

TERATOLOGIA JAKO DZIEDZICTWO NAUKI W XXI WIEKU

Człowiek i Zdrowie Nr 1 (V) 2011, s. 66-71

Tomaszewski Marek^{1,2}, Tomaszewska Monika³, Olchowik Grażyna^{2,4}

¹Katedra i Zakład Anatomii Prawidłowej Człowieka Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

²Państwowa Szkoła Wyższa im. Papieża Jana Pawła II w Białej Podlaskiej

³I Zakład Radiologii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

⁴Katedra i Zakład Biofizyki Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Streszczenie: Teratologia jest interdyscyplinarną dziedziną nauki zajmującą się przyczynami i skutkami nieprawidłowego rozwoju, której nazwa pochodzi od greckich słów *teratos* – potwór i *logos* – nauka. Narodziny współczesnej teratologii datuje się na lata 1921-1935, kiedy doświadczalnie udowodniono związek pomiędzy zmniejszoną podażą witaminy A w paszy matek, a wystąpieniem bezocza i małocza u prosiąt. Przełomowym wydarzeniem w historii teratologii była jednak tragedia talidomidowa (1957-1962), kiedy to na skutek przyjmowania przez kobiety ciężarne talidomidu – potencjalnie nietoksycznego leku uspokajającego – urodziło się około siedem tysięcy niepełnosprawnych. Od tej pory prowadzone są badania dotyczące niekorzystnego wpływu różnych środków farmakologicznych na rozwój prenatalny człowieka. Poniższy artykuł zawiera dotychczasowy stan wiedzy z tej dziedziny, ze szczególnym uwzględnieniem czynników teratogennych, wraz z możliwym mechanizmem powstawania złożonych patologii.

Słowa kluczowe: teratologia, ciężarka kobieta, teratogeny, zarodek, toksyczność rozwojowa.

Toksyczność rozwojowa

Teratologia jest interdyscyplinarną dziedziną nauki zajmującą się przyczynami i skutkami nieprawidłowego rozwoju, której nazwa pochodzi od greckich słów *teratos* – potwór i *logos* – nauka [Shepard i wsp., 2000]. Narodziny współczesnej teratologii datuje się na lata 1921-1935, kiedy doświadczalnie udowodniono związek pomiędzy zmniejszoną podażą witaminy A w paszy matek, a wystąpieniem bezocza i małocza u prosiąt [Hale, 1933]. Przełomowym wydarzeniem w historii teratologii była jednak tragedia talidomidowa (1957 – 1962), kiedy to na skutek przyjmowania przez kobiety ciężarne talidomidu – potencjalnie nietoksycznego leku uspokajającego – urodziło się około siedem tysięcy niepełnosprawnych [Miller i Stromland, 1999; Webster i Freeman, 2001].

Fundamentem rozwoju współczesnej teratologii stało się pięć praw (I – V) opracowanych przez James G. Wilson'a. W roku 1973 dodano punkt VI [Christian, 2001; Jelinek, 2005], a w 1987 r. punkt VII [Christian, 2001]. W chwili obecnej podstawy Wilsona sformułowane są następująco [Burdan i wsp., 2006]:

- wrażliwość na teratogeny zależy od genotypu;
- wrażliwość na teratogeny zależy od okresu rozwoju zarodka, płodu;
- mechanizm działania teratogenów zależy od ich wpływu na rozwijające się komórki i tkanki;
- skutkami nieprawidłowego rozwoju są: śmierć, wada wrodzona, zaburzenie wzrostu, zaburzenia czynnościowe i karcynogeneza płodowa;
- ekspozycja rozwijających się tkanek na szkodliwy czynnik jest uwarunkowana naturą i dostępnością teratogenu;
- końcowy efekt działania teratogenu zależy od dawki i częstości ekspozycji;
- teratogen działa na określony narząd bądź narządy.

Doświadczalnym potwierdzeniem słuszności pierwszego prawa jest drażliwość poszczególnych gatunków zwierząt na talidomid. Zaobserwowano bowiem, że u szczurów niekorzystne działanie preparatu ograniczało się do zahamowania wzrostu wewnątrzmacicznego [Miller i Stromland, 1999]. Działanie to występowało jednak tylko u niektórych szczepów. Zbliżone wyniki uzyskano również dla królików, myszy, niektórych małp, psów i kotów [Teo i wsp., 2004]. Najbardziej nasiloną toksyczność wykazano dla człowieka, u którego dawka toksyczna przeszło 300-krotnie przekraczała najniższą dawkę wykazującą efekt niepożądany (LOEL), jaką wyznaczono dla chomika, gatunku wykazującego najmniejszą drażliwość na teratogen [Brent, 2004].

Druga podstawa Wilsona stwierdza, że drażliwość na teratogeny zależy od okresu rozwoju. We wczesnych etapach, przed zagnieżdżeniem się blastocysty, zarodek podlega prawu „wszystko albo nic”. Oznacza to,

że czynnik toksyczny działający w tym okresie spowoduje obumarcie zarodka, albo nie będzie miał żadnego wpływu na jego dalszy rozwój, ponieważ pozostałe proliferujące komórki zregenerują ubytek powstały na skutek działania czynnika szkodliwego. Po podaniu związków matylometasulfonowych, przerywających podwójną nić DNA, obserwowano śmierć części zarodków, pozostałe zaś nie wykazywały żadnych zaburzeń rozwojowych [Farbo i wsp., 1984]. W okresie, gdy różnicują się tkanki i narządy, występuje największa wrażliwość na potencjalny czynnik szkodliwy. W czasie organogenezy zaburzenia rozwoju mogą być wywołane nawet przez bardzo słabe teratogeny, a zaburzenia powstałe w tym okresie określa się mianem embriopatii [Ostrowski, 1988]. W kolejnym okresie – fetogenezy – wrażliwość płodu na czynniki szkodliwe zmniejsza się. Nie dotyczy to jednak układu nerwowego, rozrodczego i wewnątrz-wydzielniczego, których rozwój trwa jeszcze po narodzinach dziecka. Zmiany powstałe w tym okresie określa się mianem fetopatii. [Scialli, 1995; Burdan, 2001; Bartel, 2002].

Mechanizm poszczególnych nieprawidłowości rozwojowych jest złożony i zgodnie z trzecią podstawą zależy od wpływu teratogenów na rozwijające się komórki i tkanki. Na podstawie szeregu doświadczeń i obserwacji klinicznych wykazano, że na skutek działania czynników szkodliwych może dochodzić do mutacji genowych i aberracji chromosomowych, zaburzenia mitozy, zaburzenia struktury i funkcji kwasów nukleinowych, braku bądź niedoboru substratów makrocząsteczek, zaburzeń energetycznych, błonowych i osmolarnych, a także zaburzenia syntezy i aktywności enzymów [Wilson i Fraser 1977; Burdan i wsp., 2006]. Zmiany te w rezultacie prowadzą do śmierci komórek lub zaburzenia ich czynności. Przykładem może być antagonistą niacyny – 6-aminonikotinamid, blokujący syntezę kwasów nukleinowych. Na skutek podawania leku u potomstwa dochodzi do rozszczepów podniebienia i wad kończyn [Schardein, 1993].

