

# Klonování savčího embrya (1)

## Omezení a perspektivy

Josef Fulka

Narození jehničky Dolly znamenalo ve světě vědy skutečně klíčovou událost. V odborných i laických diskusích se ozývaly optimistické i kritické hlasy a také úvahy o tom, jak by mohlo být klonování zneužito. Na okraji zájmu zůstávaly tehdy teoretické předpoklady, ze kterých pracovníci z výzkumného ústavu v Roslinu (Roslin Institute, Edinburgh, Skotsko) vycházeli při svých experimentech se zárodečnými a embryonálními buňkami. Měli v té době k dispozici nejen vlastní bohaté zkušenosti, ale také rozsáhlé literární poznatky z fyziologie reprodukce i embryologie. Další výhodou byla dostupnost početných populací experimentálních zvířat, která nebývá při práci na ovčích, prasatech a skotu obvykle naplněna. Jejich chov je spojen se značnými finančními náklady a jen málo pracovišť si může dovolit experimenty na těchto zvířatech v potřebném rozsahu.

V podobné situaci se nacházela i Česká republika, kde se na některých ústavech s úspěchem zvládly metodiky uplatňované při klonování. Na vysoké úrovni se již tehdy realizovaly programy zaměřené na studium oplození savčích vaječných buněk (oocytů) *in vitro*, na studium zákonitosti zrání ovariálních oocytů v kultuře, na hodnocení vztahů mezi oplazmou a jádrem v různých experimentálních podmínkách a na přenos embryí produkovaných *in vivo* nebo *in*

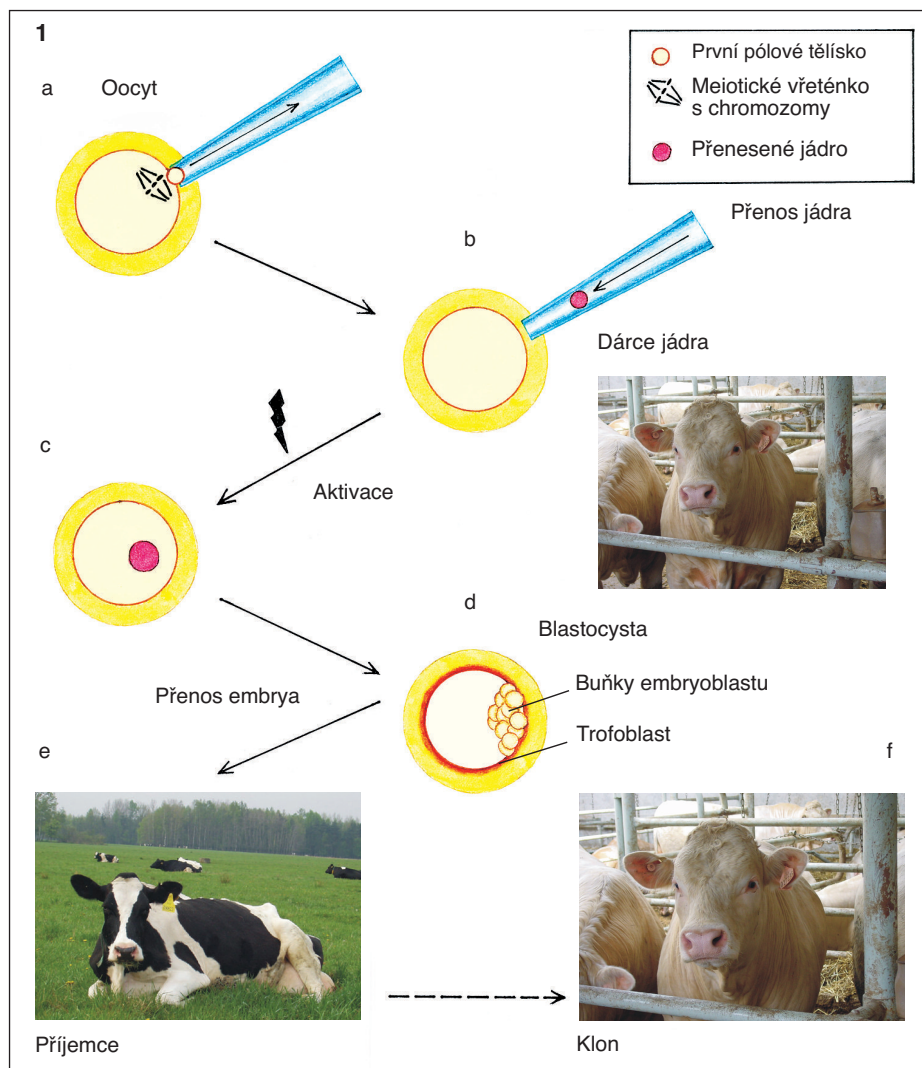
*vitro*. Dařilo se pravidelně publikovat výsledky v předních zahraničních časopisech a mnohé z nich zasáhly do experimentů v laboratořích studujících klonování savčích embryí. Nebylo proto náhodné, že na základě těchto aktivit přicházela ze zahraničí četná pozvání k účasti na pokusech s embryonálními buňkami. Řada pracovníků těchto nabídek využila a jejich jména se pravidelně objevovala na významných publikacích.

