míry ovlivnit riziko narození dítěte s orofaciálním rozštěpem (Peterka, 1988; Peterka et al., 1996a).

10.2. Rodiny bez genetického rizika

V rodinách, kde se neprokáže genetická predispozice, což je asi v 80% případů, lze předpokládat při vzniku vrozené vady větší či menší účast zevních faktorů. Podle typu vady lze zjistit kritickou periodu vývoje orgánu a tím i období těhotenství, kdy faktor působil (Peterka et al., 1985a; Peterka et al., 1985b). Anamnestické šetření pak můžeme přímo zaměřit na toto období a nepříznivé faktory zjištěné mimo kritickou periodu spolehlivě z podezření vyloučit. Je-li zjištěn jeden nebo více zevních faktorů, lze při dalším **plánovaném těhotenství** inkriminovaný faktor vyloučit a tak aktivně zabránit vzniku vývojových vad. Smyslem plánovaného těhotenství je pokus o snížení rizika narození jedince s vrozenou vadou na minimum. Při těhotenství neplánovaném se o jeho existenci dozvídáme příliš pozdě (asi 6. týden), kdy nejhoudlivější období vývoje zárodku již proběhlo, či právě probíhá. V této době je již dávno rozhodnuto, zda novorozenec bude mít mikroftalmii, celkový rozštěp rtu, čelisti a patra, anencephalii nebo jinou závažnou strukturální vývojovou vadu. Z tohoto hlediska jsou ženy pracující na rizikových pracovištích přerazovány příliš pozdě (Peterka et al., 1985a; Peterka et al., 1985b; Jarolímková a Peterka, 2003). Plánovat těhotenství v rozsahu celé populace je vyloučené, a proto můžeme ovlivnit pouze malou část žen, u nichž byly v předchozích těhotenstvích zjištěny některé projevy embryotoxicity. Ne všechny tyto ženy projeví zájem o radu, některé ponechají i další těhotenství náhodě, což mnohdy souvisí s jejich psychosociální úrovní. Ve složité problematice **plánovaného těhotenství**, jehož úspěch závisí na spolupráci celého týmu odborníků, je důležitá úloha **klinického teratologa**. Týká se především lékové indikace v těhotenství. Jak jsme již řekli, lék podávaný v těhotenství je součástí **faktorového komplexu**, jenž vývoj plodu ovlivňuje. Naší snahou je, aby byl podáván lék s co nejmenším rizikem pro plod, tedy s největším pásmem bezpečnosti. Pásmo bezpečnosti lze určovat experimentálně, a to buď testy klasickými na savcích anebo některou z alternativních technik. Při odhadu pásma bezpečnosti používáme nejčastěji naši originální metodu CHEST (Chick Embryotoxicity Screening Test), jejíž spolehlivost je přinejmenším stejná jako u klasických testů (Peterka et al., 1985b, Peterka a Fára, 1990). Jako ukázkou jsme zvolili léky časté medikace - antibiotika. O **tetracyklinových antibioticích** je chronicky známo, že mohou poškodit vyvíjející se plod, a proto by u žen v reprodukčním věku neměla být podávána vůbec. Těhotné ženy je samozřejmě třeba léčit, ale pouze léky s minimálním rizikem embryotoxicity.

Jejich podávání ale musí být omezeno na množství i dobu nezbytně nutnou. Pokud se jedná o chorobné stavy matek, kdy se předem ví, že lék bude podáván po celou dobu těhotenství (diabetes, epilepsie, psychoneurosy), je vhodné upravit dávku a druh léčiva ještě před otěhotněním. Zásadně je nutné snížit množství současně podávaných léků na minimum, aby byly vyloučeny jejich případné nežádoucí interakce. V současné době nelze očekávat od preventivních metod takový úspěch, který by se mohl příznivě odrazit na úrovni populační. Přesvědčil nás o tom případ **defektů neurální trubice**, jež lze poměrně spolehlivě zjišťovat pomocí detekce alfa-fetoproteinu. Prozatím stále platí, že vrozené vady se vyskytují - a bohužel i nadále budou vyskytovat ve stejném množství. Radikální zlepšení nastane teprve tehdy, až prenatalní vyšetření umožní diagnosu většiny vývojových vad vhodnou screeningovou metodu. Velkým zlomem se v prenatalní diagnostice stal v poslední době **3D ultrazvuk**, který umožňuje velmi přesné zobrazení zevní morfologie zárodku, ale i některých jeho vnitřních struktur. Ukazuje se, že některé vývojové vady již diagnostikovat a částečně eliminovat umíme a jejich incidence v populaci se pomalu, ale jistě snižuje. Mezi nejčastěji prenatalně diagnostikované vývojové vady pomocí ultrazvuku patří např. spina bifida, hydrocephalus, anencefalie, vady srdce, omfalokele a gastroschisis (ÚZIS ČR, 2003).

