

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

## OPONENTSKÝ POSUDEK

doktorské disertační práce Mgr. Pavly Havelkové: “Ontogenetic development of the pectoral girdle in Anura“.

Doktorská disertační práce Mgr. Pavly Havelkové: „ Ontogenetic development of the pectoral girdle in Anura“ byla vypracována v rámci doktorandského studia na Ústavu zoologie Biologické fakulty Jihočeské Univerzity pod vedením školitele Doc.RNDr Zbyňka Ročka, DrSc z Paleobiologické laboratoře GÚ ČAV a Zoologického ústavu PřF UK v Praze.

Disertace byla předložena v anglickém jazyce v jednom útlém vázaném svazku o 79 strojopisných stranách ( s 5 tabulkami). Práce je rozdělena do 4 logických kapitol. Posledních 8 stran zaujímá výčet použité literatury, obsahující kolem 130 citací většinou moderního zahraničního písemnictví. Do části textové je vloženo 119 obrázků, zvláště barevné dokumentace mikroanatomických řezů a schémat zkoumané oblasti, jakož i 3 tabulky.. Disertace důstojně navazuje na evolučně morfologickou problematiku, v níž si česká morfologická škola získala svými dosavadními výsledky mezinárodní respekt.

V první úvodní kapitole probírá stručně autorka nejprve současné znalosti o stavbě pektorálního pletence u „ primitivních“ obojživelníků a zvláště primitivních Salientí a aby se dostala k moderním žábám, kaudátům a nakonec přehledně k ramennímu pletenci ostatních obratlovců.

Druhou kapitolu věnuje „materiálu a metodice“. V práci použila larvální materiál i dospělé u sedmi druhů z pěti čeledí Anur. Celkem kolem pětiset larválních individuí bylo možno zařadit do vývojových stadií 50-66, podle tabulek Nieuwkoopa a Fabera (N/F). Materiál barvila alcianovou modří a alizarinem a projasňovala glycerolem. Použila také některých histologických sérií Discoglossa z nichž vytvořila trojrozměrné modely, jejichž obrazy však nereprodukuje.

Třetí kapitola je věnována „Výsledkům“. Nejprve probírá anatomii jednotlivých skeletálních elementů pletence u dospělců od lopatky po sternální elementy. Ve druhé subkapitole pak podává popisy vývoje těchto elementů stadium po stadiu u jednotlivých sedmi studovaných druhů žab.

Čtvrtou kapitolu autorka rozdělila do tří subkapitol, v nichž diskutuje nejprve ontogenetický vývoj jednotlivých studovaných skeletních elementů ramenního pletence. V subkapitole nazvané nezvykle „Transformace pletence u předků žab“ se zabývá evolucí tohoto pletence. Poslední půldruhé stránky této kapitoly věnuje pak autorka překrývání párových epikorakoidů, jako časté asymetrii těchto skeletních elementů.

Pátá kapitola je věnována souhrnu celé disertace, v šesté je poděkování vedoucímu práce a spolupracovníkům a sedmá je tvořena soupisem použitého písemnictví.

Z disertace vyplývá, že pektorální pletenec se vyvíjí teprve po humeru ze třech chondrifikačních center, patřících základům enchondrálně osifikujících kostěných útvarů skapuly, korakoidu a prokorakoidu. Tyto útvary pak vytvářejí extense chrupavčitého epikorakoidu a supraskapuly. Sternální elementy považuje autorka za evoluční novinky, nahrazující interklavikulu temnospondylových předků anur. Enchondrální elementy se podle autorky vyvinuly v evoluci z jednotného skapulokorakoidu předků anur pedomorfosou a dermální elementy se redukovaly na klavikulu a kleitrum. Redukce osifikace ramenního pletence potvrzují podle autorky neotenní původ Anur.

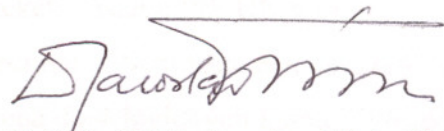
Tolik tedy k výsledkům předložené disertace. Je jen přirozené, že čtenáře celého díla napadá řada doplňujících poznámek a otázek k výsledkům autorčina výzkumu. Po stránce obsahové nelze disertaci vytýkat nějaké chyby v interpretaci jejích studií – konečně tyto výsledky byly předloženy do světově prioritního morfologického časopisu a prošly recenzí nejvyšších oponentů. Přesto si oponent dovoluje z důvodů diskusních předložit svůj dotaz z okrajové, ale málo známé oblasti evoluční historie komplexu sternu a a žeber. Je sternum skutečně evoluční novinkou a evolvovalo se později než pletenec a nezávisle v různých liniích tetrapod, nebo spojení sternu se žeby mohlo existovat u fosilních amfibií, ale chrupavčitá tkáň se nemohla zachovat?

