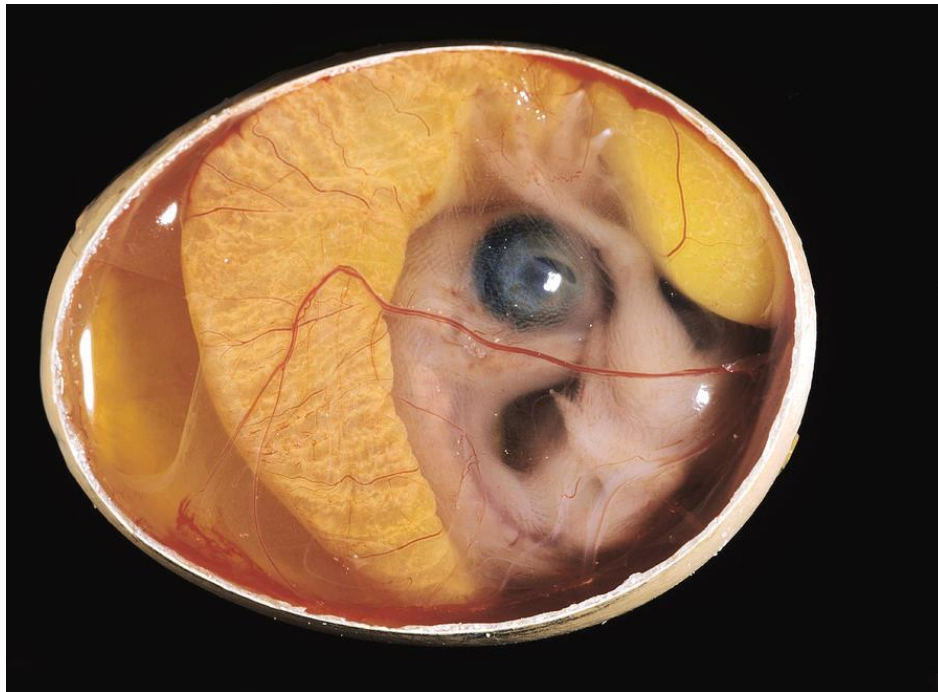


# Metody vývojové biologie

-

*Gallus gallus f. domestica* – kuřecí embryo



# Proč kuře?

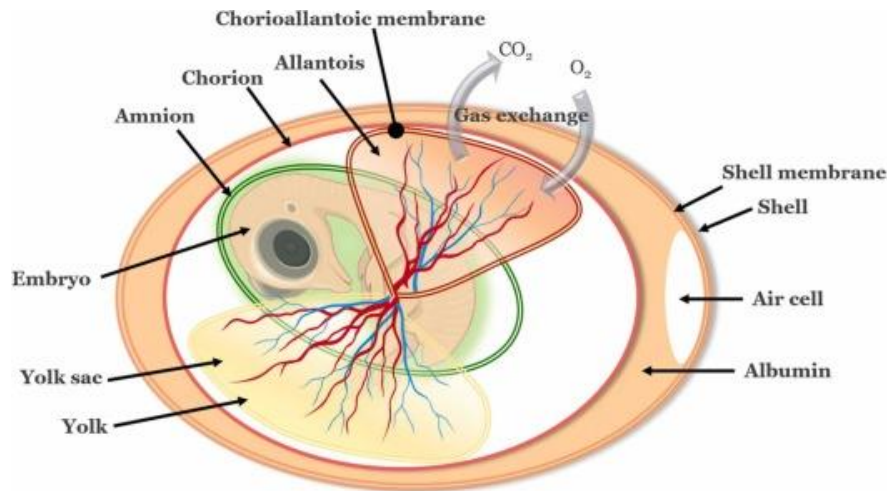
- časný vývoj podobný savcům
- homologie v genomu člověka a kuřete
- jednoduché na chov (líheň 37,8 ° C)
- rychlý vývoj – přibližně 21 dní
- legislativa – kuřecí embrya nejsou považována za experimentální zvířata
- *In ovo* - jednoduchá manipulace a snadno ovlivnitelný vývoj přímo ve vajíčku