11. Závěry

1. Incidence orofaciálních rozštěpů se za posledních 40 let nezvýšila, přestože nárůst toxických chemikálií v prostředí dramaticky narostl.
2. Celonárodní registr vrozených vad zachycuje pouze část postižených jedinců vrozenou vadou.
3. Kritická perioda pro vznik orofaciálních rozštěpů se rozprostírá mezi 27.-60. dnem prenatalního vývoje. Prokázali jsme, že příčinou vzniku orofaciálních rozštěpů může být hypoplasie obličejových výběžků, hypoplasie patrových plotének a/nebo růstová retardace dolní čelisti.
4. Registr spontánních abortů v ČR nemůže zachytit časné spontánní aborty, neboť se skryjí jako opožděná menstruace. Matematickou extrapolací jsme odhadli prenatalní ztráty během prvních dvou až tří týdnů těhotenství na 50%.
5. Prokázali jsme, že velká část vývojových vad je eliminována v průběhu těhotenství. V experimentu na zárodku kuřete jsme prokázali, že proporce malformovaných zárodků je vyšší u zárodků mrtvých než u zárodků žijících. Vrozených vad je pouhý zlomek vad vývojových, které vznikly v průběhu těhotenství.
6. Prenatální váha zárodka upřesňuje vývojové stádium zárodka pro daný embryonální den. Chronologický údaj samotný je velmi hrubým ukazatelem vývojového stádia zárodka. Především to platí pro raná vývojová stádia.
7. Vyvinuli jsme skrinigovou metodu na testování embryotoxicity s použitím zárodka kuřete in ovo. Tato metoda má název CHEST a je chráněna 4 patenty (USA, Velká Británie, ČR). Touto metodou jsme otestovali několik set substancí a dosažené výsledky testování jsou minimálně srovnatelné s oficiálními testy.
8. Metoda CHEST odhalila známý lidský teratogen vitamin A. Ukázala naopak, že β -karoten je pro vyvíjející se zárodek naprosto bezpečný i v nejvyšších možných testovaných dávkách. Ostatní vitaminy nebezpečné pro vyvíjející se zárodek nejsou.
9. Embryotoxické faktory lze rozdělit podle jejich účinku do tří kategorií: a) faktory vyvolávající letální a teratogenní efekt. Proporce obou projevů se mění v závislosti na dávce testované látky, b) faktory vyvolávající pouze letální efekt, c) faktory neúčinné.
10. Suma všech embryotoxických poškození (velké a malé strukturální malformace, prenatalní smrt a IUGR) ukazují vždy pozitivní závislost na dávce.
11. Pozitivní vztah závislosti dávky a odpovědi na teratogen nemůže být náležitě detekován, když se berou v úvahu pouze malformované plody. Se stoupající dávkou teratogenu nejprve incidence malformací stoupá, ale poté začne klesat. Nejvyšší dávky pak způsobují embryonální/fetální smrt dříve, než se malformace stačí vyvinout.
12. Při detekci nebezpečných prenatalních faktorů je třeba komplexně hodnotit všechny typy prenatalního poškození (malformace, aborty, IUGR, mrtvě rozené plody) včetně změn novorozeneckého sex-ratia.
13. Dlouhodobá incidence orofaciálních rozštěpů v Čechách se nemění a osciluje v jednotlivých letech kolem průměrné hodnoty 1.87/1000 porodů.
14. V 52 českých okresech však existují dlouhodobé signifikantní rozdíly v incidenci orofaciálních rozštěpů. Nejvyšší průměrná incidence orofaciálních rozštěpů byla nalezena v okrese Klatovy (2.86/1000 porodů). Vysvětlit tyto rozdíly zatím nedovedeme.
15. Mužské plody jsou mnohem citlivější k teratogennímu nebo letálnímu účinku faktorů zevního prostředí než plody ženské a následně mohou být mnohem snáze poškozeny.
16. Počet mužských plodů je větší od začátku až do konce těhotenství.
17. Novorozenecké sex ratio je velmi stabilní fenomén. Změna novorozeneckého sex ratio signalizuje přítomnost škodlivého zevního faktoru.
18. Radiace po Černobylské havárii byla v České republice doprovázena přechodným snížením sex ratio v listopadu 1986. Snížení počtu novorozenečích chlapců je odrazem abortů v důsledku zvýšené radiace, patrně hlavně díky radionuclidu jodu¹³¹.
19. U hypohidrotické ektodermální dysplázie je závažné geneticky podmíněné onemocnění u člověka, kdy jsou poškozeny ektodermální deriváty (kůže, vlasy, kožní žlázy, zuby). Pro tento syndrom máme k dispozici identický experimentální model na myši. Prokázali jsme

mechanismus poškození vyvíjející se dentice, která je změněna co do počtu, velikosti a tvaru zubů.

20. Porucha vývoje zubů je způsobena narušením procesu segmentace zubního epitelu. Zároveň jsme pozorovali změny v časoprostorové distribuci programované buněčné smrti u narušeného vývoje zubů.

21. Příčiny vzniku těžkých ortodontických anomálií u dětí s orofaciálními rozštěpy jsou způsobeny hypoplasii horní čelisti u všech typů rozštěpů. Výjimku tvoří jedinci s izolovaným rozštěpem rtu, kde je čelist dokonce o něco větší než u kontroly.

22. Velikost, počet zubů a jejich prořezávání je u pacientů s rozštěpem je rovněž změněna.

23. Byl vypracován systém primární prevence orofaciálních rozštěpů, který se souhrnně nazývá plánované početí. Plánované početí může pomoci zabránit opakování vady v rodině. V rodinách s genetickým rizikem tato metoda uplatnit nejde. V současné době je možné tuto vadu prenatalně diagnostikovat (pokud se jedná o rozštěpy rtu a nebo rozštěpy celkové) pomocí ultrazvukového vyšetření.

24. Sestavili jsme pořadí antibiotik, psychofarmak, vitamínů a dalších látek podle jejich embryotoxického účinku. V případě onemocnění matky můžeme zvolit k léčbě lék s nejmenším rizikem pro plod.

12. Použitá literatura

Alexander GR, Kogan MD, Himes JH, Mor JM, Goldberg R. (1999) Racial differences in birthweight for gestational age and infant mortality in extremely-low-risk US population, *Paediatr Perinat Ep* **13**, 205-217.

Auvinen A, Vahteristo M, Arvela H, Suomela M, Rahola T, Hakama M, Rytomaa T. (2001) Chernobyl fallout and outcome of pregnancy in Finland, *Environ Health Perspect* **109**, 179-85.

Bangert K, Blasing C, Degener A, Jung A, Ratzek R, Schennach S, Stock R, Urban FJ, Reiser W, Jonas H, et al. (1986) Radioactivity in air, rain, soil, plants and food after the Czernobyl incident, *Naturwissenschaften* **73**, 495-498.

Bernasovsky I, Bernasovska K, Hanzelova V. (1975) Anthropological Characteristics of Rom new-born children in the Presov district, *Proceedings PdF Uk, Prague, Biology IV*, 35-40.

Bishnoi A, Sachmechi I. (1996) Thyroid disease during pregnancy, *Am Fam Physician* **53**, 215-220.

Bournias-Vardiabasis N, Teplitz RL. (1982) Use of Drosophila embryo cell cultures as an in vitro teratogen essay, *Teratog Carcinog Mutagen* **2**, 333-41.

Boran T, Lesot H, Peterka M, Peterkova R. (2005) Increased apoptosis during morphogenesis of the lower cheek teeth in tabby/EDAmice, *J Dent Res* **84**, 228-233.

Brent RL. (1977) Radiations and other physical agents/chapter 5, in JG. Wilson, FC. Fraser (eds.), *Handbook of Teratology*, Plenum Press, New York and London, pp. 153-223.

Brent RL. (2004) Environmental causes of human congenital malformation: The pediatrician's role in dealing with these complex clinical problems caused by a multiplicity of environmental and genetic factors, *Pediatrics* **113**, 957-968.

Brent RL, Beckman DA. (1994) The contribution of environmental teratogens to embryonic and fetal loss, *Clin Obstet Gynecol* **37**, 646-670.

Broadway JA, Smith JM, Norwood DL, Porter CHR. (1988) Estimates of radiation dose and health risks to the United States population following the Chernobyl nuclear plant accident, *Health Physics* **55**, 533-539.

Brown NA, Spielmann H, Bechter R, Flint OP, Freeman SJ, Jelinek RJ, Koch E, Nau H, Newall DR, Palmer AK, Renault JY, Repetto MF, Vogel R, Richard Wiger. (1995) Screening chemicals for reproductive toxicity: the current alternatives, *ATLA* **23**, 868-882.