V r. 1997 publikovala uznávaná odbornice v oblasti vývojové biologie Marie Di Bernardino monografii o přenosu jader v různých živočichů, nazvanou *Genomic Potential of Differentiated Cell*. Popisuje v ní mimo jiné hromadění poznatků o vztahu mezi jádrem a cytoplazmou zárodečných a somatických (tělních) buněk za různých experimentálních podmínek.

Nepřekvapuje, že první pokusy byly uskutečněny na obojživelnících. Snadná dostupnost a množství zárodečných buněk, jejich velikost, znalosti o průběhu embryonálního vývoje a nenáročná zacházení je k takovým pokusům přímo předurčovaly. Navíc, tehdejší mikromanipulační techniky neodpovídaly nárokům na práci s tak malými objekty, jakými jsou oocyty savců. Po několika letech pokusů v různých laboratořích se podařilo předložit dostatek důkazů pro vyslovení závěru, že již zčásti diferencované jádro embryonální buňky žáby drápatky *Xenopus laevis* přenesené do cytoplazmy jádra zbaveného (enukleovaného) oocyty dediferencuje a stává se znovu totipotentní, tzn. že neztrácí nic ze své původní genetické výbavy. Zároveň si udržuje schopnost podporovat vývoj rekonstruovaného embrya až do dospělosti. Pozdější pozorování prokázala, že k dediferenciaci dochází také u jádra již značně funkčně specializované buňky dospělého jedince, ale po rekonstrukci taková embrya končí svůj vývoj již ve stadiu pulce. Podrobná analýza výsledků umožnila následně vyslovit hypotézu o zachování genetické výbavy jádra bez ohledu na stav diferenciaci buňky a o postupné expresi a represi jednotlivých genů od oplození až po dosažení dospělosti. Studium zákonitostí regulace embryonálního vývoje získalo nové možnosti, zkušenosti získané u obojživelníků stimulovaly zpočátku jen nespěšně experimenty také u savců a vedly ke vzniku vědní oblasti, která se zjednodušeně nazývá embryonální klonování.

Při pohledu do odborné literatury z posledních 20–30 let lze nalézt občasně zprávy o přenosech jader savců izolovaných z různých typů buněk. Přenosy jader se používaly především jako experimentální postupy při studiu vztahů mezi cytoplazmou a jádrem a výsledky přijímala se zájmem pouze úzká skupina lidí, která se zabývala hodnocením základních problémů regulace embryonálního vývoje savců. Situace se radikálně změnila, když v r. 1997 Ian Wilmut se svými spolupracovníky zveřejnili v časopise *Nature* narození pověstné ovce Dolly. Ta překvapivě na rozdíl od svých předchůdců pocházela z embrya vzniklého z jádra izolovaného z blíže nespecifikované populace buněk mléčné žlázy dospělé