Badania epidemiologiczne wskazują, że zaburzenia genetyczne i chromosomalne odpowiadają tylko za odpowiednio 20 i 5% dużych wad wrodzonych. Pozostałe przypadki spowodowane są infekcyjnymi (3%) i nieinfekcyjnymi (4%) chorobami matki, czynnikami mechanicznymi i fizycznymi (2%), a tylko w 1% za nieprawidłowości rozwojowe odpowiadają substancje toksyczne (1%). Pomimo dynamicznego rozwoju teratologii nadal największą grupę stanowią czynniki nieznane (65%) [Shein-Chung i Jen-Pei, 1998].

Wśród czynników genetycznych wymienia się przypadki spowodowane mutacją jednogenną. Zmiany wielogenowe zaliczane są do zmian chromosomalnych [Mirkes, 2002; Jelinek, 2005]. Bardzo ważny dla rozwijającego się organizmu jest stan zdrowia matki, bowiem tylko zdrowy organizm matki zapewnia optymalne środowisko dla rozwoju potomstwa. Przykładem mogą być wady układu krążenia, centralnego układu nerwowego, niedorozwój kończyn i częściowy lub całkowity brak kręgosłupa u dzieci matek z nieleczoną cukrzycą [Reid i wsp., 1984; Pisarski, 2002].

Spośród czynników zakaźnych znanych jest obecnie około 12 wirusów wywołujących zaburzenia rozwojowe. Najczęściej wymienia się wirus cytomegalii, grypy, opryszczki, różyczki i świnki [Fucillo i Sever, 1973; Webster, 1998; Kubicka i Kawalec, 2003]. W przypadku infekcji wirusowych ważny jest okres ciąży, w jakim występuje narażenie na patogen. Przykładem może być wirus różyczki, który od pierwszego do ósmego tygodnia ciąży powoduje obumarcie płodu. Jeśli zakażenie nastąpi w szóstym tygodniu, następstwem najczęściej jest wrodzona zaćma u dziecka, a w dziewiątym tygodniu głuchota. Infekcja pomiędzy piątym a dziesiątym tygodniem ciąży skutkować może wadami serca [Webster, 1998].

Wśród zakażeń bakteryjnych za groźne dla płodu uważa się gruźlicę, brucelozę i leptospirozę. Również pasożyty odpowiadają mogą za wady wrodzone. W tej grupie wymienia się *Toxoplasma gondii*, *Trichomonas bovis* czy *Vibrio fetus* [Hoppe, 1964; Lechner i Leinizinger, 1965].

Do czynników mechanicznych i fizycznych odpowiedzialnych za powstawanie zaburzeń rozwojowych zalicza się promieniowanie jonizujące, działanie zarówno niskiej jak i wysokiej temperatury oraz energię elektryczną [Wilson i Fraser, 1977].

W patogenezie wad wrodzonych nie można pominąć również czynników chemicznych, w tym leków, które dzięki rozwojowi przemysłu i nauki w większości należą do ksenobiotyków, a więc substancji obcych dla organizmów żywych [Brent, 1986]. Działanie niekorzystne może wywierać zarówno sam lek, jak i jego metabolity [Gillette i Menard, 1996]. Obecnie w obrocie aptecznym dostępnych jest wiele środków o udowodnionych działaniu teratogennym m.in.: tetracykliny, które powodują ciężkie uszkodzenia wątroby i mogą doprowadzić do zaburzeń wzrostu chrząstek nasadowych; antagoniści witaminy K – wywołujące rozszczepy podniebienia i wady ośrodkowego układu nerwowego, czy nifedypina – zwiększająca ryzyko anomalii paliczek [Briggs i wsp., 2005; Scialli, 1995].

W wyniku narażenia na wspomniane powyżej niekorzystne czynniki oraz braku mechanizmów kompensacyjnych dochodzi do zaburzenia rozwoju, które zgodnie z czwartą podstawą Wilsona może manifestować się zahamowaniem wzrostu wewnątrzmacicznego (IUGR, ang. *Intrauterine Growth Retardation*), zaburzeniami czynnościowymi, wadami strukturalnymi, nowotworzeniem oraz śmiercią [Harding i Bocking, 2001; Burdan i wsp., 2006].

Najczęściej, zwłaszcza w badaniach doświadczalnych, stwierdza się zahamowanie wzrostu wewnątrzmacicznego, które może mieć charakter przejściowy i ustępować po odstawieniu czynnika sprawczego. Działanie takie potwierdzono m.in. dla inhibitorów cyklooksygenazy, acetazolamin i tryptofanu [Beck i Urbano, 1991, Burdan, 2004, 2005a].

W grupie zaburzeń czynnościowych wymienia się zmiany biochemiczne i funkcjonalne tkanek i narządów. Przykładem jest choroba Minamata opisana po raz pierwszy w Japonii w roku 1952 [Schardein, 1993]. Choroba wywołana jest przez organiczne związki rtęci i objawia się ataksją oraz opóźnionym rozwojem psychoruchowym dziecka.

Dla ogółu opinii publicznej najbardziej znanym skutkiem nieprawidłowego rozwoju są strukturalne wady wrodzone. Zgodnie z najnowszą definicją za wadę uznaje się wszystkie trwałe zmiany strukturalne powstałe podczas rozwoju zarodka i płodu, dotyczące jednego lub kilku narządów, układów lub całego ciała, które przekraczają ich fenotypowe zmienności w danej populacji, określone przez czynniki epigene-tyczne, przy przypadkowej zmiennej liczbie nasileń, spowodowane działaniem czynników szkodliwych na gamety, zarodek, płód, łożysko lub organizmy matki [Burdan i wsp., 2006].

Obecnie istnieje wiele klasyfikacji wad. Jedną z najprostszych wydziela malformacje, zniekształcenia, rozerwania i zaburzenia morfogenezy o charakterze dysplazji [Bartel, 2002]. W klasyfikacji opartej na mechanizmie powstawania wyróżnia się: agenezje i aplazje, hipoplazje, rozrost i przerost, zaburzenia w procesie łączenia tkanek i narządów, zaburzenia w procesie rozdzielania tkanek i narządów, przetrwanie lub niecałkowity zanik struktur płodowych, niepełną rotację narządów, zwielokrotnienie zawiązków, heterotopie i ektopie, niezakończoną wędrówkę mezodermy, hamartie, uogólnione anomalie szkieletu, zaburzenia komórkowe i biochemiczne, nowotwory zarodkowe [Burdan i wsp., 2006].

Istnieje również podział na wady duże i małe. Wady duże bez odpowiedniej interwencji lekarskiej prowadzą do śmierci noworodka i występują w 2 – 5% przypadków. Wady małe, występujące w 1,5% przypadków, a nie leczone, prowadzą do zaburzeń funkcjonalnych [Hakasolo, 1973].

Karcynogeneza płodowa jest wynikiem ekspozycji płodu na mutageny [Hawkins i Smith, 1989; Satge i wsp., 1998]. Główne czynniki odpowiedzialne za procesy nowotworzenia w rozwijającym się organizmie to promieniowanie jonizujące i niektóre hormony [Hawkins i Smith, 1989; Brent i wsp., 1993; Bartel, 2002].

