

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra zoologie a ornitologická laboratoř



Morfogeneze středního ucha

Bakalářská práce

Zuzana Vránová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Systematická biologie a ekologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2013

Vedoucí práce: RNDr. Vlasta Lungová, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně v průběhu bakalářského studia pod vedením RNDr. Vlasty Lungové, Ph.D. na základě uvedených pramenů a literatury.

V Olomouci dne 1. 4. 2013

.....

Zuzana Vránová

Poděkování patří mé vedoucí práce, paní RNDr. Vlastě Lungové, Ph.D., za cenné rady, ochotu, čas a trpělivost, které mi při zpracování bakalářské práce poskytla. Dále bych ráda poděkovala svým rodičům za jejich podporu a podnětné připomínky.

Bibliografická identifikace

Jméno a přímení autora: **Zuzana Vránová**

Název práce: **Morfogeneze středního ucha**

Typ práce: **Bakalářská**

Pracoviště: **Katedra zoologie a ornitologická laboratoř**

Vedoucí práce: **RNDr. Vlasta Lungová, Ph.D.**

Rok obhajoby: **2013**

Abstrakt:

Schopnost slyšet hraje nedílnou roli v odpovědi, přežití a komunikaci u většiny obratlovců. U lidí je navíc tato schopnost důležitá pro vývoj řeči narozeného dítěte (Joshi et Tucker, 2012) i jeho začlenění do společnosti (Richter et al, 2010).

V rámci této práce je vypracovaná literární rešerše vztahující se jak k morfologii sluchového ústrojí – konkrétně části *auris media*, tak i k úplnému počátku vývoje středního ucha. Dále je proveden soupis základních genů, které se vývoje účastní.

Kladívko (*malleus*), kovádlíka (*incus*) a třmínek (*stapes*) jsou nejmenšími kostmi lidského těla. Mezi těmito sluchovými kůstkami, které tvoří střední ucho, se nachází také nejmenší kloubní spojení. Správná exprese genů, které ovlivňují osifikaci a skloubení sluchových kůstek, je pro vývoj sluchu zásadní. Dojde-li během vývoje k fúzi těchto kůstek, má to fatální následek pro vývoj sluchu, protože tak dochází k převodním vadám ve sluchovém ústrojí. Embryonální původ této oblasti je velmi rozmanitý – *malleus* a *incus* se vyvíjí enchondrální osifikací z proximální části Meckelovy chrupavky prvního žaberního oblouku, *stapes* se vyvíjí z druhého žaberního oblouku, bubínková dutina má svůj původ v první žaberní výchlípce a bubínek (*membrana tympani*) má dokonce původ trojí – ektoderm první žaberní rýhy, entoderm první žaberní výchlípky a ještě mezi nimi ležící vrstvičku mesenchymu.

Přesného pochopení časoprostorového rozložení a dynamiky hlavních morfogenetických procesů včetně nalezení klíčových genů, které se podílí na vytvoření funkčního sluchového aparátu, není dosud dosaženo, ale díky stále se vyvíjejícímu genovému inženýrství by se v budoucnu mohlo vrozené hluchotě zabránit.

Klíčová slova: **sluchové kůstky, Meckelova chrupavka, faryngové (žaberní) oblouky**

Bibliographic identification

Autor's first name and surname: **Zuzana Vránová**

Title of the thesis: **The Middle Ear Morphogenesis**

Type of work: **Bachelor Work**

Department: **Department of Zoology and Ornithological Laboratory**

Supervisor: **RNDr. Vlasta Lungová, Ph.D.**

The year of presentation: **2013**

Abstract:

The auditory sense plays an important role in responds, survival and communication in most vertebrates. In human, this ability is necessary for speech development at newborns (Joshi et Tucker, 2012) and also for incorporation of a child into society (Richter et al, 2010).

In scope of this work, a literature search is performed which relates both to morphology of hearing organs – in particular, to its auris media part – and also to the very initial phase of development of the middle ear. Next to this, an overview of genes involved in that development is provided.

The *malleus*, *incus* and *stapes* are the smallest bones of human body. There are also the smallest joint connections between these auditory ossicles. Appropriate expression of genes which control ossification and joint-connections of these small elements is crucial for development of auditory sense. When it comes to fusion of these small bones during development, it leads to fatal consequences for the ability to hear due to transfer imperfections in auditory organs.

Embryogenic origin is miscellaneous in this region - *malleus* and *incus* is developed by enchondryal ossification from proximal part of Meckel's cartilage, which belongs to first branchial arch, the *stapes* is developed by second branchial arch, the tympanic cavity origin is in the first branchial pouch and the tympanum itself has a triple origin – ectoderm of the first branchial arch, entoderm of the first branchial cleft and there is also mesenchymal layer laying between them.

Precise understanding of spatio-temporal morphogenetic processes including key genes, which are involved in fully functional auditory organ, is not reached yet; but, thanks to permanently developing gene engineering, the in-born deafness can be prevented in future.

Key words: **auditory ossicles, Meckel's cartilage, branchial arches**

Obsah písemné bakalářské práce

1. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	8
2. ÚVOD	9
3. CÍL PRÁCE	10
4. MORFOLOGIE SLUCHOVÉHO ÚSTROJÍ ČLOVĚKA	11
4.1 AURIS EXTERNA (UCHO ZEVNÍ).....	12
4.2 AURIS MEDIA (UCHO STŘEDNÍ)	12
4.2.1 <i>Cavum tympani (bubínková dutina)</i>	12
4.2.2 <i>Ossicula auditus (sluchové kůstky)</i>	13
4.3 AURIS INTERNA (UCHO VNITŘNÍ).....	14
5. FYZIOLOGIE SLUCHOVÉHO ÚSTROJÍ ČLOVĚKA.....	15
6. EMBRYONÁLNÍ VÝVOJ SLUCHOVÉHO ÚSTROJÍ ČLOVĚKA	16
6.1 VÝVOJ ČELISTÍ	17
6.2 VÝVOJ SLUCHOVÝCH KŮSTEK	18
6.3 VÝVOJ STŘEDOUŠNÍ DUTINY.....	19
6.4 VÝVOJ UŠNÍHO BUBÍNKU	20
7. EXPERIMENTÁLNÍ ORGANISMY A METODY STUDIA PŘI VÝVOJI SLUCHOVÉHO ÚSTROJÍ.....	21
7.1 MORFOLOGIE SLUCHOVÉHO ÚSTROJÍ MODELOVÝCH ORGANISMŮ	22
7.2 METODY STUDIA	24
8. MORFOGENETICKÉ A MOLEKULÁRNÍ MECHANISMY.....	26
8.1 VYBRANÉ MORFOGENETICKÉ PROCESY ÚČASTNÍCÍ SE VÝVOJE STŘEDNÍHO UCHA	26
8.2 MOLEKULÁRNÍ MECHANISMY.....	28
9. APLIKACE POZNATKŮ.....	38
10. ZÁVĚR	39
11. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	40

1. Seznam použitých zkratk

Bapx1	Bagpipe homeobox
BMP4	Bone morfogenetic protein 4 (kostní morfogenetický protein)
Brn4 nebo také Pou3f4	Brain specific homeobox 4; pou class 3 homeobox 4
CR	Crown-rump length (temeno-kostrční délka)
Dlx1/2	Distal-less homeobox1/2
DNA	Deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)
ET-1	Endotelin-1
Hoxa-1/2	Homeobox A – 1/2
Eya1, EYA1	Eyes absent homolog 1
Fgf8/9, FGF8/9	Fibroblast growth factor 8 a 9 (fibroblasty růstový faktor)
Gdf	Growth differentiation factor (růstový diferenciační faktor)
Gsc	Goosecoid gene
Lig.	Ligamentum (vaz)
M	Musculus (sval)
MC	Meckelova chrupavka
Msx1	Msx homeobox 1
NCC	Neural crest cells (buňky neurální lišty)
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen (proliferační jaderný antigen)
Prx1	Paired related homeobox 1
PTP	Protein tyrosin phosphatases
RA	Retinoic acid – kyselina retinová
Six1, SIX1	Six homeobox 1
Sox9 (SRY)	Sex determination region Y
Tcof1	Treacher Collins Franceschetti syndrome 1
TF	Transkripční faktor
TFAP2A	Transcription factor AP-2 alpha
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling

2. Úvod

Ucho – orgán sluchu – se skládá z *auris externa*, *auris media* a *auris interna*. *Auris media* (ucho střední) zajišťuje převod zvukových vln mezi „přijímačem“ – ušním boltcem a místem, kde dochází jejich zpracování – vnitřním uchem. Střední ucho se skládá z bubínku a tří sluchových kůstek uložených v bubínkové dutině. Morfologie sluchového ústrojí je poměrně dobře prozkoumanou záležitostí, nicméně v oblasti morfogeneze je stále mnoho nezodpovězených otázek. V předkládané práci je proveden popis morfologie a fyziologie sluchového ústrojí, se zaměřením na středoušní dutinu a na vývoj a formování sluchových kůstek. Podrobné zpracování této problematiky má řadu klinických aplikací. Nesprávný vývoj jednotlivých struktur může vést k částečné či úplné hluchotě, což zejména u člověka významně narušuje komunikaci mezi lidmi i celkový rozvoj řeči (Joshi et Tucker, 2012). S vývojovými malformacemi v oblasti středoušní dutiny jsou spojeny především převodní poruchy sluchu. Tyto vady sluchu mohou být geneticky podmíněné (i v rámci různých syndromů), dále vrozené (tj. získané během embryonálního stadia) či získané kdykoliv během života.

Vrozené vývojové poruchy středouší jsou způsobeny především chybnými molekulárními signály, které jsou vysílány do oblastí, kde dochází ke vzniku středního ucha. *Malleus* a *incus* se vyvíjí z chrupavky prvního žaberního oblouku, třímínek se vyvíjí z druhého žaberního oblouku, nicméně ne z jeho chrupavky jak se do nedávna předpokládalo. Mutace v genech, které se vývoje účastní (např. *Sox9*, *Bapx4*, *Brn4*) způsobují různé deformace kůstek, jejich srůstání nebo také může nastat případ, kdy středoušní dutina není v průběhu vývoje „vyčištěna“ a převod zvuku je tedy téměř znemožněn. Na sledování molekulární podstaty hlavních morfogenetických procesů uplatňujících se při vývoji středního ucha u vybraných experimentálních organismů je zaměřena druhá část této práce. Mezi nejčastěji používané experimentální organismy, na kterých je utváření středoušní dutiny sledováno, patří zejména laboratorní myši, morčata a kuřata. Tyto organismy však vykazují druhově specifické odlišnosti, které musí být vzaty v úvahu při interpretacích zákonitostí formování středoušní dutiny u člověka.

3. Cíl práce

Tato bakalářská práce se zaměřuje na souhrnné zpracování poznatků týkajících se morfologie, fyziologie a embryologie sluchového ústrojí se zaměřením na středoušní dutinu u člověka a vybraných experimentálních organismů - laboratorní myši, morčete a kuřete.