Burian F (1954) Chirurgie rozštěpů rtu a patra. SZdN, Praha, s. 302

Caglar GS, Asimakopoulos B, Nikolettos N, Diedrich K, Al-Hasani S. (2005) Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in repeated implantation failure, *Reprod Biomed Online* **10**, 381-388.

Campbell RB. (2001) John Graunt, John Arbuthnott, and the human sex ratio, *Hum Biol* **73**, 605-610.

- Cervenka J, Gorlin RJ, Anderson VE. (1967) The syndrome of pits of the lower lip and cleft lip and/or palate. Genetic considerations, *Am J Hum Genet* **19**, 416-432.
- Collins TFX. (1978) Reproduction and teratological guidelines: review of deliberation by the National Toxicology Advisory Committee's Reproduction Panel, *J Environ Pathol Toxicol* **2**, 141-147.
- Collins TFX, Sprado RL, Shackelford ME, Hansen DK, Welsh JJ. (1999) Food and drug administration proposed testing guidelines for reproduction studies, *Regul Toxicol Pharm* **30**, 29-38.
- Darste C. (1877) Recherches sur la production artificielle des monstruosités ou Essais de tératogenie expérimentale, C. Reinwald, Paris (citováno podle Rychter, Jelínek 1978).
- Davis DL, Gottlieb MB, Stampnitzky JR. (1998) Reduced ratio of male to female birth in several industrial countries: A sentinel health indicator? *JAMA* **279**, 1018-1023.
- Dorsen N, Miller JM. (1979) The drug regulation process and the challenge of regulatory reform, *Ann Intern Med* **91**, 908-913.
- Diewert VM. (1983) A morphometric analysis of craniofacial growth and changes in spatial relations during secondary palatal development in human embryos and fetuses, *Am J Anat* **167**, 495-522
- Dixon WJ, Massey FJ. (1969) Introduction to statistical analysis. McGraw-Hill, New York.
- Dostal M, Jelinek R. (1971) Induction of cleft palate in rats with intra-amniotic corticoids, *Nature* **230**, 464.
- Eheman CR, Garbe P, Tuttle RM. (2003) Autoimmune thyroid disease associated with environmental thyroidal irradiation, *Thyroid* **13**, 453-464.
- Ergas Z, Avgil M, Ornoy A. (2005) Intrauterine growth restriction-etiology and consequences: What do we know about the human situation and experimental animal models? *Reprod Toxicol* **20**, 301-322.
- Ericson A, Kallen B. (1994) Pregnancy outcome in Sweden after the Chernobyl accident, *Environ Res* **67**, 149-159.
- Fára M, Jelínek R, Peterka M, Dostál M, Hrivnáková J. (1988) Orofacial Clefts. A Theoretical Basis for Their Prevention and Treatment. Universita Karlova, Praha.
- Ferguson MWJ. (1991) The orofacial region, in Wigglesworth JS, Singer DB (ed), *Textbook of Fetal and Perinatal pathology*, Blackwell Scientific Publication, London, pp. 843-880.
- Fogh-Andersen P. (1942) Inheritance of harelip and cleft palate. (Citovano podle Burian, 1954).
- Fukuda M, Fukuda K, Shimizu T, Andersen CY, Byskov AG. (2002) Parental periconceptional smoking and male: female ratio of newborn infants, *Lancet* **359**, 1407-1408.
- Gardo S. (1993) Spontaneous abortion and genetic natural selection, *Orv Hetil* **134**, 1459-1464.
- Gavlyiuk IuI, Sozans'kyi OO, Akopian GR, Lozyns'ka MR, Siednieva IA, Glynka PA, Iaborivs'ka OM, Grytsiuk II. (1992) Genetic monitoring in connection with the Chernobyl akcident, *Tsitol Genet* **26**, 15-29.
- Gembicki M, Sowinski J, Ruchala M, Bednarek J. (1991) Influence of radioactive contamination and iodine prophylaxis after the Czernobyl disaster on thyroid morphology and function of the Poznan region, *Endokrynol Pol* **42**, 273-298.
- Geoffroy Saint-Hilaire I. (1832-1837) Histoire générale et particulière des anomalies de l'organisation chez l'homme et les animaux, ouvrage comprenant des recherches sur les caracteres, la classification, l'influence physiologique et pathologique, les rapports généraux, les lois et les causes des monstruosités, des variétés et vices de conformation, ou traité de tératologie, I – III, Bailière, Paris (citováno podle Rychter, Jelínek 1978).
- Gilman J, Gilbert C, Gilman GC. (1948) Preliminary report on hydrocephalus, spina bifida and others congenital anomalies in rats produced by trypan blue, *S Afr J Med Sci* **13**, 47-90.
- Grandi C, Tapia JL, Marshall G. (2005) An assessment of the severity, proportionality and risk of mortality of very low birth weight infants with fetal growth restriction. A multicenter South American analysis, *J Pediatr (Rio J)* **81**, 198 – 204.
- Gregg NM. (1941) Congenital cataract following German measles in the mother, *Trans Ophthalmol Soc Aust* **3**, 35-45.
- Grossman CM, Morton WE, Nussbaum RH. (1996) Hypothyroidism and spontaneous abortion among Hanford, Washington, downwinders, *Arch Environ Health* **51**, 175-176.

