

Prof.MUDr., RNDr., Jaroslav Slípka, DrSc  
Ústav histologie a embryologie LF UK v Plzni

## O P O N E N T S K Ý P O S U D E K

diplomové práce Bc. Vladimíra Soukupa: „Orální morfogeneze axolotla: Původ zubů v evolučním kontextu“

Diplomová práce Bc. Vladimíra Soukupa: „Oral morphogenesis in the Mexican Axolotl: Developmental origin of tooth germs in evolutionary contexts „(Orální morfogeneze axolotla: Původ zubů v evolučním kontextu)“ byla vypracována na Katedře zoologie Přírodovědecké fakulty UK v Praze pod vedením Mgr. Roberta Černého, PhD

Rukopis má 60 stran anglického textu, rozdělených do 7 logických kapitol, přičemž poslední kapitola je seznamem použitého písemnictví, zahrnujícím kolem 150 citací většinou moderní zahraniční literatury. Obrazová dokumentace je připojena ve formě „Supplementa“ na konci práce a obsahuje 17 perfektně zpracovaných tabulí, z nichž každá obsahuje sérii obrázků včetně popisu. Jde většinou o barevné mikrofotografie histologických řezů ve stomodeální oblasti zárodků před i po pokusném tkáňovém značení a o přehledná schemata..

K diplomové práci je připojen seznam dosavadních publikací autora ve formě přednášek na 5 zahraničních a 2 tuzemských mezinárodních kongresech, jakož i dvou vystoupeních ve formě posterů, z nichž jeden, presentovaný na „Gordon-konferenci v Itálii byl oceněn jako nejlepší poster konference.

Dodatkem celé diplomové práce je separátní otisk vynikající publikace autorů: Soukup V., Epperlein H.H., Horáček I., Černý R.: „Dual epithelial origin of vertebrate oral teeth“, publikovaná v jednom z nejprestižnějších vědeckých časopisů : Nature, on line O7304:1-4, 2008.

V úvodu shrnuje stručně autor dosavadní znalosti o vývoji zubů, založené na studiu většinou myších zárodků, kde v ontogenezi vzniká sklovina z ektodermálních ameloblastů a zubovina z ektomesenchymu neurální lišty. Cituje také nálezy u většinou vyhynulých druhů ryb, u nichž se zuby zakládají hluboko ve faryngu v oblasti entodermální. Upozorňuje také, že po protržení oro-faryngové membrány se hranice mezi ekto- a entodermem stává nejasnou. Z toho vyplývá i cíl celé práce – zjistit účast zárodečných listů na tvorbě zubu chováním těchto listů na zárodcích axolotla. Autor získal velmi vhodný materiál na značení listů v transgenním chovu axolotla GFP typu, jehož orální ektoderm transplantoval do embrya s entodermem, značeným lipofilním markerem DiI, aby tak mohl sledovat osudy obou stavebních materiálů.

Ve druhé kapitole rozebírá podrobněji současné teorie o externím a interním vývoji zubů, dále porovnává orální a faryngové zuby u ryb a zvláště se věnuje rozdílu mezi vývojem stomodea u ocasatých obojživelníků v rovnání s ostatními obratlovci. U Urodel nedochází

k invaginaci ektodermu a k vytvoření kapsovitého stomodea, ale ektoderm vytváří kolem , entodermální části faryngu jakýsi ektodermální límec, který v jedné vrstvě buněk obaluje entoderm.

Třetí . kapitola je věnována materiálu a metodice a popisuje chov zárodků axolotla, zvláště pak axolotla GFP transgenního typu. Transplantace byly prováděny v časně fázi neuruly a ektodermální štěpy ze stomodea zárodků GFP axolotla byly přeneseny na hostitelské zárodky bílého typu, jejichž entoderm byl před tím značen injikovaným lipofilním markerem DiI. Experimentální zárodky byly pak zpracovány histologickými metodami.

Čtvrtá kapitola shrnuje výsledky autorova bádání a experimentů a pátá kapitola tyto výsledky diskutuje. Na klasických histologických řezech embryonálního stomodea u axolotla si všímá autor rozdílu mezi základy zubů v anteriorní části a oblasti posteriorní, kde jsou základy skloviny nápadně pokryty buňkami se žloutkovými granuly. Už tento rozdíl by mohl svědčit o rozdílném původu sklovinného epitelu, teprve ovšem autorovy transplantační experimenty toto podezření potvrzují. Výsledky možno shrnout do konstatování, že základy zubů se v anteiorní části vyvíjejí z ektodermálního límce (zuby premaxilární a maxilární, vomeropalatinální a dentární), zatímco v části posteriorní jsou entodermálního původu (vomeropalatinální a splenické) jak dokazují experimenty a se značeným entodermem nebo dokonce v přechodové zóně mezi oběma listy jsou původu smíšeného, tedy ekto-entodermálního.