V embryonální části jsou pak stanoveny tři dílčí cíle:

- 1) vymezení oblasti vývoje a vývojových struktur, ze kterých se diferencuje střední ucho,
- 2) souhrnné popsání morfogenetických procesů - tzn. proliferace, diferenciace, migrace a apoptózy, které se účastní morfologie středního ucha, především však morfologie sluchových kůstek – kladívka, kovadlinky a třmínku,
- 3) zpracování hlavních molekulárních mechanismů, které tyto morfogenetické procesy řídí.

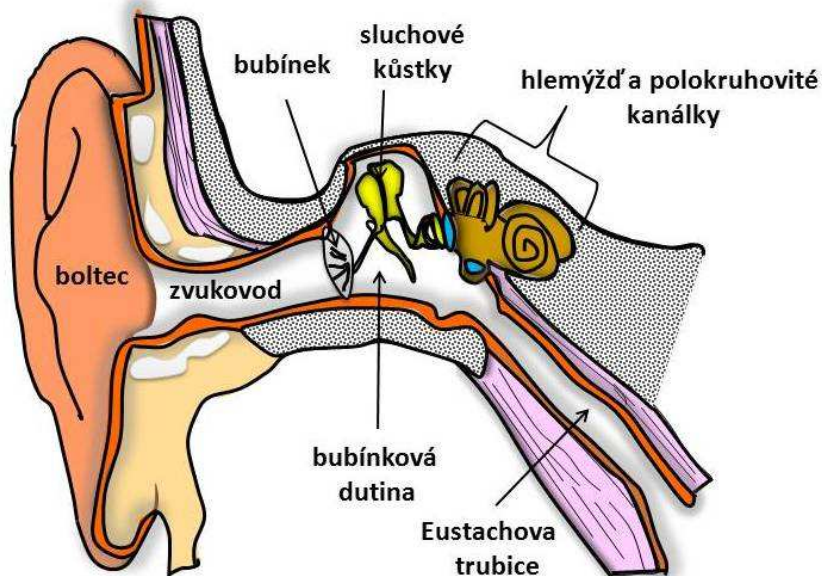
4. Morfologie sluchového ústrojí člověka

Orgán sluchu – ucho – *auris* (obr.č1) – nazývá se také jako sluchověrovnovázné či předsíňohlemýžd'ové ústrojí (*organum vestibulocochleare*).

Celkově se jedná se o velmi složitý orgán se dvěma recepčními systémy: sluchovým a rovnovážným.

Sluchový systém má tři části. První část je určena k zachycování zvukových vln, druhá pro úpravu a převod těchto vln a poslední, třetí část obsahuje vlastní percepční orgán.

Rovnovážný systém je kompletně uložen ve vnitřním uchu. Dochází zde k příjmu daných pohybových a gravitačních podnětů (Hajn, 2003).



Obrázek č. 1: Anatomie sluchového ústrojí. Zdroj: Vlastní kresba, převzato a upraveno z Anatomie 3 (Čihák, 2004).

Sluchový orgán se funkčně, anatomicky i vývojově dělí na tři části: *auris externa*, *auris media* a *auris interna*.

4.1 *Auris externa* (ucho zevní)

Zevní ucho, sloužící jako přijímač zvukových vln, je tvořeno ušním boltcem (*auricula*) a zevním zvukovodem (*meatus acusticus externus*), který je od středního ucha oddělen bubínkem (Číhák, 2004).

Boltec tvoří elastická chrupavka (*cartilago auriculae*). Na rozdíl od nižších savců je u vyšších primátů boltec nepohyblivý. Je to z toho důvodu, že k orientaci využívají vyšší primáti převážně ústrojí zrakové a ušní svaly, které jsou u nich přítomny, se tak staly rudimentálními (Hajn 2003).

4.2 *Auris media* (ucho střední)

Auris media je systém vzduchem vyplněných prostor ve spánkové kosti, které jsou vystlané sliznicí. Střední ucho začíná bubínkem (*membrana tympani*). Blanka bubínku na svých okrajích vytváří prstenec *annulus tympani* (bubínkový kruh). *Anulus tympani* (nebo také *annulus fibrocartilagineus*) slouží k upevnění bubínku k *pars tympanica ossis temporalis* (Číhák, 2004). Dále je střední ucho tvořeno bubínkovou dutinou (*cavum tympani*), sluchovou (Eustachovou) trubicí (*tuba auditiva*) a systémem dutin bradavkového výběžku (*antrum mastoideum*) (Černý, 1995). Součástí bubínkové dutiny jsou sluchové kůstky – kladívko, kovádlíka a třmínek (obr. č. 2). Eustachova trubice zajišťuje spojení mezi bubínkovou dutinou a nosohltanem, a umožňuje tak vyrovnávání tlaku mezi vnitřním a vnějším uchem (Číhák, 2004).

4.2.1 *Cavum tympani* (bubínková dutina)

Bubínková dutina, označovaná taky jako dutina středoušní, je uložena v *pars pyramidalis* - kosti spánkové (*os temporale*) (Číhák, 2001). Kraniálně se spojuje s dutinami v bradavkovém výběžku a prostřednictvím Eustachovy trubice s nosohltanem. (Hajn 2003). Je to největší prostor z celého středoušního komplexu. Na frontálním průřezu má tvar bikonkávní čočky o rozměrech cca 6mm při stropu, 2mm uprostřed a při spodní stěně zhruba 4mm.

Zúženou část tvoří dva útvary – na zevní stěně bubínek a na vnitřní stěně proti němu ležící *promontorium* (Číhák, 2004). *Promontorium* je lehké vyklenutí způsobené prvním (bazálním) závitem hlemýžďe v *auris interna* (Číhák, 2001).

Celý prostor středoušní dutiny má tři části:

- *Mesotympanum* – prostor za blankou bubínku
- *Epitympanum* – prostor nad úrovní horního okraje blanky bubínku, leží zde kladívko a tělo kovadlinky, směrem dozadu pokračuje jako *aditus ad antrum mastoideum*
- *Hypotympanum* – prostor pod úrovní blanky bubínku (Černý, 1995).

4.2.2 *Ossicula auditus* (sluchové kůstky)

Tři sluchové kůstky kladívko, kovadlinka a třmínek společně vytváří tzv. převodní systém, tj. pohyblivě spojený řetízek, který pomocí vazů a svalů (*m. tensor tympani* a *m. stapedius*) přenáší chvění bubínku vyvolané zvukovými vlnami na perilymfu vnitřního ucha (Čihák, 2004) (obr. č. 2).

***Malleus* (kladívko)**

Na kladívku rozeznáváme **hlavu** (*caput mallei*) – což je větší oblá část, která zasahuje až do *recessus epitympanicus*, leží tedy nad úrovní bubínku; **krček** (*collum mallei*) – krátký úsek kaudálně přecházející v rukojeť kladívka; **rukojeť** (*manubrium mallei*) – je delší štíhlá část, která se kaudálním směrem zužuje a srůstá se *stria mallearis*. Dále jsou patrné dva výběžky – **boční výběžek** (*processus lateralis mallei*) – kratší část, vybíhající ze spodního konce krčku, která vyzdvihuje *prominentia mallearis* a **přední výběžek** (*processus anterior*) – delší štíhlý výběžek, na který je napojen *ligamentum mallei anterius* (Čihák, 2004).

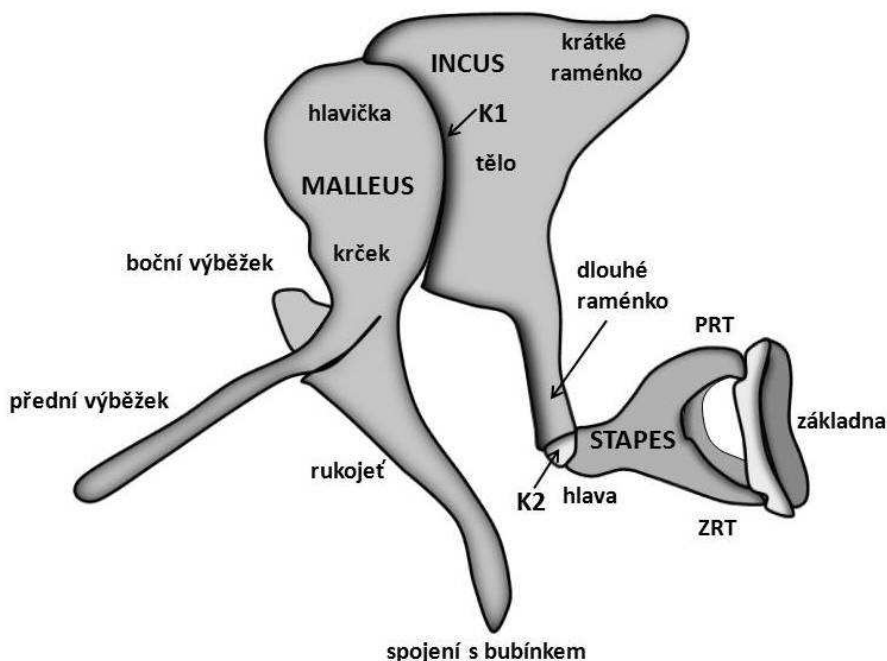
***Incus* (kovadlinka)**

Kovadlinka je tvořena **tělem** (*corpus incudis*), ze kterého dorsálně vystupuje krátký kuželovitý výběžek – tzv. **krátké rameno** (*crus breve*) a medio-kaudálně **dlouhé rameno** (*crus longum*) jdoucí rovnoběžně s *manubrium mallei*. V těle se nachází *facies articularis* – místo skloubení s kladívkem. Kloubní spojení s třmínkem zajišťuje dlouhé raménko, na jehož konci se nachází *processus lenticularis* s připojenou chrupavkou (Čihák, 2004).

***Stapes* (třmínek)**

Třmínek je poslední středoušní kůstka. Je tvořena kulovitou **hlavou** (*caput stapedis*); **předním raménkem** (*crus anterius*) a **zadním raménkem** (*crus posterius*) a podlouhlou

oválnou ploténkou tvořící **základnu** (*basis stapedis*). Základna těsně přiléhá k oválnému okénku (*fenestra vestibuli*) a tím tak přenáší vibrace do vnitřního ucha (Číhák, 2004).



Obrázek č. 2: Detail sluchových kůstek středního ucha. PRT – přední raménko třmínku; ZRT – zadní raménko třmínku. Mezi kladívkem a kovádkou se nachází kloubní spojení – tzv. incudomaleální kloub (K1), druhý kloub (K2) najdeme mezi kovádkou a třmínkem. Správné vytvoření těchto kloubů je velice důležité pro budoucí efektivní převod zvuku. Zdroj: Vlastní kresba – schématický náčrt, převzato z Anatomie 3 (Číhák, 2004).