# Význam kuřecího modelu

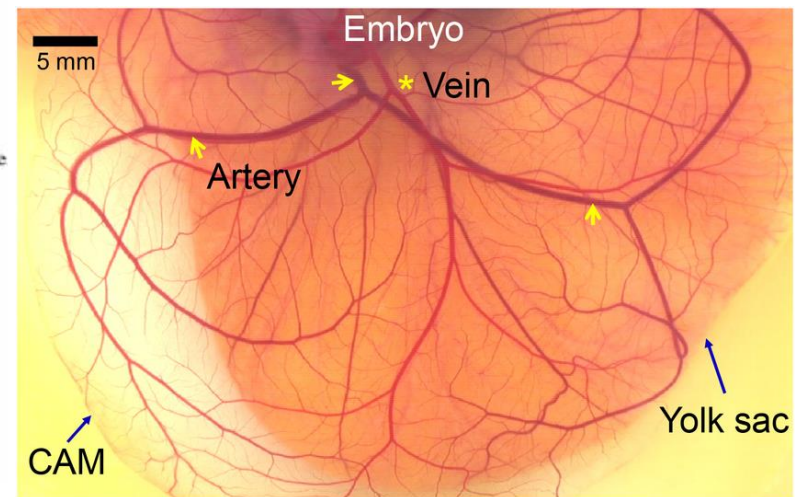
- spousta buněčných a molekulárních pochodů ve vývoji byla popsána poprvé právě u kuřete:
- migrace buněk neurální lišty
- určení dorzo-ventrální osy neurální trubice
- vývoj končetin
- tvorba krevních cév
- segmentace somitů
- určení pravo-levé asymetrie těla

# Chorioallantoic membrane (CAM) assay

- CAM: allantois a chorion srůstají 6.-7. ED
- Funkce CAM: výměna plynů a příjem vápníku z porézní skořápky, exkrece sodíku a chloridů z allant.vaku, rezervoár odpadních produktů