Kolejnym i najpoważniejszym skutkiem działania czynnika szkodliwego na rozwijający się organizm, jest jego śmierć i przedwczesne rozwiązanie ciąży. O poronieniu samoistnym mówi się, jeśli śmierć następuje przed 22 tygodniem ciąży u człowieka. Zakończenie ciąży po 22 tygodniu, przed uzyskaniem przez płód zdolności do życia w środowisku pozamacicznym określa się jako poród przedwczesny [Pisarski, 2002]. Przyjmuje się, że około 30% wczesnych ciąż ulega samoistnemu poronieniu [Wilcox i wsp., 1988]. W około 50% przypadków odpowiedzialne za to są nieprawidłowości kariotypu powstałe w czasie gametogenezy lub tuż po zapłodnieniu [Sciali, 1995].

Piąta podstawa Wilsona twierdzi, iż ekspozycja rozwijających się tkanek na szkodliwy czynnik jest uwarunkowana naturą i dostępnością teratogenu. Podobnie, jak i pozostałe założenia, także i ten dogmat został potwierdzony zarówno doświadczalnie, jak i klinicznie. W przypadku ksenobiotyków wrażliwość płodu na czynnik szkodliwy zależy od drogi podania, wielkości cząsteczki, rozpuszczalności, stopnia wiązania z białkami, metabolizmu matczynego, łożyskowego, płodowego oraz gradientu stężeń pomiędzy krwią matczyną a płodową. Uwagę zwraca się na wielkość dawki. Ten sam czynnik będzie wywoływał odmienny skutek w zależności, czy będzie podawany w małej dawce ale przez dłuższy okres czasu czy w dużej dawce ale krótko [Burdan, 2001; Williams, 2001; Bartel, 2002; Brent, 2004]. Obserwacje te znalazły potwierdzenie także w szóstej podstawie Wilsona.

Każdy związek może być scharakteryzowany przez cztery dawki: NOEL (ang. *No-Observed-Effect-Level*), LOEL (ang. *Low-Observed-Effect-Level*), MTD (ang. *Maximum-Tolerate-Dose*) i LD (ang. *Lethal Dose*) [Christian, 2001; Williams i Iatropoulos, 2001; Burdan i wsp., 2006]. NOEL odpowiada największej dawce, która nie wywołuje efektu ubocznego, LOEL – najmniejszej dawce wywołującej efekt toksyczny, MTD – maksymalnej dawce tolerowanej, natomiast LD – dawce śmiertelnej. Dla większości substancji toksycznych dawki układają się w następujący sposób: NOEL < LOEL < MTD < LD [Burdan i wsp., 2006]. IUGR najczęściej wywołany jest przez dawkę LOEL. Wartym podkreślenia jest również fakt, że dla większości teratogenów dawki toksyczne dla płodów są mniejsze niż dla matek [Brent, 2004].

W badaniach doświadczalnych wprowadzono również współczynnik A/D, który odpowiada stosunkowi dawki toksycznej dla osoby dorosłej (A, ang. *adult toxicity dose*) do dawki toksycznej dla płodu (D, ang. *developmental toxicity dose*). Przyjęto, że leki bezpieczne dla płodu odznaczają się współczynnikiem powyżej jednego [Sciali, 1995].

Najważniejszym odkryciem wpływającym z większości badań jest siódme prawo, mówiące, iż teratogen działa na określony narząd bądź narządy. Przykładami tego mogą być kwas walproinowy lub kwas

retinowy, które powodują wady ograniczone do szkieletu osiowego i cewy nerwowej [Campbell i wsp., 2004; Okada i wsp., 2004]. Ostatnia podstawa Wilsona nie jest jednak uznawana przez wszystkich badaczy, bowiem w pewnym stopniu pokrywa się z prawem II i III [Burdan i wsp., 2006].

Ocena toksyczności rozwojowej

Przed wprowadzeniem preparatu na rynek, na podstawie ściśle określonych wytycznych, ocenia się toksyczność rozwojową. Pierwsze takie rozporządzenie opracowano w przez Światową Organizację Zdrowia [WHO, 1967], a ostatnie uaktualnienie pochodzi z 2001 roku [WHO, 2001]. Z powodu licznych modyfikacji i różnic odnośnie stosowanych metod, na międzynarodowej konferencji poświęconej ujednoliceniu procedur (ICH, ang. *International Conference for Harmonisation*) opracowano nowe wytyczne dla badań oceniających toksyczność rozwojową produktów medycznych [ICH, 2000]. Opracowane wytyczne zostały następnie zatwierdzone przez Amerykańską Komisję ds. Żywności i Leków (FDA, ang. *Food and Drug Administration*) i podobne instytucje w Unii Europejskiej i Japonii [Christian, 2001].

Według ICH [2000], ocena toksyczności rozwojowej powinna obejmować sześć typów badań przeprowadzanych na zwierzętach laboratoryjnych. W zależności od okresu podawania leku i analizowanych parametrów wyróżnia się następujące typy badań:

- a) stadium A – okres przed łąčeniem w pary aż do zapłodnienia,
- b) stadium B – od poczęcia do implantacji,
- c) stadium C – od implantacji do zamknięcia podniebienia twardego,
- d) stadium D – zamknięcie podniebienia twardego do końca ciąży,
- e) stadium E – od narodzin do zakończenia laktacji,
- f) stadium F – od zakończenia laktacji do osiągnięcia dojrzałości płciowej.

W stadium B, C i D ocenia się ciężarną samicę i jej potomstwo. Zwierzęta uśmiercane są w dniu spodziewanego porodu lub dzień przed. Aby wykluczyć ewentualne komplikacje porodowe, wykonuje się cięcie cesarskie. Rutynowo, ocenie makroskopowej poddawane są narządy klatki piersiowej, jamy brzusznej i miednicy u ciężarnych samic. W czasie sekcji pobierana jest także krew do wykonania pomiarów biochemicznych i innych specyficznych oznaczeń, wynikających ze specyfiki ocenianego preparatu i/bądź wyników badania autopsyjnego. Szczegółowej analizie podaje się jajniki, macicę i łożysko. Jajniki są ważone i oznaczana jest ilość ciałek żółtych. W macicy liczona jest ilość implantacji. Aby uwidocznic wczesne implantacje, stosuje się barwienie 10% roztworem siarczku amonu. Po rozcięciu macicy, każde miejsce implantacji jest opisywane jako wczesna lub późna resorpcja, żywy lub martwy płód. Ilość miejsc implantacji, resorpcji i płodów oraz liczba ciałek żółtych służą do określenia śmiertelności przedimplantacyjnej i poimplantacyjnej. Łożyska są ważone i oceniane makroskopowo [Christian, 2001; Burdan i wsp., 2005].

Po wstępnej ocenie płodów (parametry morfologiczne, odruchy) zwierzęta są usypiane [CDER, 2003]. Dokonywana jest analiza struktur miękotkankowych oraz szkieletu. U zwierząt dużych, z małym miotem (np. królików) wskazana jest ocena każdego osobnika pod kątem zarówno narządów wewnętrznych, jak i szkieletu. U zwierząt małych, ze stosunkowo dużą liczbą osesków w miocie (np. szczur, mysz) najczęściej połowę potomstwa z każdego miotu przeznaczają się do oceny struktur miękotkankowych, a pozostałe do badań szkieletu [Christian, 2001; Burdan i wsp., 2005].