4.3 *Auris interna* (ucho vnitřní)

Vnitřní ucho se nachází v pyramidě skalní kosti (*pars petrosa ossis temporalis*). Skládá se z kostěného labyrintu (*labyrinthus osseus*), v němž je v perilymfě uložen labyrint blanitý (*labyrinthus membranaceus*) obsahující ve svém vnitřním prostoru endolymfu. Labyrint se skládá z části rovnovážné a sluchové. Rovnovážná část (vestibulární) je tvořena předsíní a třemi polokruhovitými chodbami, ve kterých je uložen receptní orgán. Sluchovou část tvoří kostěný a blanitý hlemýžď, který obsahuje vlastní sluchový (Cortiho) orgán (Číhák, 2004).

5. Fyziologie sluchového ústrojí člověka

Sluch je jedním z pěti základních lidských smyslů. Zvuk, který vzniká kmitáním těles, je v podobě zvukových vln přijímán ušním boltcem a veden zevním zvukovodem až k bubínku, kde způsobuje jeho vibrace. Tyto vibrace se převádí sluchovými kůstkami přes přiléhající oválné okénko až na tekutiny v hlemýždi. Tím dojde k přenosu energie z prostředí plynného do prostředí tekutého - do perilymfy vnitřního ucha (Trojan, 1999). Rozpohybování tekutin způsobí lehké vyklenutí bazilární membrány, což vede k podráždění smyslových buněk Cortiho orgánu a ke vzniku vzruchu (Bičík, 2004).

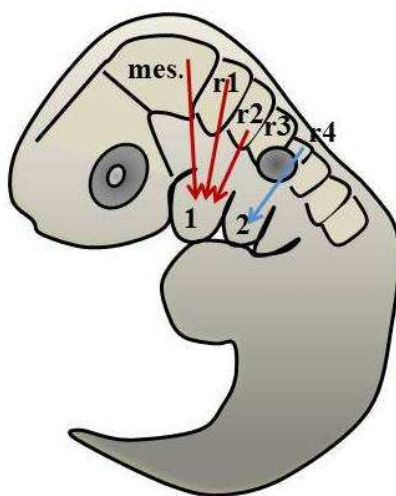
Zvuk může být při sluchovém vnímání veden dvěma způsoby. První cesta vede přes vnější zvukovod, bubínek a sluchové kůstky (v tom případě mluvíme o tzv. vzdušném vedení zvuku). Při druhém způsobu jsou tekutiny vnitřního ucha rozkmitány přímým přenosem vibrací lebečních kostí – v tomto případě tedy mluvíme o kostním vedení, které se uplatňuje při poruše vzdušného vedení a pacientovi se do záušní oblasti instaluje naslouchadlo. Zdravý člověk tohoto vedení využívá při vnímání vlastního hlasu či velmi intenzivních zvuků (Bičík, 2004).

Zvukové vlny jsou sluchovým ústrojím nejen zachycovány a převáděny, ale také transformovány, a to při přenosu přes sluchové kůstky. Kmity z ušního bubínku mají velkou amplitudu, ale malou intenzitu, se mění na kmity třmínku o velké intenzitě, ale malé amplitudě. (Trojan, 1999)

6. Embryonální vývoj sluchového ústrojí člověka

Vývoj středního ucha souvisí se vznikem žaberních oblouků, což jsou párovité útvary utvářející se mezi 4. až 5. týdnem vývoje. Společně s vývojem středního ucha dochází k formování a vývoji čelistí.

Začátkem 3. týdne dochází ke vzniku *chordy dorsalis*, neurální ploténky, neurální brázdy a ocasního hrbolu. Z okrajových buněk neurální ploténky vznikají buňky neurální lišty, které zpočátku vytvářejí pás neuro-ektodermálních buněk. V neurální trubici v oblasti rhombencefala (zadního mozku) jsou postupně zřetelně odděleny segmenty – rhombomery, neboli neuromery a část původních neuro-ektodermálních buněk. Tyto neuro-ektodermální buňky projdou epitelovo-mesenchymovou transformací (epitelové buňky se mění na mesenchymatické) a následně migrují do různých oblastí za účelem vzniku žaberních oblouků – tzv. faryngový aparát – viz obr. č. 3 (Sadler, 2010). Migrace buněk probíhá ve třech proudech – mandibulární, hyoidní a branchiální.



Obrázek č. 3: Embryo staré 21 dní – vznik prvního a druhého žaberního oblouku. Červené šipky znázorňují migraci buněk z mesencephala (mes.) a rhombomer (r1 a r2) do oblasti prvního žaberního oblouku (1) – tzv. mandibulární proud. Modrá šipka představuje buňky postupující ze 4. rhombomery (r4) do oblasti druhého faryngyálního oblouku (2) – tzv. hyoidní proud (Mallo, 1998). Branchiální proud vedoucí z oblasti r6/r7 není naznačen. Zdroj: Vlastní kresba – schématický nákres, upraveno podle Mallo, 1998.

Faryngový aparát se skládá z faryngových oblouků tvořených mesenchymem. Popisují se zde také rýhy (prohlubně ektodermu), proti kterým vybíhají výchlípky – entoderm faryngu. Všechny struktury, které v průběhu vývoje vznikají z žaberních oblouků, výchlipek a rýh jsou tedy závislé na interakci mezi mesenchymem a epitelem Bowden, 1977).

Celkem se u člověka vytváří 6 párů oblouků – pátý a šestý je ale rudimentální, nejvýznamnější je první a druhý žaberní oblouk.

1. faryngální oblouk tvoří dva výběžky (valy):

O *processus maxilaris* – z něj se tvoří praemaxila (*os incisivum*), maxilla, *os palatinum* a *os zygomaticum*

O *processus mandibularis* – mandibula, Meckelova chrupavka (MC), *malleus*, *incus*, *ligamentum sphenomandibulare*,

2. faryngální oblouk, který je nazýván také jako hyoidní, dává vzniknout třmínku, *lig. stylohyloideum*, *processus styloideus* a Riechertově chrupavce.

Z chrupavky třetího oblouku se vyvíjí velké rohy a dolní část těla jazylky (*cornua majora et corpus ossis hyoidis*). Dále pak *nervus glossopharyngeus*, *arteria carotis communis* a *arteria carotis interna*.

Chrupavky čtvrtého a šestého faryngálního oblouku spolu splývají a vytváří společný základ chrupavek laryngu. Dalším derivátem čtvrtého oblouku je např. *nervus vagus* (resp. jeho větev *nervus laryngeus superior*).

Každý oblouk je tvořen arterií z *truncus arteriosus*, chrupavkou, nervem a svalovou komponentou. (Sadler, 2010).

6.1 Vývoj čelistí

Vývoj čelistí je velmi úzce spjat s vývojem středního ucha, neboť vznik obou těchto struktur je spojen s derivátem prvního žaberního oblouku – s Meckelovou chrupavkou. Proto je nutné krátce vysvětlit také tuto problematiku.

Vývoj Meckelovy chrupavky je velmi složitý proces, jehož jednotlivé děje se značně liší v závislosti na úseku, prostředí a budoucí funkci. Meckelova chrupavka nacházející se v mandibulárním výběžku má přibližně tvar písmene „Y“ nebo „V“. Kolem její ventrální části (zhruba v jejích dvou třetinách) se desmogenní osifikací (tedy přímým vývojem z mezenchymu) vytváří kost podkovovitého tvaru, což je základ pro vlastní budoucí mandibulu. V těchto místech chrupavka postupně zaniká, rozpadá se v mezenchym a přetrvává pouze její dorzální část, ze které se pak vyvíjí enchondrální osifikací dvě sluchové kůstky – kladívko a kovádlíka (Doskočil, 1995). Na obrázku č. 4 je schématické

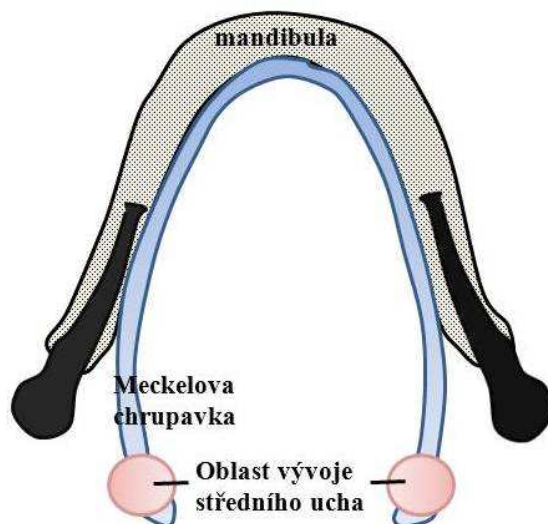
znázornění Meckelovy chrupavky a vymezená je také oblast vývoje sluchových kůstek a mandibuly.

Klíčovým krokem v utváření definitivního středního ucha je rozdělení MC chrupavky mezi formující se čelisti a kladívkem. Toto oddělení dá tedy vzniknout dvěma nepostradatelným funkčním aparátům – sluchovému a mandibulárnímu. Načasování tohoto procesu je různé u různých druhů, u lidí k tomu dochází v osmém měsíci prenatálního vývoje (Anthwal et al., 2012).

6.2 Vývoj sluchových kůstek

Původ sluchových kůstek je v poslední době stále více diskutabilní, existuje řada teorií vysvětlujících embryonální vývoj sluchového ústrojí. Zvláště nejasný je pak vývoj třetí sluchové kůstky – třmínku (Rodríguez-Vázquez 2005).

Podle Langmana vznikají *malleus* a *incus* z proximální části Meckelovy chrupavky prvního žaberního oblouku (kromě předního výběžku kladívka, který se desmogenní osifikací vyvíjí z *os goniale*). Tato teorie byla také potvrzena zjištěním, že kladívko a kovádlíka jsou homologní strukturou k *articulare* a *quadratum*, které se také vyvíjí v posteriorní části Meckelovy chrupavky (Anthwal, 2012).



Obrázek č. 4: Meckelova chrupavka. Černě jsou zakresleny chondrogenní větve dolní čelisti s kloubní hlavicí. Zdroj: Vlastní kresba – upraveno podle Doskočil, 1995.

Na vývoj třmínku však existuje řada odlišných teorií.

(1) Podle Langmana se třmínek vyvíjí z chrupavky druhého žaberního oblouku (Riechertova chrupavka).

(2) Další možností je dvojí vývoj třmínku – základna pochází z ušního váčku a ramena z Riechertovy chrupavky (Cauldwell et Anson 1942).

(3) Nedávné studie však naznačují, že třmínek pochází z horního konce druhého žaberního oblouku, avšak jeho vývoj na Riechertově chrupavce vůbec nezávisí (Hanson et. al 1962). Struktura, která dává vzniknout této sluchové kůstce, se označuje jako třmínkový základ – zárodek. Na tomto zárodku můžeme pozorovat dvě zřetelně oddělené oblasti – z horní části se vyvíjí základna a z dolní oblasti, kterou během vývoje prochází třmínková tepna, se vyvíjí přední a zadní raménko a také hlava třmínku. Mezi třmínkovým zárodkem a Riechertovou chrupavkou se vyskytuje interhyale, což je oblast, která dává vznik třmínkovému svalu, respektive šlaše třmínkového svalu (Rodríguez-Vázquez, 2005).