To jsou sice nejužitejší výsledky v problematice odontogeneze, ale autor se vyjadřuje k mnoha dalším problémům morfogeneze stomodeální oblasti. Zvláštní pozornost věnuje komparaci vývoje ústní dutiny urodel se stomodeem ostatních obratlovců a tvorbě ektodermálního límce. Záslužná je kapitola o homologisaci orofaryngeální membrány, která bývá staršími autory špatně definována až popírána. Zajímavý je pak pohled na vztahy membrány k vývoji zubů, protože tato membrána je posunuta anteriorně tlakem žloutkem nabitých entodermálních buněk a přední zuby se tedy vyvíjejí paradoxně v oblasti za membránou. Autor se zabývá také otázkou ruptury orální membrány, vývojem adenohypofyzy z materiálu ektodermálního límce atd.

Tolik tedy ve velké stručnosti k výsledkům předloženého spisu. Za těmito výsledky je ovšem nutné vidět onu mravenčí činnost v laboratořích, kde autor systematicky na stovkách preparátů odhaloval krok za krokem zákonitosti odontogeneze. Je jistě nutné pochválit autora za vynikající techniku transplantačních experimentů, a za perfektní fotodokumentaci a za precísní interpretaci nálezů. Není nejmenších pochyb, že práce řeší vysoce závažnou aktuální problematiku odontogeneze na modelu živočicha, který přímo nabízí možnost zobecnění nálezů jak po stránce ontogenetické, tak i fylogenetické. Práce tak dostává charakter značného obecně biologického významu.

Práce nutí čtenáře k zamyšlení nad správností vžitých obecně-biologických představ o významu zárodečných listů. Po dvě stě let – od dob Panderových a Remakových – žijeme většinou v představách o jedinečné specifitě tří primárních zárodečných listů a mnozí ani nerespektují možnost jejich mesenchymální derivace. Na této specifitě pak spočívají zákonitosti vývoje homologických struktur.

V případě vztahů ekto-entodermálních hraje velkou úlohu hranice oro-faryngové membrány, která u většiny obratlovců jasně a ostře odděluje oba listy. V evoluci většinou pozorujeme expansi ektodermu, který ( v závislosti na expansi prosencefala) vchlípením do stomodea posouvá orální membránu stále distálněji. U urodel tomu tak není – tam se oba listy intimně spojují tím, že ektoderm jako objímka obklopuje límcovitě entodermální výběžek faryngu. Dochází tak k promísení buněk obou typů a nelze se divit, že základy zubů mohou v těchto distálnějších místech obsahovat oba druhy buněk.

Orofaryngová membrána není ovšem jedinou hranicí mezi povrchovým ektodermem a entodermem faryngu. Stejnou hranici tvoří u zárodků i membrány branchiální, přepažující

žaberní štěrbině. Také tady dochází k přímému styku obou listů a po protržení membrán v nichž se oba typy buněk mísí, hranice mizí. To vedlo některé autory k revisi názorů na výstelku faryngu, kterou nepovažují za čistě entodermální, ale označují ji za gastrodermální, aby vyjádřili její smíšený charakter. Tento smíšený charakter znají také klinici, kteří se setkávají v oblasti faryngální s nádory typicky epidermálního rázu.

Uvedené poznámky navrhuje oponent jako námět do diskuse v rámci obhajoby. Jinak po obsahové stránce nelze práci vytýkat nějaké chyby v interpretaci výsledků – konečně koncentrát výsledků prošel přísnou recenzí špičkových odborníků v časopise Nature.

Práce je psána s precizní pečlivostí a dobrou angličtinou a zaslouhovala by si také překlad do češtiny a zveřejnění v našem odborném tisku. Lze si přát, aby se celé dílo stalo základnou pro pokračování ve výzkumu nejen autora, ale i dalších odborníků ať už v oblasti vývojové biologie, ale zvláště genetiky a snad i medicíny.

## Závěr

Předložená diplomová práce Bc. Vladimíra Soukupa“ Oral morphogenesis in the Mexican Axolotl: developmental origin of tooth germs in evolutionary contexts“ je dílo zcela mimořádné, vysokého obecně biologického významu, které značně rozšiřuje dosavadní znalosti o zkoumané problematice a je tedy velice významné z hlediska základního biomedicinského výzkumu. Autor prokazuje schopnost k samostatné vědecké práci a obohacuje naši i světovou literaturu o řadu prioritních nálezů. Spis vysoce překračuje požadavky na diplomovou práci, a proto rád doporučuji jeho přijetí k dalšímu řízení a k možnému ocenění.

Plzeň, 10.9.2008



Prof. MUDr., RNDr. Jaroslav Slípka, DrSc