- Hack M, Taylor HG, Drotar D, Schluchter M, Cartar L, Wilson-Costello D, Klein N, Friedman H, Mercuri-Minich N, Morrow M. (2005) Poor predictive validity of the Bayley Scales of Infant Development for cognitive function of extremely low birth weight children at school age, *Pediatrics* **116**, 333-341.
- Hale F. (1935) The relation of vitamin A to anophthalmos in pigs, *Am J Ophthalmol* **18**, 1087 (citováno podle Wilson JG, 1979).
- Hassold T, Quillen SD, Yamane JA. (1983) Sex ratio in spontaneous abortion, *Ann Hum Genet* **47**, 39-47.
- Hoar RM. (1984) Reproduction/Teratology, *Fundam Appl Toxicol* **4**, S335-S400, 1984.
- Hoskins D. (1948) Some effect of nitrogen mustard on the development of external body form in the rat, *Anat Rec* **102**, 493-512.
- Hovorakova M, Lesot H, Peterka M, Peterkova R. (2005a) The developmental relationship between the deciduous dentition and the oral vestibule in human embryo, *Anat Embryol (Berl)* **209**, 303-13.
- Hovorakova M, Lesot H, Peterkova R, Peterka M. (2005b). Origin of deciduous upper lateral incisors and its clinical aspects, *J Dent Res* (in press).
- Irgens LM, Lie RT, Ulstein M, Skeie Jensen T, Skjaerven R, Sivertsen F, Reitan JB, Strand F, Strand T, Egil Skjeldestad F. (1991) Pregnancy outcome in Norway after Chernobyl, *Biomed Pharmacother* **45**, 233-241.
- Jacob P, Kenigsberg Y, Goulko G, Buglova E, Gering F, Golovneva A, Kruk J, Demidchik EP. (2000) Thyroid cancer risk in Belarus after the Chernobyl accident: Comparison with external exposures, *Radiat Environ Biophys* **39**, 25-31.
- Jarolímkova S, Peterka M. (2003) Aby se narodilo zdravé, Chvojkovovo nakladatelství, Praha. s 157.
- James WH. (1996) Evidence that mammalian sex ratios at birth are partially controlled by parental hormone levels at the time of conception, *J Theor Biol* **180**, 271-286.
- James WH. (2002a) Periconceptual parental smoking and sex ratio of offspring, *Lancet* **360**, 1515.
- James WH. (2002b) Parental exposure to dioxin and offspring sex ratios, *Environ Health Perspect* **110**, A502.
- Jelínek R. (1977) The chick embryotoxicity screening test (CHEST). In: Method in prenatal toxicology: evaluation of embryotoxic effects in experimental animals. (D Neubert and HJ Merker, TE Kwasigroch with assistance R Kreft and A Bedürftig Eds.), pp. 381-386, Stuttgart: Thieme, 1977.
- Jelínek R, Peterka M. (1977) The role of mandible in mouse palatal development revisited, *J Cleft Palate* **14**, 211-221.
- Jelínek R, Peterka M. (1981a) Morphogenetic systems and in vitro techniques in teratology. In: Culture Techniques, Applicability for Studies on Prenatal Differentiation and Toxicity (D. Neubert and H. J. Merker, Eds.), pp. 553-557, Walter de Gruyter, Berlin - New York.
- Jelínek R, Peterka M (1981b) Method used in our laboratory in Prague for the Chick Embryotoxicity Screening Test (CHEST). In: Culture Techniques, Applicability for Studies on Prenatal Differentiation and Toxicity (D. Neubert and H. J. Merker, Eds.), pp. 599-602, Walter de Gruyter, Berlin - New York.
- Jelínek R, Rychter Z. (1981) Současné experimentální možnosti stanovení rizika embryotoxicity léků, *Cas Lek ces* **120**, 1309-1312.
- Jelínek R, Dostál M, Peterka M. (1983a) Rozštěp rtu a patra v obraze experimentu. Universita Karlova, Praha.
- Jelinek R, Pavlik A, Peterka M. (1983b) Glucocorticoid receptor-mediated teratogenesis in the chick embryo, *Teratog Carcinog Mutagen* **3**, 1-7.
- Jelinek R, Peterka M, Rychter Z. (1985) Chick embryotoxicity screening test – 130 substances tested, *Indian J Exp Biol* **23**, 588-595.
- Jelínek R, Rychter Z, Peterka M. (1976) Cs. Authors Certificate No. 2170/76, Prague.
- Jelínek R, Rychter Z, Peterka M. (1977) Method for testing of embryotoxicity on Chicken embryo. United States Patent 4 153 676.

- Jelínek R, Rychter Z, Peterka M. (1977) Method for testing of embryotoxicity on Chicken embryo. Great Britain Patent 1 542 381.
- Jelínek R, Rychter Z, Peterka M. (1982) Způsob testování embryotoxicity na zárodku kuřete. Autorské osvědčení č. 191501.
- Johnson EM, Newman LM, Gabel BEG, Boerner TF, Dansky LA. (1988) An analysis of the hydra assay's applicability and reliability as a developmental toxicity prescreen, *J Am Coll Toxicol* **7**, 111-126.
- Jongbloet PH, Roeleveld N, Groenewoud HM. (2002) Where the boys aren't: dioxin and the sex ratio, *Environ Health Perspect* **110**, 1-3.
- Karakashian AN, Chusova VN, Kryzhanovskaia MV, Lepeshkina TR, Martynovskaia TIu, Glushchenko SS, Gorbatiuk LA. (1997) A retrospective analysis of aborted pregnancy in women engaged in agricultural production in controlled areas of Ukraine, *Lik Sprava* **4**, 40-42.
- Khera KS. (1976) Significance of metabolic patterns in teratogenic testing for food safety, *Clin Toxicol* **9**, 773-790.
- Khoury MJ, Holtzman NA. (1987) On the ability of birth defects monitoring to detect new teratogens, *Am J Epidemiol* **126**, 136-43.
- Kimmel CA, Buelka-Sam J. (1981) *Developmental toxicology*. Raven Press, N.Y.
- Klepáček I, Jirsa M, Peterka M. (2001) Embryotoxicity of TPPS₄ and PS 3 photosensitizers in chicken embryo under different light conditions, *Neoplasma* **48**, 214-220.
- Knops NB, Sneeuw KC, Brand R, Hille ET, den Ouden LA, Wit JM, Verloove-Vanhorick PS. (2005) Catch-up growth up to ten years of age in children born very preterm or with very low birth weight, *BMC Pediatr* **5**, 26 (Epub ahead of print).
- Koupilova I, Vagero D, Leon DA, Pikhart H, Prikazsky V, Holcik J, Bobak M. (1998) Social variation in size at birth and preterm delivery in the Czech Republic and Sweden, 1989-91, *Paediatr Perinat Epidemiol* **12**, 7-24.
- Kristenová-Čermáková P, Peterka M, Lisi S, Lesot H, Peterková R. (2002) Postnatal lower jaw dentition in different phenotypes of tabby mice, *Connect Tissue Res* **43**, 283-288.
- Kristenová P, Peterka M, Lisi S, Gendrault J-L, Lesot H, Peterková R. (2002) Different morphotype of functional dentition in the lower molar region of tabby (EDA) mice, *Orthodont Craniofac Res* **5**, 205-214.
- Kucera J. (1989) *Pupulation Teratology*, Avicenum, Prague.
- Kunz E. (ed) (1986) *Report on Radiation Situation in CSSR at Chernobyl Accident*, Prague.
- Lazjuk GI, Nikolaev DL, Novikova IV. (1997) Changes in registered congenital anomalies in the Republic of Belarus after the Chernobyl accident, *Stem Cells* **15**, 255-260.
- Leenhouts HP, Brugmans MJP, Chadwick KH. (2000) Analysis of thyroid cancer data from the Ukraine after "Chernobyl" using a two-mutation carcinogenesis model, *Radiat Environ Biophys* **39**, 89-98.
- Lehman AJ, Laug EP, Woodard G, Draize HJ, Fitzhung OG, Nelson AA. (1949) Procedures for the appraisal of the toxicity of chemicals in food, *Food Drug Cosmet Law J* **4**, 412 (podle Wilsson JG, 1979).
- Lenz W. (1961) Kindliche Missbildungen nach Medikamenteinnahme während der graviditat? *Dtsch Med Wochenschr* **86**, 2555-2556.
- Lenz W, Knapp K. (1962) Die thalidomide-embryopathie, *Dtsch Med Wochenschrift* **87**, 1232 – 1242.
- Leridon H. (1977) *Human Fertility: The Basic Components*, Chicago University Press, Chicago.
- Leridon H. (1987) Spontaneous fetal mortality. Role of maternal age, parity and previous abortion, *J Gynecol Obstet Biol Reprod* **16**, 425-431.
- Lesot H, Vonesch JL, Peterka M, Turečková J, Peterková R, Ruch JV. (1996) Mouse molar morphogenesis revisited by three dimensional reconstruction: II) Spatial distribution of mitoses and apoptosis in cap to bell stages first and second upper molar teeth, *Int J Dev Biol* **40**, 1017-1031.
- Lesot H, Peterková R, Vonesch JL, Viriot L, Turečková J, Peterka M, Ruch JV. (1998) Early stages of tooth morphogenesis in mouse analyzed by 3-D reconstructions. *Europ J Oral Sci* **106**, 64-70.