6.3 Vývoj středoušní dutiny

Středoušní (bubínková) dutina se vyvíjí z první žaberní výchlipky, ležící mezi prvním a druhým faryngálním obloukem. Předpokládá se, že mechanismus, jenž zahajuje expansi této žaberní výchlipky, spočívá v morfogenetických pohybech okolních struktur – zejména žaberních oblouků. Vytváří se tak tubotympanická výchlipka, která se dále rozšiřuje v Eustachovu trubici a primární středoušní dutinu.

Rozšiřující se primární bubínková dutina dosahuje do oblasti bubínku (kterému poskytuje pro jeho utváření endoderm), nicméně zatím nedosahuje ke sluchovým kůstkám – ty jsou tedy stále obklopeny mesenchymem, respektive dutinou, jenž je tímto mesenchymem vyplněna a z níž se vytvoří epitympanum.

Utváření definitivní středoušní dutiny začíná ihned po narození a zahrnuje tři nezbytné procesy: resorpci mesenchymu (z epitympanální oblasti), následné spojení s primární výchlipkou a vytvoření hustého epitelu, který vystýlá téměř celý středoušní prostor.

Proces, při kterém dochází odstranění mesenchymu neboli kavitaci, zatím není zcela objasněn (Mallo, 1998).

6.4 Vývoj ušního bubínku

Ušní bubínek má trojí původ: (a) vnější vrstva je vytvořena ektodermem první žaberní rýhy, (b) druhou vrstvou je mesenchym (původem z žaberního oblouku), ke kterému těsně přiléhá (c) třetí vrstva – endoderm pocházející z první žaberní výchlípky. Morfogeneze bubínku tedy začíná vytvářením primární bubínkové dutiny a vnějšího zvukovodu a končí otevřením zevního zvukovodu – tím se bubínek dostane do kontaktu se vzdušným prostředím (Mallo, 2001; Mallo, 1998).

7. Experimentální organismy a metody studia při vývoji sluchového ústrojí

Pro dokonalé poznání vývojových procesů během formování středního ucha se používá mnoho různých typů experimentů a experimentálních organismů. Výzkumy prováděné na lidských tkáňových kulturách by jistě byly pro zodpovězení otázek týkajících se různých oblastí vývoje nejvhodnější, stejně tak např. pro zjištění přesné reakce na nově vyvinuté léčivo. Avšak protože takovéto výzkumy jsou velmi náročné a hlavně neetické, používají se tzv. *experimentální* (neboli modelové) *organismy*.

Modelové organismy jsou tedy takové organismy, které neslouží pouze k poznání a popisu tohoto organismu samého, ale slouží k popsání obecnějších vlastností platících i pro jiné živočichy (URL 1). Experimentální organismus však neznamena podřadný nebo snad méněcenný druh, při samotné práci stejně tak jako u samotného chovu existují jasná pravidla daná zákonem, která se musí dodržovat.

Ať už se tedy jedná o zkoumání sluchového ústrojí nebo jakýchkoli jiných medicínských pokusů, mezi nejčastěji používané organismy beze sporu patří myš domácí (*Mus musculus*).

Laboratorní myš (tedy domestikovaná forma myši domácí) se stala ve 20. století téměř nejpoužívanějším modelovým organismem převážně z důvodu jejího obrovského reprodukčního potenciálu, nenáročného chovu, poměrně malé velikosti a snadné manipulace (Macholán, 1997). V současné době se asi nejvíce uplatňuje při studiu průběhu onkologických onemocnění, rolí imunitního systému a při vývoji a sledování účinku nových léčiv¹. Její velký význam spočívá také při sledování průběhu odontogenze (vývoj zubů) a s tím těsně souvisejícího vývoje středního ucha.

Kromě laboratorní myši se při studování středoušní dutiny také významně uplatňuje morče (*Cavia arperea*) a případně mládě kura (*Gallus*) - kuře.

Laboratorní morčata se používají v sérologii, mikrobiologii, imunologii, farmakologii a mnoha dalších biotechnologických oborech. Uplatňují se zejména jejich fyziologické vlastnosti – např. stejně jako člověk nejsou schopni syntetizovat vit. C (URL 2). Velmi často se ve výzkumech uplatňují také potkani (*Rattus norvegicus*), avšak manipulace s nimi není tak zdaleka tak snadná jako např. v případě morčat.

¹ Přednáška Prof. RNDr. Olgy Říhové DrSc. – Úloha imunitního systému při vývoji a terapii nádorů. Přednáška proběhla 29.11.2012 na UP v Olomouci

Význam **kuřete** jakožto modelového organismu má řadu opodstatnění. Velkou výhodou je opět snadná dostupnost a manipulace, avšak navíc, na rozdíl od savčích modelů, není díky oviparii nutné usmrcení matky. Asi největším pokrokem tedy byla možnost zachycení buněk v nedotčených živých embryích, což umožnilo detailní sledování celého vývoje a přesné stanovení doby vhodné pro odběr vzorku.

Obecně se kuřecí embrya využívají při studiu testování účinku toxických látek, jako jsou především teratogeny (tj. chemická látka či záření, které mohou způsobit narušení vývoje orgánů) a morfogeny (Matalová et al., 2010a). V současnosti velký význam spočívá v možnosti sledování genové exprese a možnosti provádění genové manipulace (ovlivnit vývoj lze např. díky elektroporaci plazmidů či za pomoci retrovirálních vektorů). Studuje se funkce jednotlivých genů a jejich produktů. Dále jsou kuřecí modely využívány při studiu oscilujících cyklů genové exprese, které se účastní zahájení tvorby somitů. Kuře je nejideálnějším modelem pro sledování migrace buněk neurální lišty, což je asi hlavní důvod, proč tvoří ptáci téměř 48 % ze všech používaných laboratorních zvířat. Na posledním místě se pak umisťují psi, kočky a primáti (Matalová et al., 2010b).

7.1 Morfologie sluchového ústrojí modelových organismů

Dokonalá znalost anatomie sluchového ústrojí používaných živočichů je velmi důležitá, protože některé živočišné druhy se ve stavbě středoušní dutiny značně liší a ne každý organismus je stejně vhodný pro danou oblast zkoumání.

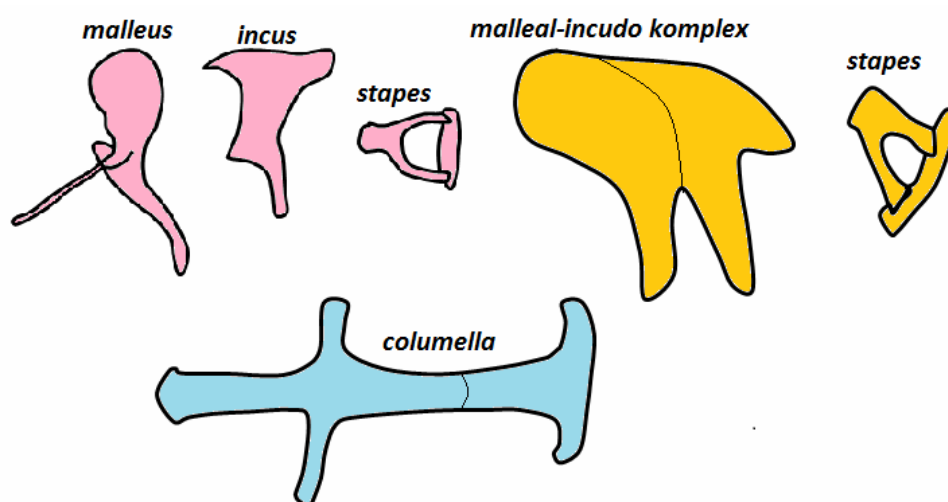
Stavba vnitřního i vnějšího ucha ptáků je téměř shodná s uchem savce. Ptákům však z aerodynamických důvodů chybí ušní boltce, průnik zvukových vln je umožněn malým sluchovým otvorem krytým peřím. Zásadní rozdíl však můžeme nalézt v *auris media*. Ptáci, stejně jako plazi, mají totiž pouze jedinou sluchovou kůstku – *collumela auris* (obr. č.5), která odpovídá savčímu třmínku. Collumela jedním koncem přiléhá k ušnímu bubínku a způsobuje jeho malé vyklenutí směrem ven a druhým k oválnému okénku (Chapman, 2011). Jedná se o první sluchovou kůstku, která byla vytvořena na bázi mandibuly. Přestože jim tedy dvě sluchové kůstky „chybí“, mají velmi rozvinutý sluch, který jim umožňuje také vnímání ultrazvuků (URL 3).

U savců se k této primární sluchové kůstce připojily ještě dvě další: *malleus* odvozený z *articulare* a *incus* odvozený z *quadrata* (*articulare* a *quadratum* jsou kosti tvořící původně primární čelistní kloub). U dospělých morčat se nachází třmínek a jedna srostlá sluchová kůstka – tzv. *malleal – incudo* komplex (kladívko-kovadlinkový komplex), jak

lze vidět na obrázku č. 5. Kladívko a kovadlinka sice mají rozdílné genetické základy, avšak v tomto komplexu nedochází ke všem procesům, které by vedly k úplné diferenciaci ve dvě sluchové kůstky. Dochází sice k iniciaci vzniku kloubu, avšak nedochází ke kavitaci, což nedovoluje úplné rozdělení a hranice mezi kladívkem a kovadlinkou je znázorněna pouze tenkým švem. Přestože se kladívko s kovadlinkou od sebe neoddělí, mají i tito živočichové sluch velmi citlivý.

U ostatních savců, kteří mají všechny 3 sluchové kůstky plně vyvinuté, by však nerozdělení kladívka a kovadlinky vedlo ke ztrátě sluchu (Amin et Tucker, 2006). Myš má sice morfologii středoušní dutiny shodnou se středouším člověka, ale rozdíl spočívá v osifikaci sluchových kůstek. U myši byla zjištěna až postnatální osifikace (Anthwal et al., 2012), kdežto v případě člověka se tak děje ještě během embryonálního vývoje (Sadler, 2010).

Anatomii lidské středoušní dutiny nejlépe odpovídá středoušní dutina potkana. Přesto se však pro studium středouší nepoužívá. Jejich hlavní nevýhodou je totiž umístění karotické tepny, která probíhá nejen mezi třmínkovými rameny, ale také podél báze hlemýždě. Z toho důvodu velmi často dochází jejímu poškození, krvácení a následné smrti zvířete. Dalšími negativními vlastnostmi jsou poměrně malá hlava zvířete a časté otitidy (záněty), které způsobují obtížnější otevření *os temporale* (přesněji *pars petrosa*), která je mnohem křehčí. (Albuquerque et al., 2009).



Obrázek č. 5: Schématický náčrt sluchových kůstek: Růžově – savec (myš, člověk aj.); žlutě – morče; modře – pták. Zdroj: Vlastní kresba, upraveno podle Amin et Tucker, 2006; Wood et al., 2010.