Ribatti 2022

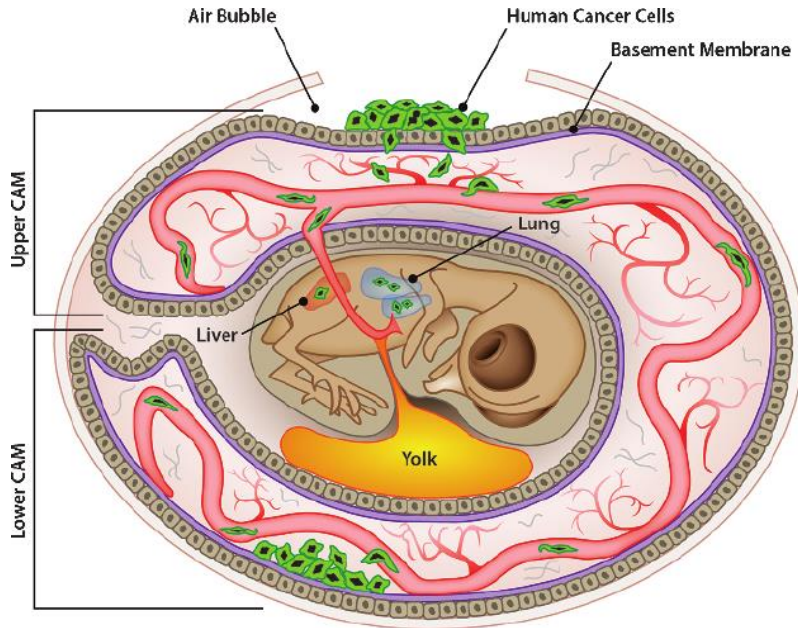


Kweon-Ho Nam et al., 2015

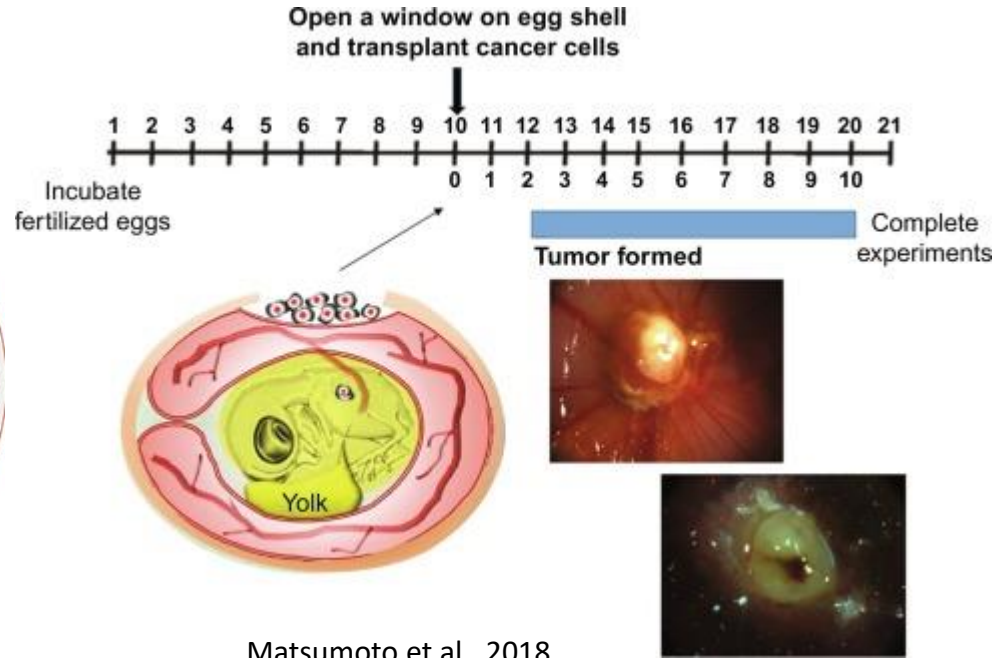
# Chorioallantoic membrane (CAM) assay

- Murphy, 1913 – inokulace „Jensen rat sarcoma“ na CAM kuřecího embrya
- Před E18 není imunitní systém kuřat plně vyvinutý - imunodeficientní prostředí
- Studium angiogeneze, růstu a invazivity nádorových buněk a metastazování
- Hodnocení „distribuce“ léků a terapeutických látek

# Chorioallantoic membrane (CAM) assay



KEY:  
■ Blood Vessel    ■ Cancer Cell       Epithelium  
— Connective Tissue       Basement Membrane

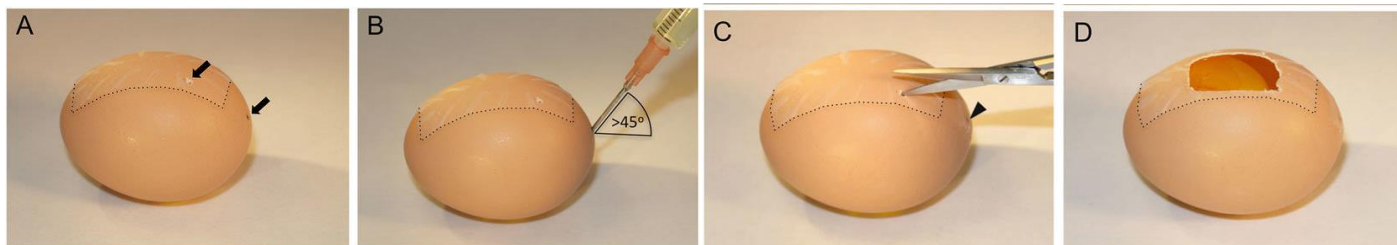


Liu et al., 2013

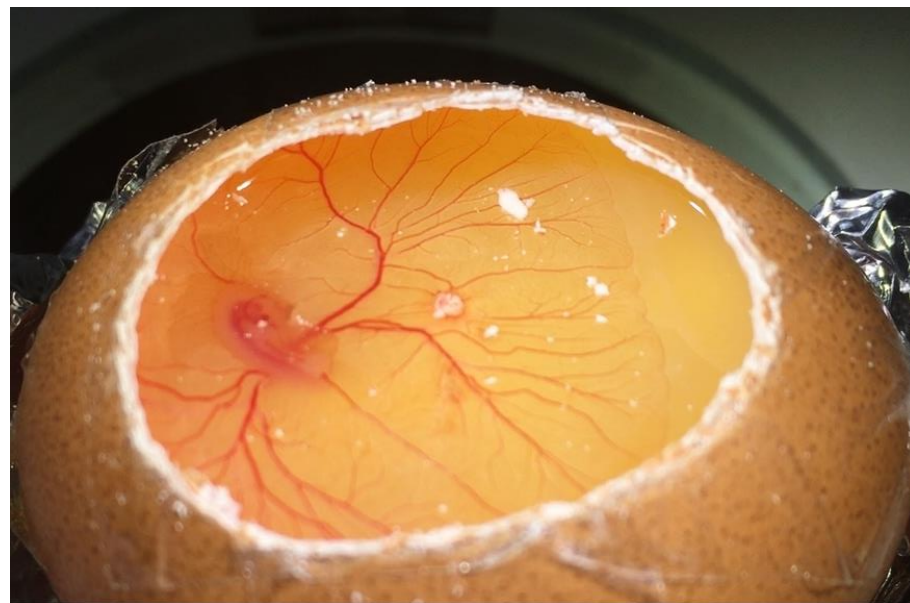
# Praktická část

- Seznámení se s *In ovo* přístupem
- Implantace kuliček
  - Testování efektu určitého morfogenu na vývoj vybrané tkáně
  - Kuličky (200 um) jsou nasáklé morfogenem, který se po aplikaci pozvolna uvolňuje do tkáně
- Transplantace tkáně (chiméry)