*Obr. 1 Schematické znázornění postupů přenosu jader a tvorby klonovaných jedinců: a) aspirace chromozomů uspořádaných v metafázi II meiotického dělení (M II) z ovulovaného nebo in vitro dozrálého oocytu; b) přenesení jádra somatické buňky do jádra zbaveného oocytu; c) aktivace rekonstruovaného oocytu krátkým elektrickým výbojem; d) kultivace ve vhodném médiu in vitro po dobu 6–7 dní, kdy dochází u části embryí k postupnému dělení až do blastocysty a diferenciaci na buňky embryoblastu a trofoblastu; e) blastocysty se přenášejí buď do dělohy příjemce nebo slouží k získávání embryonálních buněk pro experimentální účely; f) po přenosu a ukončení březosti se rodí klonovaný jedinec identický s dárceem jader. Podle J. Fulky kreslil S. Holčěek*





Postup přípravy cytoplastu, který poslouží jako příjemce jádra: (a) — oocyt v metafázi (MII) s prvním polárním tělískem připraven k enukleaci. Vřeténko s chromozomy a polární tělísko zbarveny modře; (b) — vřeténko je nasáto enukleační pipetou; (c) — vřeténko je již lokalizováno v pipetě a cytoplast je poté připraven k použití. Snímky J. Fulky

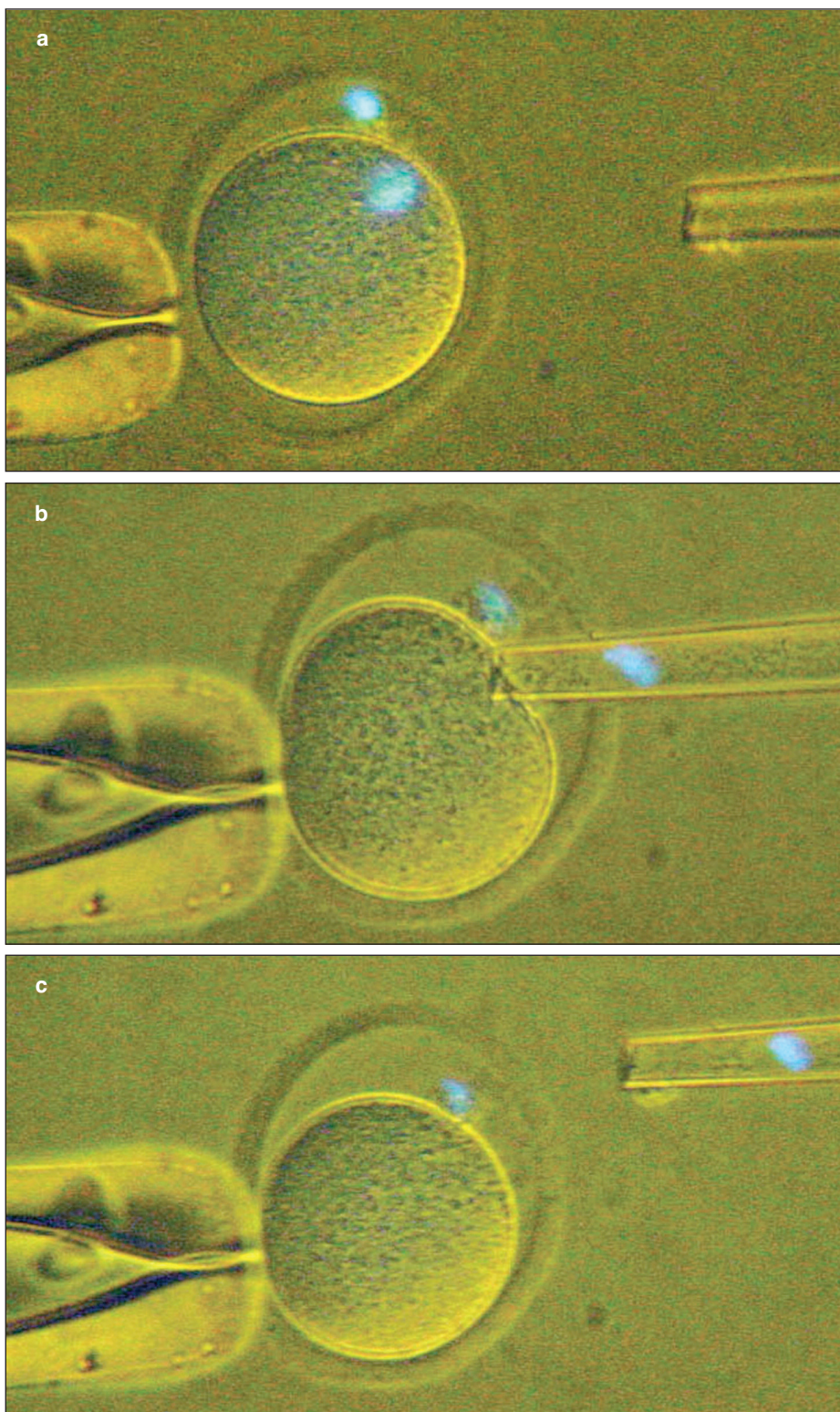
ovce. Ve všech dříve publikovaných experimentech končících dílčími pozitivními výsledky pocházela jádra buď z preimplantačních embryí, nebo z buněk plodů v časných stadiích nitroděložního vývoje.