Z našeho krátkého výčtu výsledků a poznámek však nevyplývá, kolik mravenčí práce autorka musela vynaložit, aby v záplavě stovek preparátů dospěla k předloženým závěrům. Práce je psána s precizní ženskou pečlivostí a dobrou češtinou, ovšem čtenáři se zdá její sloh až příliš úsporný, jakoby byla psána pro časopiseckou publikaci. Zaslouhovala by si proto překlad celého textu do cizího jazyka. V tom případě bych doporučoval ještě dokumentovat avizované trojrozměrné rekonstrukce rozšířit také histologickou dokumentaci. Také bych doporučoval zařadit do seznamu písemnictví Ročkovu „Historii obratlovců“, která má ještě vyšší úroveň než citovaná monografie Romerova.

### **Závěr**

Předložená doktorská disertace Mgr.Pavly Havelkové:“ Ontogenetic development of the pectoral girdle in Anura“ je dílo, které rozšiřuje naše dosavadní znalosti o zkoumané oblasti a je tedy významné zvláště z hlediska obecně biologického. Autorka prokázala schopnost k samostatné vědecké práci, která ji umožnila dosáhnout některých prioritních výsledků a obohatit tak naši i světovou odbornou literaturu. Z těchto důvodů oponent doporučuje přijmout předloženou disertaci po její obhajobě jako podklad pro další doktorské řízení

V Plzni dne 10.6.2006.



Prof.MUDr.RNDr.Jaroslav Slípka,DrSc

Předložená práce se poněkud vymyká dnes již standardní zvyklosti koncipovat disertaci jako stručně komentovaný soubor několika časopiseckých sdělení. Takovéto konstatování může být, počítám, obecně vnímáno jako jednoznačný odsudek spisu. Pokládám tedy za nezbytné upozornit, že přinejmenším v daném případě je míním spíše jako kompliment - ostatně, co stařec, nesdílím již přesvědčení, že dnešní stav musí být nezbytně lepší než minulé varianty. Práce má formu ucelené monotematické monografie, je psána velmi koncizní angličtinou a i když formálně není rukopisem předkládaným do tisku, zjevně splňuje všechna kritéria potenciálního přijetí do renomovaného časopisu. Neskrývám přesvědčení, že takovýto rozvrh disertačního projektu může být v lecčems (přinejmenším jako pedagogický počín) užitečnější než obligatorní cvičení v publikační versatilitě – nutí pretendenta pojednat vyčtené téma komplexně, v širším kontextu a s promyšlením souvislostí, které lze v časopiseckých sděleních přejít odkazem na mainstreamové názory. Zvolenou formu disertace pokládám tedy za více než přijatelnou a počítám, že relevantní publikační zhodnocení předloženého rukopisu je nasnadě (otázka do diskuse: jaký je stav věcí v tomto směru?).

Současně ovšem, co recensent, nemohu skrýt jistou nelibost nad tím, že nemohu svůj úkol usnadnit obligatorním poukazem „práce prošla již náročným recenzním řízením a podrobného posuzování netřeba“. Stručně řečeno, můj úkol není nikterak snadný. Téma disertace je velmi komplexní a dosti závažné. Hrudního pletence a sternum jsou jedním z klíčových znaků tetrapodní organizace, jejich úprava předznamenává pohybové dispozice hrudní končetiny a tedy i celý biomechanický rozvrh tělesné stavby. Organisačně i vývojově je to velmi komplikovaná struktura integrující různé elementy distálního komplexu dermatokrania, proximální elementy končetinového základu a specifické elementy diferencující se z basálního endochondrálního elementu končetiny – scapulocoracoidu, resp. vznikající de novo jako evoluční novinky tetrapodní organizace. Vývojová a diferenciační dynamika těchto elementů vytváří pestrou mozaiku možností, v jejichž využití se jednotlivé vývojové linie tetrapodů nemálo liší. Situace u obojživelníků je v tomto směru zvláště důležitá, neboť (zvláště při zahrnutí fosilních linií) pokrývá téměř celé spektrum basální vývojové radiace. Autorka si této skutečnosti je dobře vědoma a v tomto smyslu exponuje i brilantně formulovaný úvod práce na str. 1-10. Připomíná situaci u nejstarších forem, charakterizuje specifika pletence žab a exponuje these, že vůdčím prvkem evoluční transformace je zde postupná redukce dermálních elementů na úkor rozvoje a specifické diferenciace chrupavčitých elementů, zejm. procoracoidu, coracoidu a suprascapuly. Stručně pak připomíná poměry u Caudata a u jiných skupin obratlovců (s výjimkou prvních tří řádků příslušné kapitoly – 1.5., které dle mého soudu by bylo užitečné vypustit, jde o Amniota). Podstatná pozornost zde je po právu věnována problematice interclaviculy a endochondrálních elementů lopatky. V těchto souvislostech připomíná rovněž specifickou situaci v synapsidní linii, přítomnost interclaviculy a endochondrálních elementů claviculy (p.9-10). V podobných souvislech možná mohly být zmíněny také práce Klímy (1973,1987) ukazující, že sternum různých skupin Theria osifikuje z více center a představuje tedy vývojově složitou strukturu integrující blastémy různého původu. Tato zjištění by mohla být vzata v potaz i v diskusích vlastních zjištění o struktuře sternu (srv. např. problematika omosterna – viz níže).