- Lillie FR. (1917) The free-martin: a study of the action of sex hormones in the fetal life of cattle, *J Exp Zool* 23, 371 (citováno podle Wilson JG, 1979).
- Lisi S, Peterková R, Kristenová P, Vonesch JL, Peterka M, Mitolo V, Lesot H. (2001) Crown morphology and pattern of odontoblast differentiation in lower molars of Tabby mice, *J Dent Res* 80, 1980-1983.
- Lohstroh PN, Overstreet JW, Stewart DR, Nakajima ST, Cragun JR, Boyers SP, Lasley BL. (2005) Secretion and excretion of human chorionic gonadotropin during early pregnancy, *Fertil Steril* 83, 1000-1011.
- Lukacs GL, Szakall S, Kozma I, Gyory F, Balazs G. (1997) Changes in the epidemiological parameters of radiation-induced illnesses in East Hungary 10 years after Chernobyl, *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd* 114, 375-377.
- Mastroiacovo P, Spagnolo A, Marni E, Meazza L, Bertollini R, Segni G, Borgna-Pignatti C. (1988) Birth defects in the Seveso area after TCDD contamination, *JAMA* 259, 1668-1672.
- Matejcek Z, Dytrych Z, Tyl J. (1991) Lehké mozkové dysfunkce. Ministerstvo zdravotnictví, Praha.
- McBride WG. (1961) Thalidomide and congenital abnormalities, *Lancet* 2, 1358.
- McMillen MM. (1979) Differential mortality by sex in fetal and neonatal deaths, *Science* 204, 89-91.
- Michnovicz JJ, Naganuma H, Hersheopf RJ, Bradlow HL, Fishman J. (1988) Increased urinary catechol estrogen excretion in female smokers, *Steroids* 52, 69-83.
- Miller JF, Williamson E, Glue J, Gordon YB, Grudzinskas JG, Sykes A. (1980) Fetal loss after implantation. A prospective study, *Lancet* 2, 554-556.
- Mizuno R. (2000) The male/female ratio of fetal deaths and births in Japan, *Lancet* 356, 738-739.
- Mocarelli P, Brambilla P, Gerthoux PM, Patterson DG Jr, Needham LL. (1996) Change in sex ratio with exposure to dioxin, *Lancet* 348, 409.
- Mocarelli P, Gerthoux PM, Ferrari E, Patterson DG Jr, Kieszak SM, Brambilla P, Vincoli N, Signorini S, Tramacere P, Carreri V, Sampson EJ, Turner WE, Needham LL. (2000). Paternal concentration of dioxin and sex ratio of offspring, *Lancet* 355, 1858-1863.
- Moore KL, Persaud TVN. (1993) *The developing human*. WB Saunders Company, Philadelphia.
- Mustonen T, Ilmonen M, Pummila M, Kangas AT, Laurikkala J, Jaatinen R, Pispä J, Gaide O, Schneider P, Thesleff I, Mikkola ML. (2004) Ectodysplasin A1 promotes placodal cell fate during early morphogenesis of ectodermal appendages, *Development* 131, 4907-19.
- New DA. (1966) Development of rat embryos cultured in blood sera, *J Reprod Fertil* 12, 509-524.
- Nicolich MJ, Huebner WW, Schnatter AR. (2000) Influence of parental and biological factors on the male birth fraction in the United States: an analysis of birth certificate data from 1964 through 1988, *Fertil Steril* 73, 487-492.
- Nielsen GL, Norgard B, Puho E, Rothman KJ, Sorensen HT, Czeizel AE. (2005) Risk of specific congenital abnormalities in offspring of women with diabetes, *Diabet Med* 22, 693-696.
- Nikiforov Y, Gnepp DR. (1994) Pediatric thyroid cancer after the Chernobyl disaster. Pathomorphologic study of 84 cases (1991-1992) from the Republic of Belarus, *Cancer* 74, 748-766.
- Niklová V. (1992) Výsledky těhotenství na okrese Zlín za léta 1989-1990. Diplomová práce, Teratologická laboratoř ÚEM AVČR.
- Odlind V, Haglund B, Pakkanen M, Otterblad Olausson P. (2003) Deliveries, mothers and newborn infants in Sweden, 1973-2000. Trends in obstetrics as reported to the Swedish Medical Birth Register, *Acta Obstet Gynecol Scand* 82, 516-28.
- Ogris E. (1997) Exposure to radioactive iodine in pregnancy: significance for mother and child, *Acte Med Austriaca* 24, 150-153.
- Penkava J, Peterka M. (1977) Anatomické změny horní čelisti a zubního oblouku po Schweckendiekovy operaci rozštěpu patra, *Cs stomatol* 77, 297-311.