Bezprostředně po zveřejnění zprávy o využitelnosti somatické buňky z dospělého jedince se počaly objevovat odvážné názory na aplikaci metody klonování v chovu hospodářských zvířat, ale také úvahy o využití nebo také zneužití v reprodukci člověka. Domácí i zahraniční média nabízela velmi odvážné scénáře a neubránila se ani předkládání zcela zavádějících informací. Jen na okraji zájmů zůstávaly zmínky o podmínkách vzniku legendárního jehněte a nízké efektivitě zvolených postupů, kdy se z 277 rekonstruovaných embryí narodilo pouze jedno živé mládě. Ostatní embrya ukončila svůj vývoj ještě před přenosem finálnímu příjemci nebo během březosti. Později se navíc ukázalo, že ani narozením mláděte problémy nekončily — u klonů se nezdávka objevily zdravotní potíže a zvýšený úhyn potomstva. A právě tyto negativní jevy zůstaly předmětem pozornosti mnoha vědeckých skupin a o možných příčinách bylo publikováno bezpočet prací. Pro širší veřejnost bývají výsledky jejich zdánlivě mravenčí práce málo zajímavé a jen v případech výjimečného úspěchu, jako je naklonování mláděte dosud „vzdorujícího“ druhu, upoutá klonování znovu krátkodobou pozornost. Jen zřídka si však čtenář nebo divák uvědomí, jak složité takové embryo vzniká a kolika rizikovým faktorům je narození kopie vybraného dárce jádra vystavena.

Cílem příspěvku je alespoň na některé z nich poukázat a naznačit, na jakých úrovních může dojít k zastavení vývoje rekonstruovaného embrya. Většina vlivů není ani s dostatečnou přesností definována a situaci navíc komplikuje jejich působení ve vzájemné závislosti. Není proto překvapující, že pokrok v navrhování účinnějších postupů je zdánlivě pozvolný a neodpovídá původnímu očekávání ani potřebám podmínujícím široké praktické uplatnění. I když mnozí požadovali od přenosu jader u savců více, než může v současné době nabídnout, nelze přehlédnout narůstání zájmu o studium vývojové biologie savců a předkládání teoreticky podložených úvah o budoucím využití přenosu jader v řadě oblastí, včetně humánní medicíny.