# Inkubace a manipulace



- Vývoj embrya v oplodněném vejci v laboratoři začíná vložením vajec do inkubátoru (37,8 °C, konstantní vlhkost)
- Vejce musí být položeno na stranu (A)
- Po 1,5 dni (cca 36 hodinách = HH 10) odsáváme bílek (embryo klesne) (B), vystříháme drobný otvor do skořápky (C), který následně přelepíme a vejce vracíme zpět do inkubátoru
- Po cílené manipulaci (injikaci, implantaci, transplantaci..) přelepíme otvor a inkubujeme do odběru (D)





# Nastavení stereoskopu

1. Vložit otevřené vajíčko ve stojánek(A)  
pod preparační stereoskop (B)
2. Zaostrit pomocí velkého šroubu (C)
3. Nastavit osvětlení (D)
4. Dostatečně přiblížit pomocí malého šroubu (E)
5. Opět doostřit pomocí velkého šroubu (C)



1. Otevření vajíčka

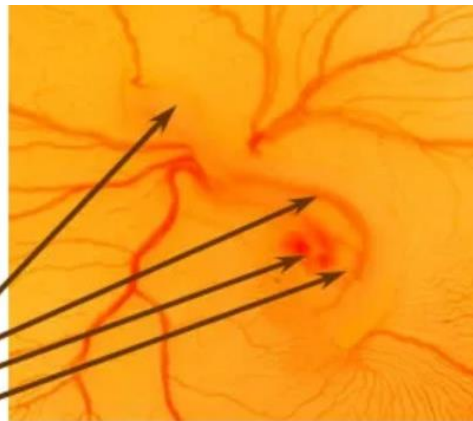
2. Určení stádia podle Hamburgera a Hamiltona



# Určení orgánů a stádia – Hamburger a Hamilton

HH 15

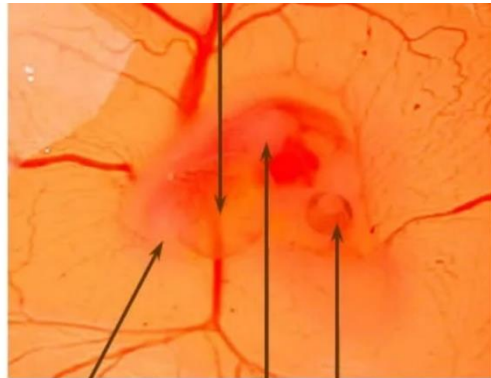
ocasní část  
neurální trubice  
vyvíjející se srdce  
vyvíjející se mozek



allantois

HH 20

končetinový pupen nohy



oko

končetinový pupen křídla

HH 25

vyvíjející se mozek  
oko  
dolní končetina  
horní končetina



stádiování podle Viktora Hamburgera  
a Howarda Hamiltona  
publikováno v roce 1951

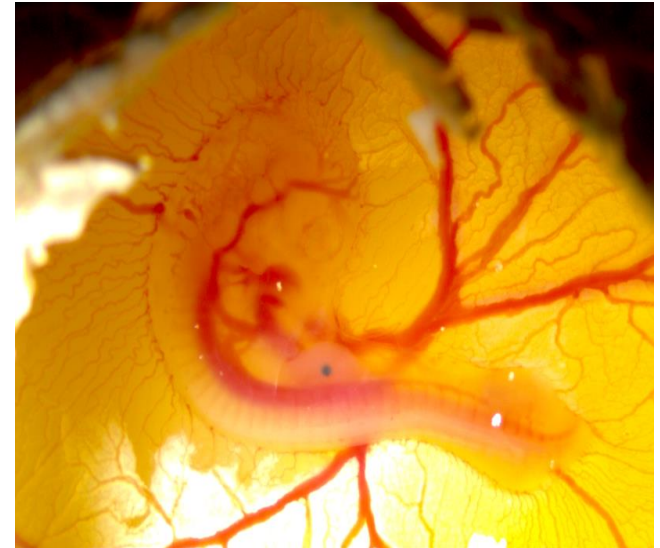
založeno na podrobném popisu  
viditelných morfologických znaků  
(orgány, počty somitů) a době vývoje