7.2 Metody studia

Výběr konkrétní metody, která je použita při výzkumu, závisí na účelu, za jakým je výzkum prováděn – zda je cílem zhotovit morfologický model v dané fázi vývoje nebo sledovat průběh morfogenetických procesů, či zda je cílem sledování genů, které jsou v dané oblasti aktivní a jejichž inaktivace způsobí různé poruchy. Mezi v současnosti nejpožívanější metody patří klasické histologické techniky spojené s imunohistochemickými či biochemickými metodami nebo *in situ* hybridizace. Aktuální experimentální přístupy dále zahrnují i kultivace zárodků středního ucha v kultivačních médiích.

Kultivace středoušních zárodků se provádí převážně v prenatálním období, kdy skalní kost není ještě zcela mineralizovaná - pozdější odvápnění skalní kosti je totiž velmi zdlouhavé. Ušní zárodek se kultivuje v médiích pro savčí explantáty, která umožňují zárodku růst. Po přidání specifických morfogenu se pak sledují různé morfologické změny. Explantátové kultury oblasti středního ucha rovněž umožňují zasáhnout do exprese genů v této oblasti pomocí transfekčních experimentů (etopická nebo nadměrná exprese určitého genu) či inhibice exprese genu v této oblasti pomocí siRNA.

Imunohistochemické metody se používají pro sledování morfogenetických procesů na seriových frontálních řezech dané oblasti. Např. buněčná proliferace se detekuje pomocí protilátek specifických vůči antigenům typickým pro jádra proliferujících buněk (Proliferating cell nuclear antigen, PCNA – antigenem je tzv. svírací protein upevněný k řetězci replikující se DNA) (Šmarda et al., 2005). Apoptóza se obvykle detekuje biochemicky - metodou TUNEL. Tato metoda je založena na vyhodnocení stupně fragmentace DNA – tj. na enzymatickém zabudování přidaného nukleotidu na 3-OH konce fragmentované DNA. Tímto způsobem lze detekovat převážně pozdní stadia apoptózy (Roberts et Miller, 1998)

Ke sledování genové exprese se běžně používá metoda ***in situ* hybridizace** nebo **metoda microarray**.

Metoda *in situ* hybridizace umožňuje přesnou lokalizaci hledaného genu přímo na místě ve zkoumaném biologickém materiálu (proto *in situ*) na úrovni mRNA. Používá se při ní radioizotopem značená sonda (popř. sonda vázaná na barvu), která je komplementární k dané sekvenci. Tato sonda se spojí s analyzovanou mRNA, která se následně detekuje. (Matalová et al., 2010b).

Microarray (neboli DNA čipy) také pracují na principu komplementarity nukleotidových bází. Na čipu jsou umístěny ve formě cDNA - oligonukleotidu sekvence (tzv. sondy)

komplementární k mRNA, která je předmětem zájmu. K těmto sondám se komplementárně váží fluorescenčně značené mRNA. Platí při tom přímá úměra – tedy čím více dané mRNA je v buňce, tím více se jí bude vázat na sondu a tím barva bude intenzivnější. Naopak místo, kde tedy komplementární sekvence přítomna není, nebude viditelné (Bárta et al. 2010).

8. Morfogenetické a molekulární mechanismy

Během celého vývoje jedince se uplatňuje několik procesů probíhajících na úrovni buněk. Buňky se dělí (proliferace), specializují (diferenciace), pohybují (migrace) a vymírají (apoptóza). Neméně důležitá je však také komunikace mezi nimi a spojování do vyšších funkčních celků (asociace). Všechny tyto děje označujeme jako **morfogenetické mechanismy**.

8.1 Vybrané morfogenetické procesy účastníci se vývoje středního ucha

Ačkoli v literatuře zatím chybí zhodnocení hlavních morfogenetických mechanismů, které určují základní morfologii středoušní dutiny včetně formování kůstek středního ucha, jsou zde tyto základní procesy aspoň obecně popsány, případně je uveden příklad, ve které části středního ucha dochází k jejich uplatnění.

Proliferace

Proliferace neboli bujení či dělení buněk je jeden ze základních rysů individuálního vývoje, především pak vývoje embryonálního, kdy se zakládají tělní orgány. V dospělosti se udržuje pouze v obnovujících se tkáních (např. epidermis) a významnou roli hraje také při krvetvorbě. Dělicí se buňky se vyznačují vysokou mitotickou aktivitou, která je soustředěna v tzv. proliferačních centrech (URL 4).

Při studiu separace kladívka a kovádlíky byla zaznamenána vysoká proliferace v oblasti kovádlíky a hlavy kladívka, avšak v jejich společné kloubní části se téměř žádná proliferační centra nevyskytují (Amin, Matalová et al. 2007).

Apoptóza

Apoptóza - programovaná buněčná smrt (programmed cell death) - je jeden z důležitých mechanismů kavitace středoušní dutiny (Roberts et Miller, 1998). Nejčastěji se tyto výzkumy provádí na myších embryích (v ptačích modelech nebyla apoptóza zjištěna). U myši začíná kavitace přibližně v průběhu narození a pokračuje až zhruba do 16 dne po narození (u lidí probíhá kavitace mezi 3 – 8 měsícem fetálního vývoje), avšak samotná apoptóza buněk byla zjištěna pouze v prvním postnatálním dni vývoje. Je tedy jasné, že na vytvoření bubínkové dutiny se musí podílet také jiné mechanismy, které jsou v současné době předmětem zkoumání (Roberts et Miller, 1998).

Migrace

Buněčná migrace je jeden z hlavních dějů nutných pro udržení mnohobuněčného organismu a pro jeho správný vývoj. Pohyb buněk můžeme rozdělit na aktivní a pasivní. V případě pasivního pohybu jsou buňky pasivně vytlačovány do svého okolí nově vznikajícími buňkami (děje se tak např. v místě časté proliferace). Do aktivního pohybu je však zapojen vlastní lokomoční aparát. Během vlastní migrace buňky mezi sebou komunikují a reagují na signály, což má za následek jejich budoucí diferenciaci (URL 4). Typicky migrujícími buňkami v průběhu embryogeneze jsou buňky neurální lišty (NCC – neural crest cells), (Mallo 1998), jež se podílí jak na tvorbě čelistí, tak kůstek středního ucha.

V případě vývoje sluchových kůstek se uvažovalo též o migraci buněk z kladívko-kovadlinkového kloubu do přiléhajícího kladívka. Tato teorie však nebyla potvrzena. Zaznamenána byla pouze remodelace kloubu, která však nemusí nutně představovat aktivní migraci (Amin, Matalová et al., 2007).

Diferenciace

Diferenciací nazýváme množství změn, kterými projdou jednotlivé totipotentní nespecializované buňky, aby se odlišily od buněk okolních a mohly se z nich stát buňky specializované, diferenciované. Rozlišujeme dva způsoby diferenciace: (a) mozaikovitý – při kterém diferenciace buňky není závislá na buňkách okolních a (b) regulační – kdy buňka stále interaguje (komunikuje) s okolím. Diferenciace v úzkém slova smyslu těsně souvisí s ostatními morfogenetickými procesy – zejména s proliferací, neboť potomstvo vzniklé proliferací mateřské buňky se přemění ve větší počet odlišných buněk syntetizujících různé proteiny (URL 4). Diferenciace je nejčastěji kontrolována a určována pomocí různých transkripčních faktorů (URL 5).

V rámci vývoje čelistí a středoušní dutiny, můžeme zachytit diferenciaci hned na začátku, kdy rozlišujeme enchondrogální a desmogenní způsob osifikace. Při desmogenní (neboli intramembranózní) osifikaci vzniká podklad čelistí a přední výběžek kladívka. Mezenchymové buňky se diferencují na osteoblasty – tj. na buňky, které jsou schopny produkce kostní hmoty. Osteoblasty se dále diferencují na osteocyty, které jsou metabolicky méně aktivní, vytváří ostrůvky kostní tkáně, které se postupně zvětšují a tvoří základ osifikující kosti.

Při enchondrální osifikaci (kladívko a kovadlinka) vzniká uvnitř chrupavčitého základu osifikující jádro, ze kterého postupuje osifikace směrem k periferii, až se vytvoří fibrilární

kost pokrytá ještě tenkým lemem chrupavčitých buněk, který vymizí, až když dojde k diferenciaci okolního vaziva v okostici. Začátek celého tohoto složitého morfogenetického procesu iniciuje hlavní morfogenetický protein – BMP4 - bone morphogenetic protein 4 (Dylevský, 2007).

Odlišnou diferenciaci buněk můžeme sledovat také ve vyvíjejících se kloubech a mezi kůstkami. Kdyby zde k ní totiž nedocházelo, netvořily by sluchové kůstky kloubně spojený „řetízek“, ale tvořily by jeden celek, jak je tomu v případě kolumely. Znamená to tedy, že v tomto kloubním základu musí být exprimovány jiné geny (např. Gdf 5), než je tomu v jejím okolí, kde v chrupavčitých základech sluchových kůstek dochází k expresi Sox9. (Amin, Matalová et al. 2007).

Aby všechny tyto morfogenetické procesy správně probíhaly a nevyskytovaly se jen tak náhodně, musí být něčím potlačovány nebo naopak podporovány, a to buď jiným morfogenetickým mechanismem v okolních strukturách anebo jsou řízeny **molekulárním způsobem**.

8.2 Molekulární mechanismy

Molekulární mechanismy probíhají za účasti různých genů, které mají za úkol správnou expresi proteinů, signálních molekul. Tyto signální molekuly jsou exprimovány buňkami neurální lišty, mesenchymu i přilehlého epitelu za účelem vytvoření žaberních oblouků a funkčního sluchového ústrojí. Již samotné vytváření žaberních oblouků spolu se správně zaměřenými migračními toky je tedy rozhodující pro správné umístění sluchových kůstek (Mallo, 2001).

Mezi geny a signální molekuly, které hrají určitou roli v utváření faryngyálního aparátu a zároveň jsou zodpovědné za vývoj středního ucha, patří: **ET-1, Fgf8/9, RA, Bapx1, Gsc, Hoxa1/2, Dlx1/2, Msx1, Prx1, Eya1, Sox9, Six1, Gdf5/6, Tcof1, BMP4, AP-2** (Minoux at Rijli, 2010; Mallo, 2001; Mallo 1998)

Signální molekula RA

Kyselina retinová – **Retinoic acid** je označována za klíčovou signální molekulu při vývoji savčího zárodku (Kubicová, 2010), neboť ovlivňuje proliferaci, apoptózu, diferenciaci i migraci buněk. V buňce se váže na vazebné proteiny a následně na jaderné receptory - retinoic acid receptors (RARs), které po navázání na dané sekvence regulují transkripci DNA (Vokurka, 2008).