### Stručná historie přenosu jader u savců

Výsledky získané u obojživelníků stimulovaly snahy o uspořádání podobných pokusů u savců. Jen těžko by se však daly realizovat bez využití dosavadních a získání nových poznatků o savcím oocytu, o jeho oplození a vývoji embrya, které na rozdíl od obojživelníků vyžaduje mnohem náročnější metodické přístupy. Již jen samotné poznávání tvorby samičích zárodečných buněk a jejich specifických vlastností na sebe vázalo a stále ještě váže trvalý zájem řady laboratoří. Jednoduché nebylo ani naučit se oocyty izolovat, připravovat pro ně *in vitro*



vhodné prostředí a zacházet s nimi tak, aby nedošlo k jejich poškození. Se stejnými problémy bylo spojeno i studium embryonálního vývoje od oplození do implantace. I když savčí oocyt lze považovat za obra mezi buňkami (má velikost zhruba 0,1 mm), manipulace s ním vyžaduje vhodné nástroje a manuální zručnost. Podobné přístupy vyžadují i experimenty s embryi před implantací, která jsou, tak jako oocyty, dostupná jen v omezeném množství. Jako modelové objekty v počátečních, spíše nahodile prováděných studiích sloužili králík nebo myš. A tak se již v r. 1975 objevila opět časopise v Nature zpráva od Derka Bromhalla o přenosu jader embrya izolovaných ze stadia moruly do králíčího oocyty, ve kterém však byla ponechána jeho chromozomální výbava. Podařilo se zaznamenat i následná

dělení, ale vzniklé buňky měly triploidní nebo tetraploidní jádra, a tak se vývoj velmi brzy zastavil.

Pokusy o poznání zákonitostí vývoje savčího embrya však pokračovaly i nadále a jsou spojovány zejména se jmény A. Tar-kowski, M. C. Chang, C. R. Austin a mnoha dalších, kteří dokázali se zcela primitivními prostředky získávat o savcím embryu převratné údaje. Z nich později vycházel i Jacek Modlinski při svém pobytu v laboratoři Anne McLarenové. V Nature v r. 1980 publikoval zjištění o vývoji části myších blastocyst vzniklých po injekci embryonálních buněk do intaktních zygot bez ohledu na jejich tetraploidní výbavu. Všiml si, že z populace jader izolovaných z buněk blastocysty se po injekci do intaktní zygoty vyvíjejí jen embrya vzniklá z buněk embryo-



Tab. Výsledky přenosů jader somatických buněk u různých savců

Druh	Dárcovská buňka	Počet narozených mláďat ku počtu rekonstruovaných oocytů	Efektivita [%]
Skot	kumulární buňka	5/47	10,6
	buňka vejcovodu	3/94	3,2
	granulózní buňka	10/552	1,8
	epitel mléčné žlázy	3/89	1,1
	fetální fibroblast	7/92	7,6
	fibroblast z dospělého jedince	9/719	1,2
Ovce	epitel mléčné žlázy	1/227	0,4
	geneticky modifikovaný fetální fibroblast	14/417	3,3
	geneticky modifikovaný fetální fibroblast	7/845	0,8
Myš	kumulární buňka	16/2 468	0,6
	fetální ovariální buňka	4/91	2,1
	fetální buňka varlete	2/12	1,0
	Sertoliho buňka	7/646	1,1
Králík	kumulární buňka	6/612	1,0

blastu. Buňky trofoblastu neměly, tehdy ještě z neznámých příčin, schopnost indukovat další vývoj. I podle dalších méně známých publikací nic v té době ještě nenasvědčovalo tomu, že by po přenosu jádra jakékoli buňky do cytoplazmy sebelépe připraveného oocyty mohlo dojít k nástupu dalších dělení a formování embrya.