Vlastní práce je založena zevrubném srovnávacím studiu embryonálního materiálu preparovaného standardisovanou technikou prosvětlování a dvojího barvení. Soubor, který takto autorka zpracovala je ovšem monumentální: jde o celkem 571 kusů dokumentujících kompletní vývojové řady (stadia 50-66 dle Nieuwkoop a Fabera, plus adultní jedinci) 7 druhů 5 čeledí. Těžiště výběru taxonů je v basálních skupinách Discoglossidae, Pipidae a Pelobatidae, soubor je dále doplněn materiálem 11 dalších druhů reprezentujících další čeledi (Leptodactylidae, Hylidae, Dendrobatidae, Rhacophoridae). Výsledky jsou uspořádány přehledně a logicky, členěny jsou do dvou bloků – první stručně synopticky shrnuje poměry jednotlivých studovaných elementů, druhý podává zevrubný přehled stadiality jejich vývoje u jednotlivých taxonů. Vlastní mezitaxonové srovnání, logicky představující finální část výsledků, se nicméně objevuje až v obsáhlé kapitole Diskuse. Ta představuje myšlenkové jádro práce a velmi názorně dokládá vysokou profesionální úroveň zvládnutí věcného rozvrhu problematiky i schopnost autorky fakticky zúročit vlastní data v kontextu aktuálního písemnictví oboru. Znalost literatury je vynikající (seznam obsahuje 152 položek), práce s literaturou plně odpovídá profesionálnímu standardu. Výstupy studie, tak jak vyplývají z kritického zhodnocení vlastních zjištění, a jak jsou ve stručné verzi shrnuty v závěrečných Conclusions“ představí dostatečně obšírně patrně autorka sama. Co recensent se omezením na konstatování, že takřka všechny se zjevně opírají o kvalitní evidenci a jsou solidně zdůvodněny. Stručně řečeno, práci pokládám za zřejmý doklad autorčiny dispozice k tvůrčí vědecké práci i dostatečný podklad pro úspěšné ukončení doktorandského studia a neudivuje, že k ní nemám podstatnějších výhrad. Následující poznámky mají pak spíše charakter nesystematických formálních připomínek resp. zvědavých laických dotazů.

\* Výrazné odlišnosti v nástupu osifikace mezi *Bombina bombina* a *B.variegata*, které autorka konstatuje, představují pozoruhodný doklad adaptivního potenciálu vývojové dynamiky studovaných struktur. Existují nějaké podobné příklady u jiných taxonů?

\* překvapivě málo pozornosti je v textu věnováno vývoji cleithra a mezitaxonovému srovnání vývoje této struktury – proč? Je to všude stejné? Odkud potom tak značné tvarové rozdíly? Je distinkce cleithra a suprascapulární chrupavky vždy tak jednoznačná jak apodikticky konstatováno na str. 52?

\*Jak je to s kalcifikací suprascapuly (z obr. 110-111 jsem trochu zmaten)? jaká je topologie dotyčné kalcifikace? liší se v tomto směru jednotlivé taxony?

\*Je zřejmé, že většina srovnávacích nálezů, které autorka demonstruje v kapitole diskuse, by byla bezprostředně použitelná jako znakový aparát pro fylogenetickou analýzu. Uvažuje autorka o takovémto zhodnocení práce? Je v tomto směru na co navázat (Frost et al. 2006?) ?

\*Lze jen litovat, že autorka nevyjádřila alespoň v některých případech (omosternum, epicoracoid etc.) distribuci stavu příslušných znaků na kladogramu skupiny explicitněji (podobně jako naznačeno v obr. 116). Alespoň pro diskusi tedy: které ze studovaných znaků vykazují nejvyšší kongruenci s kladogramem, které pak podporují odlišné fylogenetické hypotézy?