Makroskopowa ocena narządów wewnętrznych dokonywana jest po wytrzewieniu lub metodą Wilsona, która wymaga wcześniejszego utrwalenia potomstwa w płynie Bouina. Badanie przeprowadza się wykonując standardowo cięcia poprzeczne (szyja, tułów, kończyny) oraz czołowe (głowa powyżej podniebienia) [Manson i Kang, 1994; Christian, 2001]. Opisano także sekcjonowanie całego ciała w płaszczyznach poziomych, strzałkowych i czołowych [Burdan i wsp., 2005].

Każde zaobserwowane zaburzenie struktury klasyfikuje się jako odmianę lub wadę rozwojową. Obecnie istnieje wiele terminologii teratologicznych, których ujednolicenia podjęła się Międzynarodowa Federacja Towarzystw Teratologicznych (IFTS) [Chahoud i wsp., 1999a, 1999b; Solecki i wsp., 2001; 2003]. Niestety w chwili obecnej klasyfikacja poszczególnych jednostek jest odmienna w Europie, Ameryce Północnej i Japonii. Wynika to z faktu, iż IFTS ostateczną decyzję pozostawia w rękach samych badaczy, którzy powinni zakwalifikować część nieprawidłowości w oparciu o doświadczenie własne i dane historyczne, zebrane w populacji zwierząt wykorzystywanej w danym laboratorium. Dobrym przykładem jest asymetria fałdów podniebienia, która przez część badaczy uznawana jest za małą wadę rozwojową, a z obserwacji ośrodka lubelskiego, a także innych naukowców europejskich jest to jedynie częsta odmiana rozwojowa [Solecki i wsp., 2001; 2003].

Podsumowanie

Według FDA analiza toksyczności, prowadzona na ośeskach, powinna obejmować ocenę narządów, które podlegają dynamicznemu rozwojowi po urodzeniu, a więc szkieletu, nerek, płuc, układu nerwowego, odpornościowego i rozrodczego. Ocena narządów wewnętrznych powinna obejmować przynajmniej badanie makroskopowe. Dla wykluczenia działania neurotoksycznego niezbędna jest czynnościowa analiza układu nerwowego tj. badanie odruchów, funkcji sensorycznych i aktywności ruchowej oraz procesów uczenia i zapamiętywania. Konieczna jest również ocena wzrostu osobników, jego tempa w określonym przedziale czasu, poprzez regularne pomiary, na przykład długości kości piszczelowej oraz kontrolę masy ciała [ICH, 2000; CDER, 2003].

Literatura:

1. Bartel H. (2002). *Embriologia*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.
2. Beck S.L., Urbano C.M. (1991). *Potentiating effect of caffeine on the teratogenicity of acetazolamide in C57BL/6J mice*. Teratology 44, 241 – 250.
3. Brent R.L. (1986). *The complexities of solving the problems of human malformations*. Clin Perinatol 24, 491 – 493.
4. Brent R.L., Beckman D.A., Jandel C.P. (1993). *Clinical teratology*. Curr Opin Pediatr 5, 201 – 211.
5. Brent R.L. (2004). *Environmental causes of human congenital malformations: the pediatrician's role in dealing with these complex clinical problems caused by a multiplicity of environmental and genetic factors*. Pediatrics. 113 (suppl. 4), 957 – 968.
6. Briggs G.G., Freeman R.K., Yaffe S.J. (2005). *Drugs in pregnancy and lactation*. A reference guide to fetal and neonatal risk. Wyd. 7. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia.
7. Burdan F. (2001). *Teratologia, 40 lat po tragedii talidomidowej*. Ginekol Pol 72, 93 – 100.
8. Burdan F. (2004). *Developmental effects of propyphenazone in analgesic and antipyretic combination with caffeine or paracetamol*. Hum Exp Toxicol 23, 235 – 244.
9. Burdan F. i wsp. (2005). *Morphological studies in modern teratological investigations*. Folia Morphol (Warsz) 64, 1 – 8.
10. Burdan F. (2005). *Comparison of developmental toxicity of selective and non – selective cyclooxygenase-2 inhibitors in CRL:(WI)WUBR Wistar rats – DFU and piroxicam study*. Toxicology 211, 12 – 25.
11. Burdan F. i wsp. (2006). *Podstawy Wilsona – fundament współczesnej teratologii*. Pol Merkur Lekarski 117, 358 – 361.
12. Campbell J.L. Jr., Smith M.A., Fisher J.W. Warren D.A. (2004). *Dose – response for retinoic acid – induced forelimb malformations and cleft palate: a comparison of computerized image analysis and visual inspection*. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol 71, 289 – 295.
13. CDER (2003). Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for industry. Nonclinical safety evaluation of pediatric products. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug administration February 2003 <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>
14. Chahoud I. i wsp. (1999a). *Classification terms in developmental toxicology: need for harmonization. Report of the Second Workshop on the Terminology in Developmental Toxicology Berlin, 27-28 August 1998*. Reprod Toxicol 13, 77 – 82.
15. Chahoud I. i wsp. (1999b). *Correlation between maternal toxicity and embryo/fetal effects*. Reprod Toxicol 13, 375 – 381.
16. Christian M.S. (2001). *Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology*. W: Hayes A.W. (Red): Principles and method of toxicology. Wyd. 4. Taylor and Francis. Philadelphia 1301 – 1381.
17. Farbo S., McLachlan J.A., Dames N.M. (1984). *Chemical exposure of embryos during the preimplantation stages of pregnancy: mortality rate and intrauterine development*. Am J Obstet Gynecol 148, 929 – 936.
18. Fucillo D.A., Sever J.L. (1973). *Viral teratology*. Bacter Rev 37, 19 – 31.
19. Gillette J.R., Menard R.H., Stripp B. (1996). *Active products of fetal drug metabolism*. Clin Pharmacol Ther 14, 680 – 692.
20. Hakasolo J.K. (1973). *Cummulative defection rates of congenital malformations in ten – year follow – up study*. Acta Pathol Microbiol Scand 242 (suppl. A), 1 – 14.
21. Hale F. (1933). *Pigs born without eye balls*. J Heredity 24, 105 – 106.
22. Hardind R., Bocking A.D. (2001). *Fetal growth and development*. Cambridge University Press, Cambridge.