- Peterka M, Penkava J. (1975) Růst šířky horního zubního oblouku u vzorku české populace, *Cs stomatol* **75**, 44-50.
- Peterka M, Dostál M. (1977) Influence of cleft palate on growth of the maxilla in mouse embryo, *J Cleft Palate* **14**, 206-210.
- Peterka M, Jelínek R. (1978) Differences in the size of palatal processes in mouse embryos with cleft palate induced in two critical periods, *J Cleft Palate* **15**, 13-19.
- Peterka M. (1979) Prenatální růst a poškození orofaciálního komplexu, *Kandidátská disertační práce*, Praha.
- Peterka M, Jelínek R, Benesova O. (1980a) Cardiotoxicity of drugs detected on chicken embryos, *Arch Toxicol Suppl* **4**, 413-4.
- Peterka M, Mullerova Z, Penkava J. (1980b) Causes of the developmental orthodontic anomalies in patient's with a total unilateral cleft, *Cs Stomatol* **80**, 100-109.
- Peterka M. (1983) Klinické implikace experimentálního modelu. In: Rozštěp rtu a patra v obraze experimentu, Jelínek R, Dostal M, Peterka M, Universita Karlova, Praha.
- Peterka M, Jelínek R. (1983) Origin of hydrocortisone induced orofacial clefts in the chick embryo, *J Cleft Palate* **20**, 35-46.
- Peterka M, Müllerová Ž. (1983) Tooth size in children with cleft lip and palate, *J Cleft Palate* **20**, 307-313.
- Peterka M. (1984) Upper alveolar arch development in patient's with total bilateral cleft lip and palate, *Acta Chir Plast* **26**, 30-38.
- Peterka M, Jelínek R, Fára M. (1985a) Rozbor příčin vzniku vrozených vad z pohledu teratologa, *Čs Gynekol* **50**, 363-368.
- Peterka M, Jelínek R, Fára M, Černý M. (1985b) Uplatnění teratologa v lékařské praxi, *Čs Pediat* **40**, 657-660.
- Peterka M, Havránek T, Jelínek R. (1986) Dose-response relationships in chick embryos exposed to embryotoxic agents, *Folia Morphol* **34**, 69-77.
- Peterka M. (1988) Human orofacial clefts, their classification, incidence, etiology and recurrence risk. In: Fára M, Jelínek R, Peterka M, Dostál M, Hrivnáková J. Orofacial Clefts. A Theoretical Basis for Their Prevention and Treatment. Universita Karlova, Praha.
- Peterka M, Jelinek R. (1989) Teratogenní účinky léčiv. Chemie a léčiva. 16. svazek cyklu organická chemie, ÚOCHB, Praha.
- Peterka M, Fara M. (1990) Jsou vitamíny embryotoxické? *Prakt Lek* **70**, 567-569.
- Peterka M, Jelinek R. (1990) K otázce embryotoxicity organických rozpustidel užívaných v kožedelném průmyslu, *Plzen lek Sborn* **59**, 79-85.
- Peterka M, Jelínek R, Pavlík A. (1992) Embryotoxicity of 25 psychotropic drugs: A study using CHEST, *Reprod Toxicol* **6**, 367-374.
- Peterka M, Tvrdek M, Müllerová Z. (1993) Tooth eruption in patients with cleft lip and palate, *Acta Chir Plast* **35**, 3-4.
- Peterka M, Miler I, Jelínek R. (1994a) Teratogenic effect of bilirubin – a study using CHEST, *Func Develop Morphol* **4**, 29-32.
- Peterka M, Sarin S, Roeder E, Wiedenfeld H, Halaskova M. (1994b) Differing embryotoxic effects of senecione and senecione-N-oxide on the chick embryo, *Func Develop Morphol* **4**, 89-92.
- Peterka M, Tvrdek M, Likovsky M, Peterkova R, Fara M. (1994c) Maternal hyperthermia and infection as one of possible causes of orofacial clefts, *Acta Chir Plast* **36**, 114-118.
- Peterka M, Peterková R, Likovský Z, Tvrdek M, Fára M. (1995) Incidence of orofacial clefts in Bohemia (Czech Republic) in 1964-1992, *Acta Chirurg Plast* **37**, 122-126.
- Peterka M, Peterková R, Halašková M, Tvrdek M, Fára M, Likovský Z. (1996a) Sex differences in the incidence of orofacial clefts and the question of primary prevention in families with genetic risk, *Acta Chir Plast* **38**, 57-60,
- Peterka M, Peterková R, Likovský Z. (1996b) 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. (1996c) Timing of exchange of the upper deciduous and permanent teeth in boys with three types of orofacial clefts. *Cleft Palate-Cran J* **33**, 318-323,

- Peterka M, Tuček M, Veselý D. (1996d) Embryotoxicity of nine seed mordant on the Chick embryo - Method CHEST, *Acta Vet Brno* **65**, 213-217.
- Peterka M, Peterková R, Likovský Z. (1997a) Different embryotoxic effect of vitamin A and B-carotene detected in the chick embryo, *Acta Chir Plast* **39**, 91-96.
- Peterka M, Peterková R, Likovský Z. (1997b) Cleft beak induced by hydrocortisone in the chick is prevented by increased cell division after experimental reduction of amniotic fluid, *Anat Embryol* **195**:387-391.
- Peterka M, Peterková R, Tvrdek M, Kuderová J, Likovský Z. (2000) Significant differences in the incidence of orofacial clefts in fifty-two Czech districts between 1983 and 1997, *Acta Chir Plast* **4**, 124-129.
- Peterka M, Klepáček I. (2001) Light irradiation increases embryotoxicity of photodynamic sensitizers (5-aminolevulinic acid and Protoporphyrin IX) in chick embryos, *Reprod Toxicol* **15**, 111-116.
- Peterka M, Lesot H, Peterková R. (2002a) Body weight in mouse embryos specifies staging of tooth development, *Connect Tissue Res* **43**, 186-190.
- Peterka M, Mandys V, Viale M, Caffaggi S, Peterková R, Esposito M. (2002b) Embryotoxicity of the cisplatin and cisplatin - procaine complex DPR studied in chick embryonic model, *Neoplasma* **49**, 394-400.
- Peterka M, Peterková R, Likovský Z. (2004) Chernobyl: prenatal loss of four hundred male fetuses in the Czech Republic, *Reprod Toxicol* **18**, 75-79.
- Peterkova R.(1983) Dental lamina develops even within the mouse diastema, *J Craniofac Genet Develop Biol* **3**,133-142.
- Peterková R, Peterka M, Ruch JV. (1993a) Morphometric analysis of potential maxillary diastemal dental anlagen in three strains of mice, *J Cran Genet Dev Biol* **13**, 213-222.
- Peterková R, Peterka M, Vonesch JL, Ruch JV. (1993b) Multiple developmental origin of the upper incisor in mouse: Histological and computer assisted 3-D-reconstructions, *Int J Develop Biol* **37**, 581-588.
- Peterková R, Peterka M, Vonesch JL, Ruch JV. (1995) The adult upper jaw tooth formula in mouse results from reduction of the embryonic dental pattern, *Connect Tissue Res* **32**, 77
- Peterková R, Lesot H, Vonesch JL, Peterka M, Ruch JV. (1996) Mouse molar morphogenesis revisited by three dimensional reconstruction: I) Analysis of initial stages of the first upper molar development revealed two transient buds, *Int J Dev Biol* **40**, 1009-1016.
- Peterkova R, Peterka M, Viriot L, Lesot H. (2000) Dentition development and budding morphogenesis, *J Craniofac Genet Dev Biol* **20**,158-172.
- Peterkova R, Kristenova P, Lesot H, Lisi S, Vonesch JL, Gendrault JL, Peterka M. (2002a) Different morphotypes of the tabby (EDA) dentition in the mouse mandible results from a defect in the mesio-distal segmentation of the dental epithelium, *Orthodont Craniofac Res* **5**, 215-226.
- Peterkova R, Peterka M, Viriot L, Lesot H. (2002b) Development of the vestigial tooth primordia as part of odontogenesis, *Connect Tissue Res* **43**,120-128.
- Peterkova R, Peterka M, Lesot H. (2003) The developing mouse dentition: a new tool for apoptosis study, *Ann N Y Acad Sci* **1010**, 453-66.
- Peterkova R, Lesot H, Viriot L, Peterka M. (2005) The supernumerary cheek tooth in tabby/EDA mice - a reminiscence of the premolar in mouse ancestors, *Arch Oral Biol* **50**,219-25.
- Poppe K, Glinioer D. (2003) Thyroid autoimmunity and hypothyroidism before and during pregnancy, *Hum Reprod Update* **9**, 149-161.
- Pratt AE. (1966) The Pierre Robin syndrome, *Brit J Radiol* **39**, 390-392.
- Racowsky C. (2002) High rates of embryonic loss, yet high incidence of multiple births in human art: is this paradoxical? *Theriogenology* **57**, 87-96.
- Report of the Commission on Drug Safety. (1964) Federation of American Societies for Experimental Biology, Washington D.C. (citováno podle Wilson JG, 1979).
- Romanova LK, Pokrovskaja MS, Mladkovskaja TB, Kulikova GV, Volkova EV, Safronova LA, Zhorova ES, Beliaev IK, Gerasiuto GI, Sivakoba IS. (1998) Morphological