RA ovlivňuje (ať už přímo či nepřímo) přes 500 různých genů (Kubicová, 2010). Ukázalo se, že RA hraje také velmi důležitou roli morfogenezi a určení pozice středního ucha (Chapman, 2011; Mallo, 1998), neboť mutace RAR mají za následek úplnou absenci třmínku, ale pouze nepatrné nebo žádné poškození kovádlinky, kladívka a *anulus tympani* (Mallo, 2001). Předpokládá se proto, že RA neovlivňuje migraci všech NCC (Mallo, 1998).

Signální molekuly Fgf8/9 a ET-1

Při nefunkční aktivaci signálních molekul ET-1 (endotelin-1) a FGF8/9 (Fibroblast growth factor 8/9) v ektodermu prvního žaberního oblouku můžeme sledovat v oblasti středního ucha asi největší poškození - téměř nevyvinuté kladívko a kovádlinku, či jejich úplnou absenci. (Třmínek vykazuje poškození, nebo zcela chybí pouze při nefunkčním signálu ze strany ET-1). Tyto dvě molekuly totiž vymezují oblast exprese Bapx1 a Gsc – což jsou jedny z nejdůležitějších genů středního ucha ((Minoux et Rijli, 2010).

Geny, které se podílejí na utváření funkčního středoušního aparátu, se dají více - méně (každý gen má širší oblast působení, úplně přesně hlavní funkci tedy určit nejde) rozdělit do tří kategorií:

- (1) Geny podílející na vývoji specifických oblastí střední ucha
- (2) Geny zapojené do utváření kostí
- (3) Geny podílející se na vývoji žaberních oblouků (Mallo, 1998)

(1) Geny podílející se na vývoji specifických oblastí středního ucha

Při studiích prováděných na myším modelu bylo zjištěno, že klíčovou roli v regulaci vývoje středního ucha mají geny **Bapx1** (bagpipe homeobox) a **Gsc** (goosecoid). Bapx1 ve spolupráci s Gsc definují především ty části středního ucha potřebné pro vývoj bubínkového kruhu, *os goniale* a kladívka (Tucker et al., 2004; URL 5).

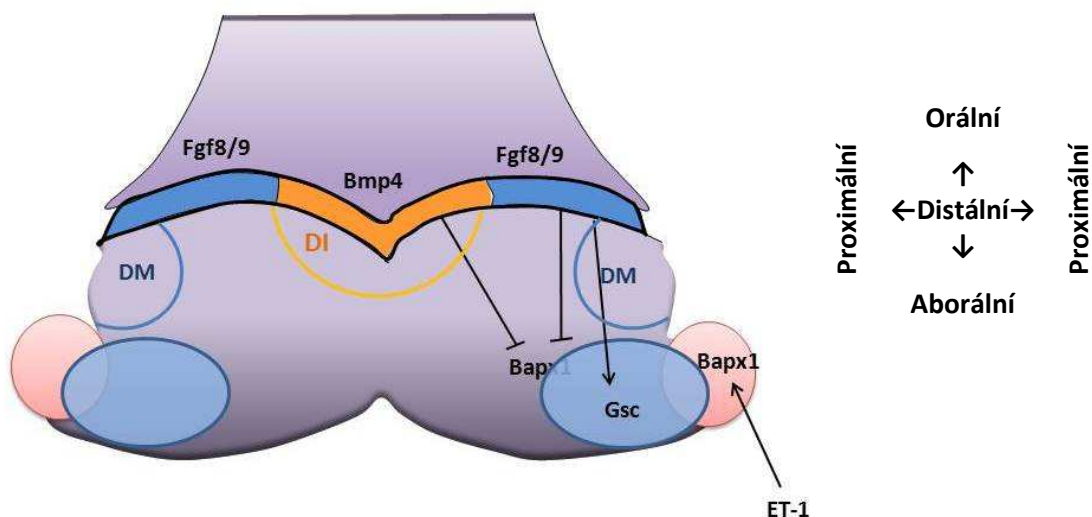
Podle nejnovějších prací jsou oba tyto geny součástí složitějšího homeoboxu, který se nazývá odontogenický homeobox kód (odontogenic homeobox code). Tento kód řídí vývoj tří anatomických oblastí, a to zubního základu, kostí spodní čelisti a kůstek středního ucha (Tucker et Sharpe, 2004).

Vymezení Bapx1 a Gsc

Bapx1 (u lidí znám také pod zkratkou NKX3-2 – „NK3 homebox 2“) je během embryogeneze exprimován v proximální oblasti mandibulárního výběžku prvního žaberního oblouku. Pozitivně je tento gen regulován právě signálním proteinem endotelinem - 1, který je exprimován v okolních buňkách mesenchymu a epitelu první a druhé žaberní štěrby (Wilson et Tucker, 2003; Mallo, 1998). Naopak negativní regulaci Bapx1 můžeme sledovat ze strany signálních molekul FGF8/9 a BMP4. Signální molekuly FGF8 a FGF9 jsou exprimovány v proximální oblasti - vymezují tedy oblast molárů a zároveň pozitivně regulují Gsc. BMP4 je exprimován distálně (mediálně), čímž vymezuje oblast řezáků (Tucker et Sharpe, 2004). Oblasti genové exprese jsou znázorněny na obr. č. 9.

Bapx1 je však později exprimován také v základech *os goniale* a *anulus tympani*. a dále přímo v kladívku, kovádlince a incudomaleálním kloubu. Tento gen reguluje šířku kladívka (při mutaci ji snižuje), délka však zůstává stejná (Tucker et al., 2003).

Gsc – goosecoid - je exprimován spolu s Bapx1 vzájemně se překrývajícím způsobem, přičemž Bapx1 je více proximální než Gsc (jak lze vidět na obrázku č. 9). Inaktivace jak Bapx1, tak Gsc má za následek defekt bubínkového kruhu (Tucker et al., 2003). Avšak na rozdíl Bapx1, Gsc má v tvorbě tympanického kruhu jak indukční úlohu, tak diferenciací. Experimenty s chimérami s $Gsc^{-/-}$ versus wild type (divoký typ) naznačují, že vývoj bubínkového kruhu obsahuje přinejmenším dva odlišné kroky závislé na Gsc. V prvním kroku Gsc moduluje expresi faktorů, které jsou potřebné pro získání mesenchymálních buněk pro skeletogenní kondenzaci ($Gsc^{-/-}$ buňky postrádající vlastní funkční gen pro Gsc mohou být přitahovány buňkami divokého typu). Ve druhém kroku Gsc zprostředkovává diferenciaci těchto buněk (Mallo, 2001).



Obrázek č. 9: Schéma genové exprese (frontální pohled na mandibulární oblouk). FGF8/9 – fibroblast growth factor 8/9; BMP4 – bone morphogenetic protein 4; Gsc – goosecoid, BAPX1 – bagpipe homeobox; DM – *dentes molares* – předpokládaná oblast vývoje stoliček; DI – *dentes incisivi* – předpokládaná oblast vývoje řezáků. Růžově je zaznačena oblast vývoje středního ucha. Zdroj: Vlastní kresba – upraveno, podle Tucker et Sharpe, 2004.

Kromě Bapx1 a Gsc se na vývoji specifických prvků podílí mnoho dalších genů, např. – Brn4, Hoxa1/2, Dlx1/2, Msx1, Prx1 (patřící do homeoboxového kódu) jejichž specifický účinek způsobující vývojovou anomálii v dílčí části středního ucha v případě jejich nefunkční aktivace. Přehledně jsou tyto geny zapsány v tabulce č. 1.

Brn4 – brain specific homeobox 4 nebo také Pou3f4 – „pou class 3 homeobox 4“. Tento gen produkuje proteiny, které ovlivňují činnost řady dalších genů – řadíme ho tedy mezi TF (URL 5). Brn4 je exprimován v kondenzujícím se mesenchymu během vývoje vnitřního ucha, mutageneze v tomto genu ovlivňuje především utváření spánkové kosti a sluchového a vestibulárního orgánu vnitřního ucha. Avšak již byly také zaznamenány malformace ve velikosti a tvaru základny třmínku. Základna normálně se vyvíjejícího třmínku má z laterálního pohledu tvar konvexní, při pohledu ze spodu oválný. Mutace však způsobí zploštění povrchu základny a také výrazné zúžení na jedné straně, takže při pohledu zespodu je tvar vejčitý, nikoli oválný. Tento chybný vývoj způsobí nedostatečnou fixaci k přiléhajícímu oválnému okénku a opět téměř neefektivní převod zvuku, a to i přes to, že zbylé dvě kůstky se vyvíjí normálně (Phippard, 1999).

Distal-less homeobox code 1/2 (Dlx1/2) Nulová mutace v genech Dlx1 a Dlx2 nemá žádný vliv na *anulus tympani* a bubínek. Má však vliv na abnormální vývoj kovadlinky a třmínku (Qui et al., 1995), přičemž vliv této mutace na obě kůstky je zcela rozdílný. Nesprávná aktivace Dlx2 způsobuje abnormální vývoj kovadlinky (je připojená k lebce) a třmínku, jehož velikost je mnohem menší a přední a zadní raménko nevytváří oblouk, nýbrž spolu splývají (Mallo 2001). Účinek Dlx1 při vývoji střední ucha je soustředěn hlavně v oblasti druhého žaberního oblouku. Inaktivace tohoto genu způsobuje nepřítomnost třmínkové tepny a tudíž srůst *crus posterius* a *crus anterius stapendis* (Mallo 2001). (Tato tepna prochází během vývoje spodní částí třmínkového zárodku, čímž později dojde k vytvoření dvou oddělených ramének (Rodríguez – Vázquez 2005)). Savci mají 6 Dlx genů, přičemž Dlx1/2 jsou v mesenchymu žaberních oblouků exprimovány nejproximálněji (vzhledem k Dlx3/4/5/6) (Minoux et Rijli, 2010), tedy v místě vývoje sluchových kůstek. Oba kódy Dlx1/2 jsou součástí genové rodiny Dlx kódů (URL 5).

Prx1 – Prx1 (dříve označován taky jako Mhox) je exprimován v mesenchymu, avšak pro svou expresi potřebuje signál pocházející z epitelu. Předpokládá se tedy, že ovlivňuje epitel-mesenchymální interakci a také preskeletární kondenzaci z nediferencovaného mesenchymu (Martin, 1995). Při nulové mutaci v Prx1 jsou kovadlinka a třmínek připojeny k abnormální chrupavčité struktuře vyvíjející se v prvním a druhém žaberním oblouku. Třmínková ramena opět nevytváří oblouk a bubínkový kruh chybí (Mallo, 1998).