23. Hawkins M.M., Smith R.A. (1989). *Pregnancy outcome in childhood cancer survivors: probably effect of abdominal radiation*. Int J Cancer 43, 399 – 406.
24. Hoppe R. (1964). *Patologia zarodka i płodu u zwierząt domowych*. Med Wet 20, 399 – 406.
25. ICH (2000). *ICH Harmonised tripartite guideline. Maintenance of the ICH guideline on toxicity to male fertility. An addendum to ICH tripartite guideline on detection of toxicity to reproduction for medicinal products*. <http://www.ifpma.org/ich1.html>.
26. Jelinek R. (2005). *The contribution of new findings and ideas to the old principles of teratology*. Reprod Toxicol 20, 295 – 300.
27. Kubicka K., Kawalec W. (2003). *Pediatrics*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.
28. Lechner G., Leinizinger E. (1965). *The relationship between maternal toxoplasmosis and embriopathy*. Arch Gynecol 202, 99 – 102.
29. Manson J.M., Kang Y.J. (1994). *Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology*. W: Hayes A. (Red). Principles and methods of toxicology. Tom 3. Raven Press. New York 989 – 1037.
30. Miller M.T., Stromland K. (1999). *Teratogen update: thalidomide: a review, with a focus on ocular findings and new potential uses*. Teratology 60, 306 – 321.
31. Mirkes P.E. 2002. (2001). *Warkany lecture: to die or not die, the role of apoptosis in normal and abnormal mammalian development*. Teratology 65, 228 – 239.
32. Okada A. i wsp. (2004). *Amidic modification of valproic acid reduces skeletal teratogenicity in mice*. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol 71, 47 – 53.
33. Ostrowski K. (1988). *Embriologia człowieka*. Wydawnictwo Lekarskie, PZWL Warszawa.
34. Pisarski T. (2002). *Położnictwo i ginekologia*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.
35. Reid M. i wsp. (1984). *Fetal malformations in diabetes with high haemoglobin A_{1c} in early pregnancy*. Br Med J Clin Res 289, 1001.
36. Satge D., Sasco A.J., Little J. (1998). *Antenatal therapeutic drug exposure and fetal/neonatal tumors: review of 89 cases*. Paediatr Perinat Epidemiol 12, 84 – 117.
37. Scialli A.R. (1995). *Teratology*. W: Crighead J.E. (Red) Pathology of environmental and occupational disease. Masby, St Louis.
38. Shardein J. (1993). *Chemically induced birth defects*. WYd. 2. Marcel Dekker, New York.
39. Shein-Chung C., Jen-Pei L. (1998). *Design and analysis of animal studies in pharmaceutical development*. Marcel Dekker. New York.
40. Shepard T.H. i wsp. (2000). *A history of the teratology society*. Teratology 62, 301 – 316.
41. Solecki R. i wsp. (2003). *Harmonization of rat fetal external and visceral terminology and classification. Report of the Fourth Workshop on the Terminology in Developmental Toxicology*. Berlin 18 – 20 April 2002. Reprod Toxicol 17, 625 – 637.
42. Solecki R. i wsp. (2001). *Harmonisation of rat fetal skeletal terminology and classification. Report of the Third Workshop on the Terminology in Developmental Toxicology*. Berlin 14 – 16 September 2000. Reprod Toxicol 15, 713 – 721.
43. Teo S.K. i wsp. (2004). *Effects of thalidomide on reproductive function and early embryonic development in male and female New Zealand white rabbits*. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol 71, 1 – 16.
44. Webster W. (1998). *Teratogen update: congenital rubella*. Teratology 58, 13 – 23.
45. Webster W.S., Freeman J.A.D. (2001). *Is this drug safe in pregnancy?* Reprod Toxicol 15, 619 – 629.
46. WHO (1967). *World Health Organization. Principles of the testing of drugs for teratogenicity*. World Health Organization Technical Report. Series No 364. Geneva.
47. WHO (2001). *World Health Organization. Principles for evaluating health risks to reproduction associated with exposure to chemicals*. Environ Health Criteria 225, 1 – 185.
48. Wilcox A.J. i wsp. (1988). *Incidence of early pregnancy loss*. N Engl J Med 331, 189 – 196.
49. Williams G.M., Iatropoulos M.J. (2001). *Principles of testin for carcinogenic activity*. W: Hayes A.W. (Red) Principles and methods of toxicology. Wyd. 4. Taylor and Francis, Philadelphia.
50. Wilson J.G. Fraser F.C. (1977). *Handbook of teratology*. Tom 4. Plenum Publishing, New York.

TERATOLOGY AS A LEGACY OF SCIENCE IN THE TWENTY-FIRST CENTURY

Human and Health No. 1 (V), 2011, 72-77

Tomaszewski Marek^{1,2}, Tomaszewska Monika³, Olchowik Grażyna^{2,4}¹Department of Human Anatomy Medical University of Lublin²Pope John Paul II State School of Higher Education in Biała Podlaska³I Department of Radiology, Medical University of Lublin⁴Department of Biophysics Medical University of Lublin

Summary: Teratology is an interdisciplinary field of science dealing with the causes and consequences of abnormal development. The birth of modern teratology dates to the years 1921-1935, when the empirically proven relationship between the reduced supply of vitamin A in the feed, mothers, and the occurrence anopia and microphthalmia in piglets. Milestone in the history of teratology, however, was a thalidomide tragedy (1957 - 1962), when the result of taking thalidomide during pregnancy - a potentially nontoxic sedative drug - was born about seven thousand guests. Since that time, conducted research on the adverse effects of various pharmacological agents on human prenatal development. The following article contains the current state of knowledge in this area, with particular emphasis on teratogenic factors, together with a possible mechanism for the formation of complex pathology.

Key words: teratology, a weight woman, teratogenic, embryotoxic, developmental toxicity.

Developmental Toxicity

Teratology is an interdisciplinary field of science dealing with the causes and consequences of abnormal development, whose name comes from the Greek words *teratos* - monster and *logos* - science (Shepard i wsp. 2000). The birth of modern teratology dates to the years 1921-1935, when the empirically proven relationship between the reduced supply of vitamin A in the feed, mothers, and the occurrence anopia and microphthalmia in piglets (Hale, 1933). Milestone in the history of teratology, however, was a thalidomide tragedy (1957 - 1962), when the result of taking thalidomide during pregnancy - a potentially nontoxic sedative drug - was born about seven thousand disabled (Miller i wsp. 1999, Webster i wsp. 2001).

Foundation for the development of modern teratology happened five rights (I - V) prepared by James G. Wilson 'a. In 1973, added section VI (Christian, 2001; Jelinek, 2005), and in 1987 the section VII of the (Christian, 2001). At the moment, Wilson bases are formulated as follows (Burdan i wsp. 2006):

- a) teratogeny sensitivity depends on the genotype;
- b) teratogeny sensitivity depends on the duration of development of the embryo, fetus;
- c) teratogenów mechanism of action depends on their effects on developing cells and tissues;
- d) consequences of abnormal development are death, congenital anomaly, the destruction of growth, the destruction of fetal functional and carcinogenesis;
- e) exposure of developing tissues to the harmful factor is determined by the nature and availability of teratogenicity studies;
- f) the final effect is dose-dependent teratogenicity studies and frequency of exposure;
- g) teratogen work on specific organ or organs.

Experimental confirmation of the validity of the first law is the sensitivity of species to thalidomide. It was observed that, in rats the adverse effects of inhibition was restricted to intrauterine growth (Miller i wsp. 1999). This action, however, occurred only in some strains. Similar results were also obtained for rabbits, mice, some monkeys, dogs and cats (Teo i wsp. 2004). The most severe toxicity has been demonstrated for a man with whom the toxic dose more than 300-fold above the lowest dose showing adverse effects (LOEL), which were determined for the hamster, a species showing the least sensitivity to teratogen (Brent, 2004).