- characteristics of lung in embryos and fetuses in women living in region contaminated with radionuclides after at the Chernobyl power plant, *Arkh Patol* **60**, 32-36.
- Rosa FW. (1983) Teratogenicity of isotretinoin, *Lancet* **2**, 513
- Ruffing L. (1977) Evaluation of thalidomide children, *Birth Defects* **13**, 287-300.
- Rychter Z, Jelínek R. (1978) *Základy experimentální teratologie*, Avicenum, Praha.
- Salmon MA. (1978) *Developmental defects and syndromes*. HM+M Publishers Ltd, Aylesbury, England.
- Shepard TH. (1980) *Catalog of Teratogenic Agents*. J Hopkins Univ Press, Baltimore, London (3rd edition).
- Shepard TH. (1986) Human Teratogenicity, *Adv Pediatr* **33** 225-268.
- Schardein JL. (2000) *Chemically induced birth defects*, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel.
- Scherb H, Weigelt E, Bruske-Hohlfeld I. (2000) Regression analysis of time trends in perinatal mortality in Germany 1980-1993, *Environ Health Perspect* **108**, 159-165.
- Slípka J, Jelínek R, Peterka M. (1980) Comparative morphogenesis of the secondary palate related to the skull development, *Folia Morphol* **28**, 207-211.
- Shizuma K, Iwatani K, Hasai H, Nishiyama F, Kiso Y, Hoshi M, Sawada S, Inoue H, Suzuki A, Hoshita N, et al. (1987) Observation of fallout in Hiroshima caused by the reactor accident at Chernobyl, *Int J Radiat Biol* **51**, 201-207.
- Sperling K, Pelz J, Wegner RD, Dorries A, Gruters A, Mikkelsen M. (1994) Significant increase in trisomy 21 in Berlin nine month after the Chernobyl reactor accident: temporal correlation or causal relation? *BMJ* **309**, 158-162.
- Stenke L, Axelsson B, Ekman M, Larsson S, Reizenstein P. (1987) Radioactive iodine and cesium in travelers to different parts of Europe after Chernobyl accident, *Acta Oncol* **26**, 207-210.
- Stockard CHR. (1921) Developmental rate and structural expression: an experimental study of twins, "double monsters" and single deformities, and the interaction among embryonic organs during their origin and development, *Amer J Anat* **28**, 115 (citováno podle Rychter, Jelínek 1978).
- Tatham LM, Bove FJ, Kaye WE, Spengler RF. (2002) Population exposure to I-131 releases from Hanford Nuclear Reservation and preterm birth, infant mortality, and fetal death, *Int J Hyg Environ Health* **205**, 41-48.
- Tousey S. (1905) Discussion of a paper by Edw. C. Titus, *J Adv Therap* **23**, 650 (citováno podle Wilson JG, 1979).
- Uher J, Dvořák K. (1967) *Léky v rané ontogenezi člověka*. Spofa, Praha.
- Ulstein M, Skeie Jensen T, Irgens LM, Lie RT, Sivertsen E. (1990) Outcome of pregnancy in one Norwegian county 3 years prior to and 3 years subsequent to the Chernobyl accident, *Acta Obstet Gynecol Scand* **69**, 277-280.
- U.S. Food and Drugs Administration (USFDA) (1966) *Guidelines for reproduction studies for safety evaluation of drugs for human use*. U.S. FDA, Washington, D.C.
- Vartiainen T, Kartovaara L, Tuomisto J. (1999) Environmental chemicals and changes in sex ratio: analysis over 250 years in Finland, *Environ Health Perspect* **107**, 813-815.
- Vatten LJ, Skjaerven R. (2004) Offspring sex and pregnancy outcome by length of gestation, *Early Hum Dev* **76**, 47-54.
- Viriot L, Peterková R, Vonesch JL, Peterka M, Ruch JV, Lesot H. (1997) Mouse molar morphogenesis revisited by three-dimensional reconstruction. III. Spatial distribution of mitoses and apoptoses up to bell-stages first lower molar teeth, *Int J Dev Biol* **41**, 679-690,
- Viriot L, Lesot H, Vonesch JL, Ruch JV, Peterka M, Peterková R. (2000) The presence of rudimentary odontogenic structures in mouse embryonic mandible requires reinterpretation of developmental control of first lower molar histomorphogenesis, *Int J Dev Biol* **44**, 233-240.
- Viriot L, Peterková R, Peterka M, Lesot H. (2002) Evolutionary implications of the occurrence of two vestigial tooth germs during early odontogenesis in mouse lower jaw, *Connect Tissue Res* **43**, 129-133.
- Vrozené vady 2002. (2003) *Zdravotnická statistika*, ÚZIS ČR.
- Warkany J. (1977) History of teratology/chapter 1, in JG. Wilson, FC. Fraser (eds.), *Handbook of Teratology*, Plenum Press, New York and London, pp. 3 - 45.

- Wells JC. (2000) Natural selection and sex differences in morbidity and mortality in early life, *J Theor Biol* **202**, 65-76.
- WHO (1967) Principles for testing of drugs for teratogenicity. Technical Report Series, 364, WHO.
- Wilson JG. (1977) Current status of teratology/chapter 2, in JG. Wilson, FC. Fraser (eds.), *Handbook of Teratology*, Plenum Press, New York and London, pp. 47-74.
- Wilson JG. (1979) The evolution of teratological testing, *Teratology* **20**, 205-212.
- Yamazaki JN, Schull WJ. (1990) Perinatal loss and neurological abnormalities among children of the atomic bomb. Nagasaki and Hiroshima revisited, 1949 to 1989, *JAMA* **264**, 605-609.
- Zoeller TR, Dowling AL, Herzig CT, Iannacone EA, Gauger KJ, Bansai R. (2002) Thyroid hormone, brain development, and the environment, *Environ Health Perspect*; **110**, 355-361.