\* Nemalá pozornost je obecně v práci věnována problematice distinkce arciferního a firmisternálního uspořádání pletence. Je to důraz bezpochyby velmi oprávněný, přinejmenším, proto, že firmisternální konstituce bývá chápána jako zřejmá autapomorfie vymezující korunový taxon Neobatrachia: Firmisternia (Dendrobatidae, Ranidae, Rhacophoridae, Hyperolidae, Microhylidae etc.). Zásadní odlišností obou uspořádání je tvar a úprava centrální chrupavky, označované jako epicoracoid. Autorka zdůrazňuje nutnost vymezit obě uspořádání vývojovými specifikami (p.55) a dokládá, že tato chrupavka vzniká v dotyčných případech různým způsobem – při firmisternálním uspořádání nejde o mediální extenze procoracoidu, ale o sekundární fúzi mediálních terminálních chrupavek coracoidu. Lze tedy říci, že základním znakem firmisternálního uspořádání je redukce diferenciačního potenciálu procoracoidu? Co zde podmiňuje důslednou axiální organizaci celého komplexu? Rychlejší diferenciace mediální hrany coracoidů? Nebo nějaká centrální struktura – „axiální organisátor“, generující do stran osové chrupavky sternálního komplexu? Mimochodem, tato možnost nemusí být zcela fantaskní – pruh kmenových buněk diseminujících laterálně své diferenciační produkty je u obratlovců patrně dosti běžný ontogenetický modul.

\* omosternum je topograficky i funkčně ekvivalentem interclaviculy – míra jeho diferenciace a osifikace je zjevně korelována se stupněm finisternality v naznačeném smyslu: skutečně nemůže jít o reaktivovaný rudiment interclaviculy?

\*Jaké jsou v tomto směru poznatky o jiných taxonech s touto konstitucí? (trochu mne překvapuje, že v diskusi se neuplatňuje aktivnější interakce se závěry Shearmana (2005), když už v úvodu (p.7) tuto práci autorka uvádí jako „the most exhaustive description of the development of the anuran pectoral girdle“).

\*termín rudiment je v práci používán opakovaně (p. 7.49.50, 59, 68 aj.) v poněkud matoucím kontextu – ve smyslu nediferencovaný vývojový základ, kondensace apod. Vzácně adekvátně (jako označení přítomnosti archaické struktury v kontextech kde normálně chybí) je termín použit např. na str. 58 dole

\*p.65: metamorphosis is abbreviated – proti neutrálnímu deskriptivnímu výrazu „shortened“ naznačuje použitý termín, že ve hře je cosi více než nějaké prosté heterochronie. Je tomu tak? Čtenář by v takovémto případě však asi očekával, že v textu bude trochu rozvedeno co je zde zkratkovitě, t.j. nekompletní, co je vynecháno z původní sekvence transformačních kroků a, v posledku, jaké to má vývojové důsledky. Delece nějakého prvku morfogenetické transformace má totiž v hodnocení předmětu zájmu stejnou důležitost jako delece genu při srovnávání genotypické konstituce. Může jít o apomorfii zásadního významu!

\*p.65: termín necrobiotic metamorphosis – je převzatý z literatury ? v každém případě mi zní dost nevhodně – etymologicky odkazuje k nekrose – v resorbci ocasu pulců se však uplatňuje jiný typ buněčné smrti (apoptosa), je to dokonce vstupní čítankový případ apoptosy

\*zvědavý dotaz mimo soutěž: autorka nashromáždila velmi rozsáhlý soubor embryonálních preparátů, a i když to nebylo jejím úkolem, počítám, že si prohlédla i situaci volné končetiny – liší se jednotlivé skupiny v morfogenesi elementů volné končetiny, např. v postupu redukce 5.prstu?

V podobných dotazech by jistě bylo možné pokračovat dosti dlouho. Již tato skutečnost naznačuje, že posuzovaný spis je nejen dokladem rutinního ovládnutí řemesla vědy, ale i skutečným tvůrčím počinem stimulujícím aktivní myšlenkovou interakci a inspirujícím k dalším výzkumným činům. Je bezpochyby hodnotným příspěvkem příslušného písemnictví a nepochybně také dostatečným podkladem pro udělení titulu PhD. Práci hodnotím jednoznačně kladně a plně doporučuji.