The second basis for Wilson notes that the sensitivity depends on the period teratogeny development. In the early stages, before implantation blastocyst, an embryo is governed by an "all or nothing". This means that the toxic agent acting in this period will result in death of the embryo, or it will not have any impact on its further development, as the other proliferating cells will recover the loss resulting from an act injurious agent. After administration of the compounds matylometasulfonowych, leaving double-stranded DNA, the observed death of the embryo and the others did not show any developmental abnormalities (Dye i wsp. 1984). At a time when

differentiate into tissues and organs, is most sensitive to a potential hazardous factor. During organogenesis developmental disorder can be caused even by very weak teratogeny, and disorders arising during this period is referred to as embryopathy (Ostrowski, 1988). In the next period - fetogenezy - sensitivity of the fetus to harmful factors decreases. Does not apply to the nervous system, reproductive and endocrine, whose development continues even after birth. Changes arising in this period is referred to as fetopatii (Scialli, 1995; Burdan, 2001; Bartel, 2002).

The mechanism of individual developmental abnormalities is complex and in accordance with the third base depends teratogenów impact on the developing cells and tissues. Based on a series of experiments and clinical observations have shown that the effects of exposure may become harmful gene mutations and chromosomal aberrations, abnormal mitosis, abnormal structure and function of nucleic acids, the absence or scarcity of macromolecular substrates, disorders of energy, membrane and osmolarnych, and abnormal synthesis and activity of enzymes (Wilson i wsp. 1977; Burdan i wsp. 2006). These changes eventually lead to cell death or impairment of their activities. An example might be an antagonist of niacin - 6-aminonicotinamid, blocking the synthesis of nucleic acids. As a result of the drug in the offspring reaches cleft palate and limb defects (Schardein, 1993).

Epidemiological studies indicate that genetic and chromosomal disorders account for only 20 and 5% major congenital malformations. Other cases are caused by infectious (3%) and nieinfekcyjnymi (4%), maternal illness, physical and mechanical factors (2%), and only 1% for the developmental abnormalities correspond to toxic substances (1%). Despite the dynamic development of teratology is still the largest group of unknown factors (65%) (Shein-Chung i wsp. 1998).

Among the genetic factors refers to cases involving monogenic mutation. The changes are among the multi-gene chromosomal alterations (Mirkes, 2002; Jelinek, 2005). Very important for the developing organism is a state of health of the mother, because only a healthy mother to provide the optimal environment for the development of the offspring. This could be the defects of the circulatory system, central nervous system, deformed limbs, and partial or total lack of spine in children of mothers with untreated diabetes (Reid i wsp. 1984; Pisarski, 2002).

Of the infectious agents known to be currently around 12 viruses that cause developmental disorders. Frequently mentioned is the cytomegalovirus, influenza, herpes, rubella and mumps (Fucillo i wsp. 1973; Webster, 1998; Kubicka i wsp. 2003). In the case of viral infection is an important period of gestation, in which there is exposure to the pathogen. An example might be a virus, which from first to eighth week of pregnancy causes fetal death. If an infection occurs in the sixth week, is mostly a consequence of congenital cataracts in children, and the ninth week deafness. Infection between the fifth and the tenth week of pregnancy can result in heart defects (Webster, 1998).

Among the battery to be dangerous infection to the fetus considered to be tuberculosis, brucellosis and leptospirosis. Also, parasites can respond to birth defects. In this group of *Toxoplasma gondii* is mentioned, *Trichomonas bovis* or *Vibrio fetus* (Hoppe, 1964; Leinizinger Lechner, 1965).

For the mechanical and physical factors responsible for the emergence of developmental disorders include ionizing radiation, the effect of both low and high temperature and electricity (Wilson i wsp. 1977).

In the pathogenesis of congenital defects can not ignore the chemical agents, including drugs that thanks to the development of industry and science are among the most xenobiotics, and thus foreign substances on living organisms (Brent, 1986). Adverse action may have both the same drug and its metabolites (Gillette i wsp. 1996). Currently, in the course of pharmacy there are many resources with proven teratogenic include: tetracyclines, which cause severe liver damage and may lead to disorders of growth cartilage nut, vitamin K antagonists - that cause cleft palate and defects of the central nervous system, or nifedipine - increasing risk of extreme phalanges (Briggs i wsp. 2005; Sciali, 1995).

As a result of exposure to the above-mentioned disadvantages and lack of compensatory mechanisms occur developmental disorder which, in accordance with the fourth base of Wilson can be manifested inhibition of intrauterine growth retardation (IUGR), functional disorders, structural defects, neoplasia, and death (Harding i wsp. 2001; Burdan i wsp. 2006).

Frequently, especially in experimental studies, it is intrauterine growth retardation, which may be temporary, and after stopping to give way to a causative factor. Such action is confirmed, among others for cyclooxygenase inhibitors, acetazolamin and tryptophan (Beck i wsp. 1991, Burdan, 2004, 2005a).

In the group of functional disorders refers to the biochemical and functional changes in tissues and organs. One example is Minamata disease first described in Japan in 1952 (Schardein, 1993). The disease is caused by organic mercury compounds and is characterized by ataxia and psychomotor retardation of the child.

For the general public the most famous are the result of abnormal development of structural birth defects. According to the latest definition of a defect shall be deemed to all permanent structural changes occurring during development of the embryo and fetus, for one or more organ systems or whole body, which exceed their phenotypic variation in the population, as determined by epigenetic factors, the random variable number of ex-

acerbations, caused by the action of harmful factors in the gametes, embryo, fetus, placenta and maternal organism (Burdan i wsp. 2006).

There are many classifications of defects. One of the simplest isolated malformation, deformation, rupture and abnormal morphogenesis of the nature of dysplasia [Bartel, 2002]. The classification based on the mechanism of formation are distinguished: agenezje and aplasia, hypoplasia, hyperplasia and hypertrophy, changes in the process of connecting tissues and organs, disturbances in the process of separation of tissues and organs, the survival or incomplete fetal loss structures, rotation incomplete organs, multiplication of buds, Heterotopias and ectopic, wandering mesoderm work in progress, hamartia, generalized skeletal abnormalities, cellular and biochemical abnormalities, cancer embryonic (Burdan i wsp. 2006).

There is also a distinction between large and small defects. Disadvantages of large without proper medical intervention leading to infant death, and occur in 2 - 5% of cases. Disadvantages of a small, occurring in 1.5% of cases, and if untreated, lead to functional disturbances (Hakasolo, 1973).

Fetal carcinogenesis is the result of fetal exposure to mutagens (Hawkins i wsp. 1989; Satge i wsp. 1998). The main factors responsible for the processes of carcinogenesis in the developing organism to ionizing radiations and some hormones (Hawkins i wsp. 1989, Brent i wsp. 1993; Bartel, 2002).

The next and most serious adverse effect of a factor on the developing organism, is his death and the early termination of pregnancy. A miscarriage is said, if death occurs before 22 weeks of gestation in humans. Termination of pregnancy after 22 weeks, before the acquisition by the fetus is viable in the extrauterine environment defined as preterm delivery (Pisarski, 2002). It is assumed that about 30% of early pregnancies undergoes spontaneous miscarriage (Wilcox i wsp. 1988). In approximately 50% of cases are responsible for karyotype abnormalities occurring during or shortly gametogenesis after fertilization (Sciali, 1995).