13. Seznam vybraných impaktovaných publikací autora

1. **Peterka M**, Dostal M. Influence of cleft palate on growth of the maxilla in mouse embryos. *J Cleft Palate* 14:206-210, 1977. **IF:0.994**
2. Jelinek R, **Peterka M**. The role of mandible in mouse palatal development revisited. *J Cleft Palate* 14:211-221, 1977. **IF:0.994**
3. **Peterka M**, Jelinek R. Differences in the size of palatal processes in mouse embryos with cleft palate induced in two critical periods. *J Cleft Palate* 15:13-19, 1978. **IF:0.994**
4. **Peterka M**, Jelinek R, Benesova O. Cardiotoxicity of drugs detected on chicken embryos. *Arch Toxicol Suppl* 4:413-414, 1980. **IF:1.683**
5. Jelinek R, Pavlik A, **Peterka M**. Glucocorticoid receptor-mediated teratogenesis in the chick embryo. *Teratogen Carcin Mut* 3:1-7, 1983. **IF:1.018**
6. **Peterka M**, Jelinek R. Origin of hydrocortisone induced orofacial clefts in the chick embryo. *J Cleft Palate* 20:35-46, 1983. **IF:0.994**
7. **Peterka M**, Mullerova Z. Tooth size in children with cleft lip and palate. *J Cleft Palate* 20:307-313, 1983. **IF:0.994**
8. **Peterka M**, Jelinek R, Pavlik A. Embryotoxicity of 25 psychotropic drugs: A study using CHEST. *Reprod Toxicol* 6:367-374, 1992. **IF:1.277**
9. Likovsky Z, **Peterka M**, Peterkova R. Development of nucleolar apparatus in the chick primitive erythroid cells. *Anat Embryol* 189:539-544, 1994. **IF:1.511**
10. **Peterka M**, Peterkova R, Likovsky Z. Timing of exchange of the upper deciduous and permanent teeth in boys with three types of orofacial clefts. *Cleft Palate-Cran J* 33:318-323, 1996. **IF: 0.994**
11. **Peterka M**, Peterkova R, Likovsky Z. Teratogenic and lethal effects of long-term hyperthermia and hypothermia in the chick embryo. *Reprod Toxicol* 10:327-332, 1996. **IF:1.277**
12. **Peterka M**, Tucek M, Vesely D. Embryotoxicity of nine seed mordant on the Chick embryo - Method CHEST. *Acta Vet Brno* 65:213-217, 1996. **IF:0.336**
13. **Peterka M**, Peterkova R, Likovsky Z. Cleft beak induced by hydrocortisone in the chick is prevented by increased cell division after experimental reduction of amniotic fluid. *Anat Embryol* 195:387-391, 1997. **IF:1.511**
14. Ruch JV, Lesot H, Peterkova R, **Peterka M**. Evolving rodent dentition. *BioEssays* 19:1041, 1997. **IF:7.649**

15. **Peterka M**, Peterkova R, Vonesch JL, Ruch JV, Cam Y, Lesot H. Position and growth of upper and lower tooth primordia in prenatal mouse - 3D study. *J Craniofac Genet Dev Biol* 20:35-43, 2000. **IF:0.920**
16. **Peterka M**, Klepacek I. Light irradiation increases embryotoxicity of photodynamic sensitizers (5-aminolevulinic acid and Protoporphyrin IX) in chick embryos. *Reprod Toxicol* 15:111-116, 2001. **IF:1.277**
17. Klepacek I, Jirsa M, **Peterka M**. Embryotoxicity of TPPS4 and PS 3 photosensitizers in chicken embryo under different light conditions. *Neoplasma* 48:214-220, 2001. **IF:0.448**
18. **Peterka M**, Lesot H, Peterkova R. Body weight in mouse embryos specifies staging of tooth development. *Connect Tissue Res* 43:186-190, 2002. **IF:0.901**
19. **Peterka M**, Mandys V, Viale M, Caffaggi S, Peterkova R, Esposito M. Embryotoxicity of the cisplatin and cisplatin - procaine complex DPR studied in chick embryonic model. *Neoplasma* 49:392-398, 2002. **IF:0.448**
20. Smahel Z, Trefny P, Formanek P, Mullerova Z, **Peterka M**. Three-dimensional Morphology of the Palate in Subjects with Isolated Cleft Palate at the Stage of Permanent Dentition. *Cleft Palate Craniofac J* 40:577-584, 2003. **IF:0.888**
21. Ognio E, Lapide M, Ottone M, Mandys V, **Peterka M**, Parodi B, Viale M. Embryo-lethal and teratogenic effect of the new platinum compound DPR in pregnant mice. *Arch Toxicol* 77:584-90, 2003. **IF:1.098**
22. Smahel Z, Trefny P, Formanek P, Müllerova Z, **Peterka M**. Three-dimensional morphology of the palate in subjects with unilateral complete cleft lip and palate at the stage of permanent dentition. *Cleft Palate Craniofac J* 41:416-23, 2004. **IF:0.888**
23. Trefny P, Smahel Z, Formanek P, **Peterka M**. Three-Dimensional Analysis of Maxillary Dental Casts Using Fourier Transform Profilometry: Precision and Reliability of the Measurement. *Cleft Palate-Craniofac J* 41:20-26, 2004. **IF:0.888**
24. **Peterka M**, Peterkova R, Likovsky Z.: Chernobyl: prenatal loss of four hundred male fetuses in the Czech Republic. *Reprod Toxicol* 18:75-79, 2004. **IF:1.868**
26. Hovorakova M, Lesot H, **Peterka M**, Peterkova R. The developmental relationship between the deciduous dentition and the oral vestibule in human embryo. *Anat Embryol* 209:303-13, 2005. **IF:1.559**
27. Hovorakova M, Lesot H, Peterkova R, **Peterka M**. The Origin of the Upper Lateral Incisor in Human and its Clinical Aspects. *J Dental Res* (in press) **IF:2.702**
28. Boran T, Lesot H, **Peterka M**, Peterkova R. Increased apoptosis during morphogenesis of the lower cheek teeth in tabby/EDAmice. *J Dent Res*. 84:228-233, 2005 **IF:2.702**
29. Peterkova R, Lesot H, Viriot L, **Peterka M**. The supernumerary cheek tooth in tabby/EDA mice-a reminiscence of the premolar in mouse ancestors. *Arch Oral Biol*. 50:219-25, 2005 **IF: 1.098**
30. Peterkova R, Lesot H, **Peterka M**. Phylogenetic memory of developing mammalian dentition. *J Exp Zool Part B - Molecular and Developmental Evolution*, (in press) **IF: 1.854**