Prof. Dr. Ivan Horáček  
Katedra zoologie PřF UK  
horacek@natur.cuni.cz

**Ivan Misek, D.V.M. Ph.D. Prof.**

*Department of Animal Embryology, Cell and Tissue Differentiation*

**Institute of Animal Physiology and Genetics**

Czech Academy of Sciences

Veveri 97, 602 00 Brno 2, Czech Republic

---

June 12, 2006

## **REFeree COMMENT**

### **Pavla Havelkova: Ontogenetic development of the pectoral girdle in Anura.**

PhD. thesis of Mrs. Havelkova is focused on the pectoral girdle development in seven frog species (*Discoglossus pictus*, *Bombina bombina*, *Bombina variegata*, *Xenopus laevis*, *Pelobates fuscus*, *Bufo bufo* and *Rana dalmatina*). The pectoral (shoulder) girdle consists of scapula, coracoid bone and clavicle, which are completely developed as individual bones in many vertebrates below the mammals (e.g. birds, reptiles or amphibians). Compared to lower vertebrates (and on the difference of that), for example in the domestic mammals, there is a considerable reduction of the coracoid to a coracoid process of the scapula and of the clavicle to the clavicular intersection, which is a connective tissue strip within the brachiocephalicus muscle. There often remains as well a small bony remnant of the clavicle, which may be observed radiographically at the medial end of of the clavicular intersection. It appears as a lamina of bone and cartilage.

In the pectoral girdle in the last, the trend has been to lose the dermal elements of the girdle and to evolve novel new bones (neomorphs). In fishes, the only endochondral element is the scapulocoracoid. This bone splits to form the scapula and the procoracoid which is sometimes referred to just as the coracoid. In early amphibians, there is still a significant amount of dermal bone, but note that the posttemporal and supra- and postcleithra are gone. In modern amphibians, the only dermal bone left is the small interclavicle and sometimes a clavicle. In reptiles, the pattern is pretty much the same. In non-mammalian therapsids and monotremes, we see the development of a neomorph. This is the coracoid proper. A procoracoid is also present as are two dermal bones, the clavicle and the interclavicle. In modern mammals, the only dermal bone that may be present is the clavicle and this is even missing or tiny in most mammals, we primates excluded. Meanwhile, the coracoid was fused to the scapula.

The descriptions of Mrs. Havelkova were based on fixed frog specimens in approx. 7 % formaldehyde solution and their double-staining for bone and cartilage using method of

Wassersug (1976). In addition, dermal bones and enchondral elements were examined in order to determine positional relationships in the pectoral girdle. It was observed ossification of both enchondral and dermal elements of the pectoral girdle during pre- as well as postmetamorphic development. The right-left distribution within the species was compared using t-test in STATISTICA 6.0 software. It is necessary to say that the level of formal preparation of PhD-thesis is very good. The photographic documentation has also high level.

It seems on the basis of obtained results that all three enchondral parts (originally independent cartilaginous rudiments) of pectoral girdle (procoracoid, coracoid and scapula) fuse together soon in ontogenesis. On the other hand, dermal ossification of the pectoral girdle (clavicle and cleithrum) of all species under study began almost simultaneously with the earliest beginning of enchondral ossification.

It is important to say that at least a part of results documented in PhD-thesis, was accepted for publication as original full paper entitled 'Development of the pectoral girdle in a primitive anuran (*Discoglossus*), and its transformation in the ancestry of frogs' in the peer reviewed *Journal of Anatomy* (IF=2,010). This fact itself reflects very good level of results presented in thesis that have been already discussed in international scientific forum and agreed by professional journal referees.

I have a couple of following questions,

- 1) The pectoral girdle articulates the forelimb with the axial skeleton in all vertebrates with paired anterior appendages. Its structure has been well described, but there are little comparative embryology data to indicate how the pectoral girdle across different vertebrate taxa has been built. It could be suggested that the muscular connections between the head and pectoral girdle have been maintained between these once adjacent bones, displaced during vertebrate evolution?
- 2) Did you also observed insertions of muscles playing important role in movement of forelimbs in area of the pectoral girdle?
- 3) Did you observe any neoteny process in frame of the pectoral girdle development?

This thesis undoubtedly presents more than enough data to demonstrate author's knowledge, skills and ability to design and conduct great scientific projects. It is a pity in this line that Mrs. Havelkova published only one full paper so far. I believe next results will be published very soon. I was looking for any other articles composed by Mrs. Havelkova in several

bibliographical databases (e.g. Web of Science, Scopus, PubMed) but, unfortunately, without success.

In any case, I am happy to recommend the award of the degree “Doctor of Philosophy” to Mrs. Pavla Havelkova.



Ivan Misek