Hoxa2 (Homeobox A – 2) je nezbytný pro správný vývoj struktur na druhém žaberním oblouku. Inaktivace tohoto genu má tedy za následek abnormální vývoj těchto struktur skeletu, které se z druhého žaberního oblouku odvozují. Tak například u embryí se zmutovaným Hoxa2 se namísto struktur typicky odvozovaných z druhého žaberního oblouku, včetně třmínku, vyvíjí i z tohoto oblouku ještě jedna (tzn. zdvojená) sada prvků odvozovaných normálně jen z proximální části prvního oblouku. Některé studie ukazují, že Hoxa2 gen vymezuje oblasti skeletogeneze v mesenchymu druhého žaberního oblouku mechanismem inhibice. (Kanzler, 1998). Z toho by vyplývalo, že Hoxa2 působí jako modulátor odpovědi mesenchymálních buněk na pozitivní skeletogenní signály ve druhém žaberním oblouku. Co je podstatou těchto signálů, to zatím není známo, avšak pravděpodobně jsou vylučovány epitelem mezi prvním a druhým žaberním obloukem. Tuto domněnku potvrzuje fakt, že struktury, které se vyvinou z druhého žaberního oblouku

u embryí *Hoxa2*^{-/-}, jsou doslova zrcadlovým obrazem jejich předlohy v prvním žaberním oblouku.

Mutace v genu **Hoxa1** také vytváří rozdílné fenotypy středního ucha. Avšak úloha *Hoxa1* v této oblasti je ještě nejasná, poněvadž u různých mutací byly získány rozdílné fenotypy, např. malformace třmínku nebo chybějící kladívko a kovadlinka (Mallo, 1998).

Gdf5/6 - Growth differentiation factor 5 a 6 jsou geny kódující Gdf5 a Gdf6 proteiny, které patří do rodiny proteinů BMP. Členové této rodiny regulují diferenciaci a buněčný růst jak v embryonální tak v dospělé tkáni (URL 5).

Inaktivace genu *Gdf6* způsobuje chybné utváření vazů, chrupavek a kloubů, ale na odlišných místech, než můžeme pozorovat při mutaci v *Gdf5*. Vzniklá poškození se netýkají jen končetinových kloubů (jako je kolenní či zápěstní) a lebečních švů, ale také středního ucha. *Gdf5/6* jsou tedy významnými kandidáty, kteří mohou zapříčinit převodní hluchotu. Mutace v tomto genu způsobí nedostatečný vývoj kloubního spojení mezi kladívkem a kovadlinkou a mezi kovadlinkou a třmínkem. Základna třmínku také není zcela vyvinutá a vazy, které jej k oválnému okénku upevňují, jsou mnohem tenčí, takže ani zde – mezi třmínkem a oválným okénkem - nedochází ke správnému doléhání. Navíc kolem povrchu kloubních oblastí s normální expresí *Gdf6* buňky proliferují mnohem více, ve srovnání s mutantními *Gdf6* (Settle, 2003).

Drobné malformace středního ucha byly popsány i v případě mutantů postrádajících gen ***Msx1* (*Msx homeobox 1*)**. U těchto mutantů je kladívko o něco kratší a postrádá krátké raménko. Ostatní struktury středního ucha nevykazují žádné anomálie (Mallo, 1998).

		Dílčí část středního ucha				
		AT	MT	M	I	S
Gen	Gsc, Bapx1	chybí	chybí	redukce manubria	normální nebo chybí	normální
	Brn4	normální/NS	normální/NS	normální	normální	malformace základny
	Dlx-1	normální	NS	normální	normální	srůst raméněk
	Dlx-2	normální	NS	normální	malformovaný a připojený k lebce	srůst raméněk
	Mhox	chybí	NS	redukce manubria	malformovaný a připojený k lebce	srůst raméněk
	Hoxa-1	normální/NS	normální/NS	normální nebo chybí	normální nebo chybí	malformovaný nebo chybí
	Hoxa-2	zdvojený	zdvojený	zdvojený	zdvojený	chybí
	Gdf5/6	normální	normální	chybí kloubní spojení	chybí kloubní spojení	malformace základny
	Msx-1	normální	normální	chybí processus brevis	normální	normální

Tabulka č. 1: Vývojové anomálie dílčích částí středního ucha vyplývající z mutace v daném genu. AT (*anulus tympani*); MT (*membrana tympani*); M (*malleus*); I (*incus*); S (*stapes*); NS (nebylo stanoveno). Zdroj: upraveno podle Mallo 1998.

(2) Geny zapojené do utváření kostí

Sox9 - oficiálním názvem je SRY „sex determination region Y – box 9“, patří do rodiny genů zvané Sox a je velmi důležitý pro rozvoj reprodukčního systému a kostry. SOX9 protein reguluje aktivitu jiných genů, řadíme ho tedy mezi TF (URL 5).

SOX9 přímo řídí expresi kolagenu II typu, což je hlavní komponenta buněčné hmoty elastických a hyalinních chrupavek, bez kterých by nebyl možný vznik kosti endochondrální osifikací (Mallo, 1998). Jelikož tímto způsobem sluchové kostní elementy vznikají, uvažujeme i o tomto genu jako o regulačním mechanismu vývoje ucha.

(3) Geny podílející se na vývoji žaberních oblouků

TFAP2 - Plným názvem je „Transcription factor AP-2“ (někdy se uvádí TFAP α nebo AP-2 α) produkuje transkripční proteiny – AP-2 (AP-2 α), které jsou schopny se vázat na specifické oblasti DNA, čímž regulují geny, které ovlivňují buněčné dělení a apoptózu buněk v kraniální oblasti neurální lišty. Proto je gen TFAP2 velmi důležitý pro vznik prvního a druhého žaberního oblouku a tedy i struktur z nich odvozených. Genová mutace TFAP2 naruší normální vývoj daných oblastí v prvním a druhém oblouku, čímž dojde k projevu branchio-oculo-faciálního syndromu (Mallo 1998)

Tcof1 - „Treacher Collins Franceschetti syndrome 1“ je gen, který exprimuje treacle protein. Tento protein se vyskytuje v embryonálním vývoji v zárodcích kostí a tkání, které postupně formují kraniofaciální oblast (URL 5).

Vzhledem k rozsáhlým účinkům mutace v tomto genu se předpokládá, že Tcof1 je jedním z hlavních aktérů podílejících se na migraci buněk z neurální lišty (Mallo, 1998). Onemocnění způsobené mutací Tcof1 se nazývá Treacher Collins syndrome. Jedná se o autozomálně dominantní chorobu jejímž hlavním rysem je právě konduktivní ztráta sluchu (Mallo, 2010).

Eya1 - „Eyes absent homolog 1“ – tento gen produkuje stejnojmenný protein, který náleží do rodiny transkripčních proteinů zvané protein tyrosin phosphatases (PTP). EYA1 spolupracuje s mnoha dalšími proteiny, např. se SIX1. V embryonálním vývoji jsou tyto proteinové interakce velmi důležité pro správné vytvoření mnoha tkání včetně druhého žaberního oblouku, očí a uší (URL 5).

Gen Eye1 je pro vývoj středního ucha esenciální. Mutace v tomto genu způsobují Branchio-oto-renal syndrom mezi jehož symptomy patří také těžké malformace středního ucha. Malformace jsou nalézány již u Eya1 heterozygotů a jsou silně umocňovány u homozygotů. Jelikož Eya1 je exprimován v primordiích vyvíjejících se endochondriálních struktur, může mít tento gen přímou roli v tvorbě kůstek středního ucha. Eya1 může být také účasten separace primordií kladívka a kovádky (v mutantních myších byly pozorovány různé typy srůstů mezi těmito kůstkami) Jaká jsou, však přesná poškození v oblasti středoušní dutiny zatím není zcela objasněno (Mollo, 2001).

Six1 – „Six homeobox 1“. Six1 patří do skupiny genů zvané jako Six genová rodina. Členové této rodiny produkují proteiny (např. SIX1), kterými regulují aktivitu jiných genů (jedná se tedy o TF) (URL 5).

SIX1 protein ve spolupráci s několika dalšími proteiny (např. EYA1) reguluje normální embryonální vývoj.

Six1 je v průběhu vývoje exprimován v různých orgánech, avšak až Zheng W. et al prokázali, že se uplatňuje také při vývoji sluchového ústrojí (studováno na myši).

Inaktivace Six1 vede k malformaci jakékoli části sluchového ústrojí zahrnující vnitřní, vnější i střední ucho. Všechny myši s heterozygotní formou v tomto genu, které trpí určitým stupněm ztrátu sluchu, vykazují v oblasti středního ucha různé abnormality – např. třmínek má malý lumen, středoušní prostor je mnohem menší a je vyplněn volnou pojivovou tkání, v důsledku čehož dochází k častým zánětům nebo až k úplnému selhání sluchových kůstek v procesu převodu zvuku. U recesivních homozygotů dochází k srůstu kladívka a kovádlíky. Přední výběžek kladívka chybí, stejně tak není přítomen třmínek. Velký význam má však také v utváření vnitřního ucha, kde je exprimován např. v senzorickém epitelu (Zheng, 2003).

Veškeré popsané geny jsou přehledně shrnuty v tabulce č. 2. Zohledněna je při tom jejich hlavní funkce – osifikace kůstek, vývoj žaberních oblouků a utváření kostních elementů.

		Hlavní funkce			
		kostnatění kústek	vývoje žaberních oblouků	vývoj kostních elementů	kloubní spojení
Gen	Bapx1			x	
	Gsc			x	
	Sox9	x			
	TFAP2A		x		
	Tcof1		x		
	Brn4			x	
	Gdf5/6			x	x
	Six1		x		
	Eya1		x		
	Hoxa-1/2			x	
	Dlx-1/2			x	
	Prx1			x	
	Msx-1			x	

Tabulka č. 2: Geny potřebné pro vývoj středního ucha a jejich hlavní funkce. Zdroj: vlastní souhrn.

9. Aplikace poznatků

Při zkoumání patologie sluchového ústrojí se vědci zaměřují převážně na percepční (senzoneuriální) poruchy, proto se v případě porozumění převodních vad vyskytují stále značné mezery ve znalosti základních molekulárních mechanismů způsobujících existenci tohoto onemocnění (Richter, 2010). Normální rozvíjení sluchových kůstek a utváření epitelu a volného středoušního prostoru jsou nezbytné pro správný převod zvuku, jakékoli chyby mohou způsobit úplnou, nebo částečnou převodní hluchotu. Počet postižených osob se navíc zvyšuje s věkem z důvodu otoskleróz (fixace třmínku), častých zánětů, perforací bubínku nebo snížené funkce Eustachovy trubice (dochází tak podtlaku ve středoušní dutině).

Přitom v mnoha případech může být převodní hluchota zmírněna či vyléčena farmaceutickým nebo chirurgickým zákrokem. Za účelem snížení počtu neslyšících a zlepšení terapeutických metod má tedy rozhodující význam plné pochopení základních vývojových procesů (Chapman, 2011). Proto stále probíhají četné studie zaměřené na kraniofaciální oblast během embryogeneze a vědci se snaží rozluštit složité mechanismy morfologického a časoprostorového vývoje včetně všech mechanismů molekulárních.

10. Závěr

Střední ucho, jež je součástí sluchového ústrojí, má za úkol správné vedení zvukových vln mezi bubínkem a oválným okénkem, a to prostřednictvím tří sluchových kůstek – kladívka (*malleus*), kovádlíčky (*incus*) a třmínku (*stapes*) uložených ve středoušní dutině.