The fifth base of Wilson's claims that the exposure of developing tissues to the harmful factor is determined by the nature and availability of teratogenicity studies. Similarly, as well as other assumptions, too, and this dogma has been confirmed both experimentally and clinically. In the case of xenobiotics susceptibility factor for fetal harm depends on the route of administration, particle size, solubility, degree of protein binding, metabolism of maternal, placental, and fetal concentration gradient between maternal and fetal blood. Attention is paid to the dose. The same factors will lead to a different result depending on whether it will be administered at low doses but over a longer period of time or in large doses but briefly (Burdan, 2001; Williams, 2001; Bartel, 2002; Brent, 2004). These observations were confirmed also in the Sixth Wilson.

Each compound can be characterized by four doses: NOEL (No-Observed-Effect-Level), LOEL (Low-Observed-Effect-Level), MTD (Maximum-tolerate-Dose) and LD (Lethal Dose) (Christian, 2001; Williams i wsp. 2001; Burdan i wsp. 2006). NOEL corresponds to the largest dose which produces no side effect, LOEL - lowest dose causing toxicity, MTD - maximum tolerated dose, while LD - lethal dose. For most of the toxic doses are arranged as follows: NOEL < LOEL < MTD < LD (Burdan i wsp. 2006). Most IUGR is caused by a dose LOEL. It is worth stressing the fact that for most teratogenów doses toxic to fetuses are smaller than for mothers (Brent, 2004).

In experimental studies also introduced a factor of A / D, which corresponds to a toxic dose for adults (A, adult dose toxicity) to the toxic dose to the fetus (D, Developmental toxicity dose). It was assumed that the drugs safe for the fetus characterized by a factor of more than one (Sciali, 1995).

The most important discovery derives from the majority of research is the seventh law, saying that teratogen work on specific organ or organs. Examples of this can be valproic acid or retinoic acid, which cause defects limited to the axial skeleton and neural tube (Campbell i wsp. 2004, Okada i wsp. 2004). Wilson's last base is not recognized by all researchers, because to some extent overlaps with the law II and III (Burdan i wsp. 2006).

Evaluation of developmental toxicity

Before placing a product on the market, under strict guidelines, evaluate the developmental toxicity. The first such regulation developed by the World Health Organization (WHO, 1967), and the last update is from 2001 (WHO, 2001). Because of numerous modifications and variations on methods used, the international conference on harmonization of procedures (ICH, International Conference for Harmonisation) developed new guidelines for developmental toxicity studies on medicinal products (ICH, 2000). The developed guidelines were subsequently endorsed by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) and similar institutions in the European Union and Japan (Christian, 2001).

According to ICH (2000), evaluation of developmental toxicity should include six types of tests conducted on laboratory animals. Depending on the period of drug administration and analyzed parameters, divided into the following types of research:

- stage A - the period before the merger in pairs until fertilization,

- stage B - from conception to implantation,
- stage C - from implantation to closure of the hard palate,
- stage D - closing the hard palate to the end of pregnancy,
- stage E - from birth until the end of lactation,
- stage F - from the end of lactation to reach sexual maturity

In stage B, C and D shall be assessed a pregnant female and her offspring. Animals are sacrificed on the expected birth or the day before. To exclude the possible complications of childbirth, Caesarean section is performed. Routinely, macroscopic assessment are subject to organs of the chest, abdomen and pelvis in pregnant females. At the time the section is taken as the blood biochemical measurements and other specific indications, resulting from the specific product being evaluated and / or autopsy findings. Gives a detailed analysis of the ovaries, uterus and placenta. The ovaries are weighed and identified a number of corpora lutea. The count is the number of uterine implantation. To visualize the early implantation, staining is used 10% solution of ammonium sulfide. After splitting the uterus, each site of implantation is described as early or late resorptions, live or dead fetus. Number of implantation, resorption and fetuses and corpora lutea are used to determine the mortality of pre-implantation and post-implantation. Bearings are weighed and evaluated macroscopically (Christian, 2001; Burdan i wsp. 2005).

After the initial assessment of fetuses (morphological parameters, reflexes) the animals are euthanised (CDER, 2003). Analysis is made softtissue structures and skeleton. In animals, large, small subject (eg, rabbits) is indicated to assess each individual in terms of both internal organs and skeleton. In animals, small, with a relatively large number of suckling in the litter (eg, rat, mouse) usually half the offspring from each litter allocated to the assessment softtissue structures, and the other for testing the skeleton (Christian, 2001; Burdan i wsp. 2005).

Macroscopic evaluation of the internal organs is carried out after dressing or method of Wilson, which requires prior fixation of offspring in Bouin's fluid. The test is performed using the standard transverse cuts (neck, trunk, limbs) and frontal (head above the palate) (Manson i wsp. 1994, Christian, 2001). Isolation also describes the whole body in horizontal planes, sagittal and frontal (Burdan i wsp. 2005).

Any observed structure disorder is classified as a variety or developmental defect. Currently, there are many teratology terminology, which has undertaken to harmonize the International Federation of teratology (IFTS) (Chahoud i wsp. 1999a, 1999b; Solecki i wsp. 2001, 2003). Unfortunately, at present classification of individual units is different in Europe, North America and Japan. This follows from the fact that the IFTS final decision is left in the hands of the researchers themselves, who should qualify for some irregularities on the basis of own experience and historical data, collected in a population of animals used in the laboratory. A good example is the asymmetry of the folds of the palate, which for some scholars is considered to be a small defect in development, and observation center in Lublin, and other European researchers, it is only a frequent variant of development (Solecki i wsp. 2001, 2003).

Conclusions

According to the FDA's analysis of toxicity, conducted on suckers, should include an assessment of organs, which are subject to dynamic growth after birth, and so the skeleton, kidneys, lungs, nervous, immune and reproductive systems. Evaluation of the internal organs should include at least the macroscopic examination. For exclusion of neurotoxicity, it is necessary functional analysis of the nervous system (the test of reflexes, sensory functions and motor activity and the processes of learning and memory). It is necessary also to assess the growth of individuals, the rate within a specified period of time, through regular measurements, for example, the length of the tibia and weight control (ICH, 2000; CDER, 2003).

References:

1. Bartel H. (2002) Embriologia. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.
2. Beck S.L., Urbano C.M. (1991) Potentiating effect of caffeine on the teratogenicity of acetazolamide in C57BL/6J mice. *Teratology* 44, 241 – 250.
3. Brent R.L. (1986) The complexities of solving the problems of human malformations. *Clin Perinatol* 24, 491 – 493.
4. Brent R.L., Beckman D.A., Jandel C.P. (1993) Clinical teratology. *Curr Opin Pediatr* 5, 201 – 211.