pro lepší pozorování je možno embrya  
obarvit kapkou neutrální červeně

# Implantace - postup

## Implantace

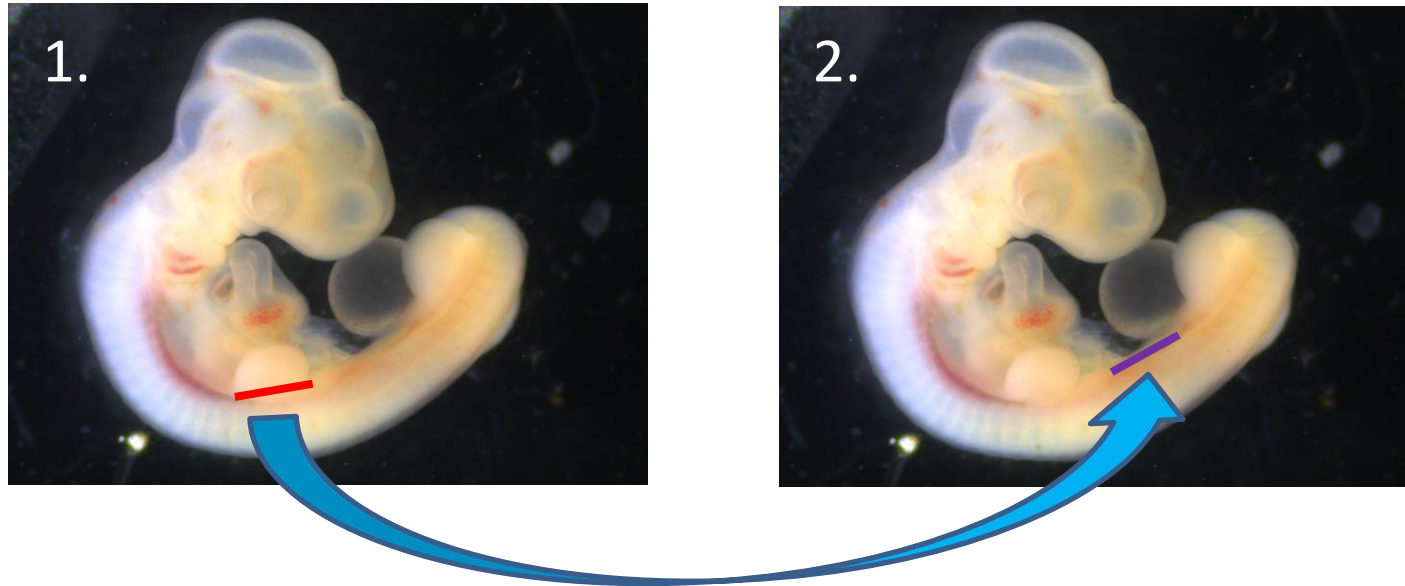
- Do skořápky vystříhnete otvor, tak abyste se dostali k embryu
- Odstraňte chorion a amnion nad místem implantace (končetinový pupen nebo postoptický region)
- Dbejte na jemnou manipulaci, aby nedošlo k porušení žloutku, cév, nebo zranění samotného embrya
- Pomocí pinzety přesuňte kuličku z Petriho misky do vajíčka
- Proveďte vpich do tkáně pomocí jedné plošky pinzety
- Uchopte kuličku opatrně pinzeta a zanořte ji tak hluboko, až si budete jistí, že je uvnitř tkáně



# Po implantaci...

- došlo k úspěšné implantaci (kulička je ve tkáni-  
vhodné zkontrolovat např. druhý den)
- vajíčko se přelepí průhlednou lepicí páskou
- vajíčko tužkou popíšeme!
- vajíčko se uloží zpět do líhně (37,8 °C)
- po požadované době inkubace otevření vajíčka
- kontrola fenotypu embrya
- následné zpracování cílové tkáně

# Transplantace tkáně (chiméry)



- U jednoho embrya (po narušení membrán nad místem manipulace) odřízneme horní končetinový pupen, přeneseme ho opatrně pomocí pasteurovy pipety do druhého vajíčka
- U druhého embrya narušíme membrány nad místem transplantace, lehce nařízneme povrchovou vrstvu tkáně a pomocí pinzety se snažíme končetinový pupen dárce umístit do tohoto místa

# Vyjmutí embrya z vajíčka



Nejdříve je nutné přerušit cévy a závěsy, posléze embryo vytáhnout pomocí pinzet (když to nejde, výborně poslouží obyčejná plastová lžička)

Vyjmutí embrya slouží k:

- Použití embryonálních tkání ke kultivaci (tkání, nebo vytvoření primární buněčné linie)
- Při ukončení experimentu je nutné embryo vyjmout a dále zpracovat ovlivněné tkáně (histologie, izolace RNA pro stanovení exprese..)

Díky za pozornost