Embryonální původ této oblasti je velmi rozmanitý – *malleus* a *incus* se vyvíjí enchondrální osifikací z proximální části Meckelovy chrupavky prvního žaberního oblouku (přední výběžek kladívka však vzniká desmogenní osifikací z os *goniale*), *stapes* se vyvíjí s druhého žaberního oblouku, bubínková dutina má svůj původ v první žaberní výchlipce a bubínek (*membrana tympani*) má dokonce původ trojí – ektoderm první žaberní rýhy, entoderm první žaberní výchlipky a mezi nimi ještě ležící vrstvičku mesenchymu.

Toto množství různorodých oblastí, ze kterých se vyvíjí dané komponenty středního ucha, naznačuje, že se musí jednat o vývoj velmi složitý, doprovázený interakcemi mezi epitelem a mesenchymem, zahrnující různé morfogenetické mechanismy a složitou síť molekulárních signálů. Mnoho genů, které hrají nezbytnou roli během vývoje středního ucha, již bylo popsáno - např. *Bapx1*, *Gsc*, *Dlx1/2*, *Hoxa1/2*, *Msx1*, *Prx1*, *Gdf5/6*, *Tcof1*, *BMP4*, *Eya1*, *Sox9*, *Six1*, *AP-2*, avšak pro mnoho dalších ještě nemůžeme přesně říct, jakým způsobem se do vývoje zapojují. Proto stále probíhá mnoho studií využívajících modelových organismů – myši, morčata a kuřata – které by pomohly odpovědět na dosud nezodpovězené otázky, jako: „Jaké jsou mechanismy, které vedou k rozdělení Meckelovy chrupavky a tím pádem oddělení vyvíjejícího se ucha od čelisti? Jakým způsobem dochází ke kavitaci středoušní dutiny? Co kontroluje správné načasování diferenciací a zastavení růstu sluchových kůstek?“ a mnoho dalších.

Snad se díky novým, modernějším metodám brzy povede najít na všechny tyto otázky odpověď, neboť dokonalá znalost celého vývojového procesu středního ucha by také přinesla nové, dokonalejší metody léčby v případech různých onemocnění.

11. Seznam použité literatury

1. ALBUQUERQUE A. A. S. ET AL. (2009): Understanding the anatomy of ears from Guinea pigs and rats and it's use in basic otologic research. - Brazilian jurnal Otorhinolaryngology, 75(1): 43-49.
2. AMIN S. ET TUCKER S. (2006): Joint formation in the middle ear: Lessons from the mouse and Guinea pig. - Developmental dynamics, 235: 1326 – 1333.
DOI: 10.1002/dvdy.20666
3. AMIN S., MATALOVÁ E. ET AL. 2007: Includomalleal joint formation: the roles of apoptosis, migration and downregulation. - BMC Developmental Biology, 7:134.
DOI: 10.1186/1471-213X-7-134
4. ANTHWAL N. ET AL. (2012): Evolution of the mammalian middle ear and jaw: adaptions and nowel structures. - Journal of anatmomy, 222(1): 147-160.
DOI: 10.1111/j.1469-7580.2012.01526.x
5. BÁRTA T. ET AL. (2010): Od fyziologie k medicíně, Aktuální výzkum kmenových buněk: ze zkumavky k terapeutickému využití. - Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 45 p.
6. BIČÍK V. ET AL. (2004): Srovnávací fyziologie živočichů, 2. vydání. - Masarykova univerzita, Brno, 165 p.
7. BOWDEN E.R.M. (1977): Development of the Middle and External Ear in Man. – Proceedings of the Royal Society of Medicine, 70(11): 807-815.
8. CAULDWEL EW. ET ANSON BJ. (1942): Stapes and fisula ante fenestram and associated structures in a man. - Arch otolaryng, 36(6): 891-925.
DOI: 10.1001/archotol.1942.03760060131008
9. CHAPMAN S.C. (2011): Can you hear me now? Understanding vertebrate middle ear development. - Front Biosci, 16: 1675-1692.
10. DYLEVSKÝ I. (2007): Obecná kineziologie. – Grada publishing, Praha, 197p.
11. ČERNÝ J. ET AL. (1995): Špeciálna chirurgia; Chirurgia krku a hlavy. – Osveta, Martin SR, 492 p.
12. ČIHÁK R. (2004): Anatomie 3. – Grada Publishing, Praha, 673 p.
13. ČIHÁK R. (2001): Anatomie 1. – Grada, Praha, Praha, 497 p.
14. DOSKOČIL M. (1995): Lidská spodní čelist, obdivuhodná kost. - Vesmír, 74(8): 463.
15. EGER K. J. (2005): Campomelic Dysplazia. - Journal of Diagnostic Medical Sonography, 21: 343-349. DOI: 10.1177/8756479305278970.

and body wall. - Development, 117: 169-178.

16. HAJN V. (2003): Antropologie 1. – Univerzita Palackého v Olomouci, 179 p.
17. HANSON JR, ANSON BJ, STRICKLAND EM. (1962): Branchial sources of the auditory ossicles in a man. Part II: Observations of embryonic stages from 7 mm to 28 mm (CR lenght). - Arch Otolaryng, 76: 200-215.
18. JOSHI L. ET TUCKER A.S. (2012): Middle ear – from development to function. Eya 1 mice models for understanding middle ear morphogenesis and joint formation. – Konference mladých vědeckých pracovníků s mezinárodní účastí 2012 na FVLFFVU Brno, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 191p.
19. KANZLER B. ET AL. (1998): Hoxa2 restrict the chondrogenic domain and inhibits bone formation during development of the branchial area. – Development, 125: 2585-2597.
20. KUBICOVÁ P. (2010): Diplomová práce, Ovlivnění signální dráhy retinoidů a diferenciace buněk xenobiotiky. - Masarykova univerzita, Brno, 64 p.
21. MACHOLÁN M. (1997): Myš domácí. – Vesmír, 74(4): 208-21.
22. MALLO M. (2001): Formation of the Middle Ear: Recent Progress on the Developmental and Molecular Mechanism. - Developmental Biology, 231: 410-419. DOI:10.1006/dbio.2001.0154
23. MALLO M. (1998): Embryological and genetic aspects of middle ear development. - The international journal of developmental biology, 42: 11-12.
24. MARTIN ET AL. (1995): The paired-like homeo box gene Mhox is required for early events of skeletogenesis in multiple lineages. - Genes Dev, 9: 1237 – 1249.
25. MATALOVÁ E. ET AL. (2010a): Od fyziologie k medicíně, Věda na úrovni Nobelových cen – Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 63 p.
26. MATALOVÁ E. ET AL. (2010b): Od fyziologie k medicíně, Presentace vlastního výzkumu a výzkum funkčních plánů organismů – Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 63 p.
27. MINOUX M. ET RIJLI F. M. (2010): Molecular mechanism of cranial neural crest cell migration and patterning in craniofacial development. - Development, 137: 2605 – 2621.
28. NEČAS E. ET AL. (2003): Patologická fyziologie orgánových systémů, část II. – Karolinum, Praha 760 p.
29. PHIPPARD D. ET AL. (1999): Target Mutagenesis of the POU-Domain Gene Brn4/Pou3f4 Causes Developmental Defects in the Inner Ear. - The Journal of Neuroscience, 19(14): 5980-5989.

30. QUI M. ET AL. (1995): Null mutation of *Dlx2* results in abnormal morphogenesis of proximal first and second branchial arch derivatives and abnormal differentiation in second branchial arch derivatives and abnormal differentiation in the forebrain. – *Genes Dev.*, 9: 2523-2538. DOI: 10.1101/gad.9.20.2523
31. RICHTER A. C. ET AL. (2010): Defect in middle ear cavitation cause conductive hearing loss in the *Tcof1* mutant mouse. - *Human molecular genetics*, 19(8): 1551-1560.
32. ROBERTS D. S. ET MILLER S.A. (1998): Apoptosis in Cavitation of Middle Ear Space. - *The Anatomical Record*, 251: 286-289.
DOI: 10.1002/(SICI)1097-0185(199807)251:3<286::AID-AR2>3.0.CO;2-U
33. RODRÍGUEZ-VÁZQUES J. F. (2005): Development of the stapes and associated structures in human embryos. - *Journal of anatomy*, 207: 165-173. DOI: 10.1111/j.1469-7580.2005.00441.x
34. RODRÍGUEZ-VÁZQUES J. F. (1991): A study of the os goniale in man. - *Acta anatomica*, 142: 188-192. DOI: 10.1159/000147188
35. SADLER T. W. (2010): *Langmanova lékařská embryologie*. – Grada, Praha, 432 p.
36. SETTLE S.H. (2003): Multiple joint and skeletal patterning defects caused by single and double mutations in the mouse *Gdf6* and *Gdf5* genes. - *Developmental biology*, 254: 116 – 130.
37. ŠMARDA ET AL. (2005): *Metody molekulární biologie*. 1. Vydání. – MU Brno, 194 p.
38. TICHÝ F. ET AL. (2004): *Histologie mikroskopická anatomie*. - Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 275 p.
39. TROJAN S. ET AL. (1999): *Lékařská fyziologie*, 3. Doplněné a rozšířené vydání. – Grada publishing, Praha, 616 p.
40. TUCKER A.S. ET AL. (2004): *Bapx1* regulates patterning in the middle ear: altered regulatory role in the transition from the proximal jaw during vertebrate evolution. - *Development*, 131: 1235 - 1245. DOI: 10.1242/dev.01017.
41. TUCKER A. ET SHARPE P. (2004): The cutting edge of mammalian development; how the embryo makes teeth. - *Nature reviews genetics*, 5: 499 – 508.
DOI: 10.1038/nrg1380
42. VOKURKA M., HUGO J. ET AL. (2008): *Velký lékařský slovník*, 8. Vydání. - Maxdorf, Praha, 1144 p.

43. WILSON J. ET TUCKER A.S. (2004): Fgf and Bmp signals repress the expression of Bapx1 in the mandibular mesenchyme and control the position of the developing jaw joint. - Developmental biology, 266: 138 – 150.
44. WOOD J. L. ET AL. (2010): Analysis of chick (*Gallus gallus*) middle ear columella formation. - Developmental Biology 10:16. DOI.10.1186/1471-213X-10-16
45. ZHENG W. ET AL. (2003): The role of the Six1 in mammalian auditory system development. – Development, 130: 3989-4000. DOI: 10.1242/dev.00628
46. URL 1: < <http://www.biolib.cz/cz/glossaryterm/id4786/>> [cit. 23. 1. 2013]
47. URL 2: <<http://www.lfp.cuni.cz/patofyziologie/materialy/zvirata/zvirata.htm>> [cit. 23. 1. 2013]
48. URL 3: < <http://www.biolib.cz/cz/taxon/id8304/>> [cit. 24. 1. 2013]
49. URL 4: < <http://old.lf3.cuni.cz/histologie/materialy/doc/skripta.pdf> > [cit. 19. 2. 2013]
50. URL 5: < <http://ghr.nlm.nih.gov/gene> > [cit. 20. 2. 2013]