Proto vyvolala velké překvapení zpráva v prestižním časopise Cell, kde Karl Illmensee a Peter Hoppe v r. 1981 oznámili narození mláďat po přenosu jádra myší embryonální buňky do cytoplazmy jádra zbarveného oocyty. Jen málo výsledků z oblasti vývojové biologie vzbudilo takový zájem jako v jejich práci popisovaná tři myší mláďata. Autoři, již dříve dobře známí vědečtí pracovníci, se stali okamžitě středem pozornosti nejen široké veřejnosti, ale zejména zasvěcené vědecké komunity. Po zveřejnění následovala pozvání na významná vědecká setkání a všude se jejich výsledky přijímaly s uznáním. Dalo se přirozeně očekávat, a také k tomu došlo, že se v řadě laboratorů budou snažit jejich postupy zopakovat. K velkému překvapení ani ti nejerudovanější embryologové v tomto úsilí neuspěli. Vznikala tak pozvolna zvláštní situace, kdy po počátečním obdivu nastoupily pochybnosti, a to nejen mezi embryology v zahraničí, ale i na domácím pracovišti — na univerzitě v Ženevě. Objevilo se podezření z manipulace s výsledky a z nedodržení základních etických norem při vedení experimentů. Taková obvinění autoři ostře odmítali, ale ani oni samotní nedokázali svoje vlastní výsledky znovu zopakovat. Vědečtí pracovníci posléze dali návrh na ustavení komise nezávislých odborníků s cílem ukončit tento nebezpečný a dlouho se vlekoucí spor, který vyvolával v konečných důsledcích pochybnosti o poctivosti samotné vědy. Komise došla k závěru, který sice nebyl zcela jednoznačný, rozhodně však nevyzněl ve prospěch věrohodnosti publikovaných výsledků, i když samotní autoři trvale odmítali podezření o možné manipulaci s údaji obsaženými v původní práci. Pro mnoho lidí znamenala tato událost značné komplikace v jejich profesní kariéře a pro autory samotné skončil spor téměř osudově. Byli nuceni opustit slibně se rozvíjející vědeckou budoucnost a věnovat se zcela odlišné činnosti, která má s vědou jen málo společného. Následkem toho organizace rozhodující

o finanční podpoře vědních odvětví odmítaly poskytovat prostředky na projekty, které byt jen vzdáleně připomínaly přenosy jader u savců. Řada pracovišť, která takové projekty na základě nyní zpochybnovaných výsledků již předložila a získala podporu, se dostávala do vážných ekonomických potíží.

Tato stručná historie byla v řadě podrobností daleko dramatictější a naznačila, jakými cestami se může snaha po poznání ubírat, i jak snadno dochází k urychlení nebo zpomalování pokroku. Po těchto událostech se zdálo, že klonování u savců nebude mít předpokládané pokračování a přenos jader, pokud se bude vůbec provádět, najde svoje místo jen při hledání zákonitostí ve vývoji savčího embrya.

Podobný názor získal silnou podporu ve výsledcích velmi zkušeného embryologa Davora Soltera a jeho spolupracovníka Jamese McGratha, kteří přesvědčivě prezentovali v časopise Science v r. 1984 pozorování o neschopnosti normálního vývoje myšího embrya vzniklého po přenosu jádra embryonální buňky. Objevovaly se také úvahy o možné odlišnosti v řízení vývoje embrya mezi savcem a obojživelníkem.

Ale ani ve vědě nebývá nouze o překvapení a o ně se postaral S. M. Willadsen svou zprávou v Nature v r. 1986, kdy popsal narození živých jehňat z embryí zkonstruovaných z jádra zbarveného oocyty a z jádra embryonální buňky. Jeho pracoviště v Cambridge hrálo sice významnou úlohu ve výzkumu reprodukce, ale zabývalo se výhradně problematikou hospodářských zvířat. Pro pracovníky základního výzkumu nepředstavovala hospodářská zvířata vhodný experimentální model a výsledky z podobných pracovišť byly vnímány spíše okrajově. Ve své práci uplatnil Willadsen postupy užité dříve u myši, jádro však přenášel do cytoplazmy ovulovaného oocyty, z něhož odstranil chromozomy uspořádané v té době v metafázi druhého meiotického dělení. Tím zřejmě nabídl vhodnější prostředí pro adaptaci přeneseného jádra a jeho přípravě na další vývoj po rekonstrukci embrya. Svoji úlohu sehrála bezesporu i volba experimentálního modelu a zdá se, že ovce je pro takové pokusy vhodnější než dříve užívaná myš. V každém případě narozená jehňata nabídl přesvědčivý důkaz o možném přenosu jader alespoň u některých savců. O několik měsíců později se objevila další informace o přeno-