5. Brent R.L. (2004) Environmental causes of human congenital malformations: the pediatrician's role in dealing with these complex clinical problems caused by a multiplicity of environmental and genetic factors. *Pediatrics* 113 (suppl. 4), 957 – 968.
6. Briggs G.G., Freeman R.K., Yaffe S.J. (2005) *Drugs in pregnancy and lactation. A reference guide to fetal and neonatal risk.* Wyd. 7. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia.
7. Burdan F. (2001) *Teratologia, 40 lat po tragedii talidomidowej.* *Ginekolog* 72, 93 – 100.
8. Burdan F. (2004) Developmental effects of propyphenazone in analgesic and antipyretic combination with caffeine or paracetamol. *Hum Exp Toxicol* 23, 235 – 244.
9. Burdan F. i wsp. (2005) Morphological studies in modern teratological investigations. *Folia Morphol (Warsz)* 64, 1 – 8.
10. Burdan F. (2005) Comparison of developmental toxicity of selective and non – selective cyclooxygenase-2 inhibitors in CRL:(WI)WUBR Wistar rats – DFU and piroxicam study. *Toxicology* 211, 12 – 25.
11. Burdan F. i wsp. (2006) Podstawy Wilsona – fundament współczesnej teratologii. *Pol Merkur Lekarski* 117, 358 – 361.
12. Campbell J.L. Jr., Smith M.A., Fisher J.W. Warren D.A. (2004) Dose – response for retinoic acid – induced forelimb malformations and cleft palate: a comparison of computerized image analysis and visual inspection. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 71, 289 – 295.
13. CDER (2003) Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for industry. Nonclinical safety evaluation of pediatric products. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug administration February 2003 <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>
14. Chahoud I. i wsp. (1999a) Classification terms in developmental toxicology: need for harmonization. Report of the Second Workshop on the Terminology in Developmental Toxicology Berlin, 27-28 August 1998. *Reprod Toxicol* 13, 77 – 82.
15. Chahoud I. i wsp. (1999b) Correlation between maternal toxicity and embryo/fetal effects. *Reprod Toxicol* 13, 375 – 381.
16. Christian M.S. (2001) Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. W: Hayes A.W. (Red): *Principles and method of toxicology.* Wyd. 4. Taylor and Francis. Philadelphia 1301 – 1381.
17. Farbo S., McLachlan J.A., Dames N.M. (1984) Chemical exposure of embryos during the preimplantation stages of pregnancy: mortality rate and intrauterine development. *Am J Obstet Gynecol* 148, 929 – 936.
18. Fucillo D.A., Sever J.L. (1973) Viral teratology. *Bacter Rev* 37, 19 – 31.
19. Gillette J.R., Menard R.H., Stripp B. (1996) Active products of fetal drug metabolism. *Clin Pharmacol Ther* 14, 680 – 692.
20. Hakasolo J.K. (1973) Cumulative defection rates of congenital malformations in ten – year follow – up study. *Acta Pathol Microbiol Scand* 242 (suppl. A), 1 – 14.
21. Hale F. (1933) Pigs born without eye balls. *J Heredity* 24, 105 – 106.
22. Hardind R., Bocking A.D. (2001) *Fetal growth and development.* Cambridge University Press, Cambridge.
23. Hawkins M.M., Smith R.A. (1989) Pregnancy outcome in childhood cancer survivors: probable effect of abdominal radiation. *Int J Cancer* 43, 399 – 406.
24. Hoppe R. (1964) Patologia zarodka i płodu u zwierząt domowych. *Med Wet* 20, 399 – 406.
25. ICH (2000) ICH Harmonised tripartite guideline. Maintenance of the ICH guideline on toxicity to male fertility. An addendum to ICH tripartite guideline on detection of toxicity to reproduction for medicinal products. <http://www.ifpma.org/ich1.html>.
26. Jelinek R. (2005) The contribution of new findings and ideas to the old principles of teratology. *Reprod Toxicol* 20, 295 – 300.
27. Kubicka K., Kawalec W. (2003) *Pediatrica.* Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.
28. Lechner G., Leinizinger E. (1965) The relationship between maternal toxoplasmosis and embriopathy. *Arch Gynecol* 202, 99 – 102.
29. Manson J.M., Kang Y.J. (1994) Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. W: Hayes A. (Red). *Principles and methods of toxicology.* Tom 3. Raven Press. New York 989 – 1037.
30. Miller M.T., Stromland K. (1999) Teratogen update: thalidomide: a review, with a focus on ocular findings and new potential uses. *Teratology* 60, 306 – 321.
31. Mirkes P.E. (2002) 2001 Warkany lecture: to die or not die, the role of apoptosis in normal and abnormal mammalian development. *Teratology* 65, 228 – 239.
32. Okada A. i wsp. (2004) Amidic modification of valproic acid reduces skeletal teratogenicity in mice. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 71, 47 – 53.
33. Ostrowski K. (1988) *Embriologia człowieka.* Wydawnictwo Lekarskie, PZWL Warszawa.

34. Pisarski T. (2002). Położnictwo i ginekologia. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.
35. Reid M. i wsp. (1984). Fetal malformations in diabetes with high haemoglobin A_{1c} in early pregnancy. *Br Med J Clin Res* 289, 1001.
36. Satge D., Sasco A.J., Little J. (1998) Antenatal therapeutic drug exposure and fetal/neonatal tumors: review of 89 cases. *Paediatr Perinat Epidemiol* 12, 84 – 117.
37. Scialli A.R. (1995) Teratology. W: Crighead J.E. (Red) Pathology of environmental and occupational disease. Masby, St Louis.
38. Shardein J. (1993) Chemically induced birth defects. WYd. 2. Marcel Dekker, New York.
39. Shein-Chung C., Jen-Pei L. (1998). Design and analysis of animal studies in pharmaceutical development. Marcel Dekker. New York.
40. Shepard T.H. i wsp. (2000). A history of the teratology society. *Teratology* 62, 301 – 316.
41. Solecki R. i wsp. (2003) Harmonization of rat fetal external and visceral terminology and classification. Report of the Fourth Workshop on the Terminology in Developmental Toxicology. Berlin 18 – 20 April 2002. *Reprod Toxicol* 17, 625 – 637.
42. Solecki R. i wsp. (2001) Harmonisation of rat fetal skeletal terminology and classification. Report of the Third Workshop on the Terminology in Developmental Toxicology. Berlin 14 – 16 September 2000. *Reprod Toxicol* 15, 713 – 721.
43. Teo S.K. i wsp. (2004) Effects of thalidomide on reproductive function and early embryonic development in male and female New Zealand white rabbits. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 71, 1 – 16.
44. Webster W. (1998) Teratogen update: congenital rubella. *Teratology* 58, 13 – 23.
45. Webster W.S., Freeman J.A.D. (2001) Is this drug safe in pregnancy? *Reprod Toxicol* 15, 619 – 629.
46. WHO (1967) World Health Organization. Principles of the testing of drugs for teratogenicity. World Health Organization Technical Report. Series No 364. Geneva.
47. WHO (2001) World Health Organization. Principles for evaluating health risks to reproduction associated with exposure to chemicals. *Environ Health Criteria* 225, 1 – 185.
48. Wilcox A.J. i wsp. (1988) Incidence of early pregnancy loss. *N Engl J Med* 331, 189 – 196.
49. Williams G.M., Iatropoulos M.J. (2001) Principles of testin for carcinogenic activity. W: Hayes A.W. (Red) Principles and methods of toxicology. Wyd. 4. Taylor and Francis, Philadelphia.
50. Wilson J.G. Fraser F.C. (1977) Handbook of teratology. Tom 4. Plenum Publishing, New York.