su jader, tentokrát u skotu, a zveřejnili ji mladí pracovníci univerzity ve Wisconsinu pod vedením Neala Firsta. Svými výsledky podali další důkaz o možném klonování embryí savců, které znovu upozornily na nutnost sledovat a přísně respektovat mezidruhové rozdíly. Navíc, po metodických modifikacích se konečně pozvolna dařilo i u myši produkovat klonovaná embrya schopná ukončit vývoj narozením potomků. Postupně se měnily také zamítavé postoje k financování projektů zaměřených na přenos jader a v rychlém sledu se počaly objevovat další nadějně výsledky. A tak zdánlivě již nic nebránilo realizaci projektů usilujících o produkci identických populací hospodářských zvířat s výhodnými užitkovými vlastnostmi. Jak se však brzy ukázalo, byla taková optimistická očekávání poněkud předčasná. Všechny další publikované zprávy měly jeden společný, ne příliš povzbuzivý rys, a tím byl velmi nízký počet narozených mláďat. Nastoupilo proto složitě období hledání příčin odpovědných za selhání vývoje rekonstruovaných embryí. Efektivita přenosu jader se sice postupně mírně zvyšovala, nicméně celý postup byl tak finančně náročný, že překotně vznikající společnosti zaměřené na komerční klonování hospodářských zvířat stejně rychle končily svoji činnost.

Pro představu by mohlo být užitečné uvést celkovou problematiku podrobněji a ukázat na jednoduchém schématu základní postupy používané při přenosu jader. Podrobně je znázorněn na obr. na str. 147 jeden z důležitých kroků — příprava cytoplazmu mechanickou enukleací oocyty.

Zdánlivě vyhlížející nabídnuté schéma velmi prosté a jeho naplnění by tedy nemělo přinášet problémy. Skutečnost je však značně odlišná a pro snadnější pochopení by mohl posloužit stručný pohled na faktory, které se na selhání vývoje rekonstruovaného embrya více či méně podílejí. Mohou být spojeny s jádrem, jako budoucím nositelem genetické informace, s cytoplasmem, jako potenciálním prostředím pro reprogramaci jádra a konečně s mikromanipulačními zásahy užívanými při rekonstrukci embrya. Žádný z uvedených faktorů nepůsobí odděleně, jejich vlivy se vzájemně prolínají a určují tak společně vyhlížky rekonstruovaného embrya na přežití.

## Výběr jádra a jeho přeprogramování

V počátečních experimentech sloužily jako zdroj jádra výhradně buňky izolované z embrya po rozdělení do osmi nebo šestnáctibuněčného stadia. Po jejich využití se narodila také první mláďata ovce, skotu i myši. Teoreticky by tak bylo možné získat z původního embrya až šestnáct identických jedinců. Pokud by se ukázala jako platná představa o opětném použití buňky z klonovaného embrya za dárce jádra, nebránilo by nic produkci téměř početné neomezené populace identických mláďat. Vzhledem k dosahovaným kolísavým výsledkům nikdy nedošlo k ověření tohoto postupu v praxi; středem zájmu se stala embrya v pokročilejších stadiích vývoje a objevila se nečekaně zpráva o vzniku embryí z kultivovaných buněk embryoblastu skotu a později dokonce z fetálních dlouhodobě uchovávaných fibroblastů jehňat izolovaných z plodů ve třetím měsíci březosti. S pokračující diferenciací dárcovského jádra se však snižovala životnost rekonstruovaných embryí a jen

1–2 % z nich dokončilo po přenosu vývoj narozením mláďat. Nikdo se ještě v té době neodvážil vyslovit myšlenku, že by dárcem jádra mohl být i dospělý jedinec. Nelze se proto divit, že zpráva o narození Dolly v r. 1997 vyvolala až nečekané překvapení a také řadu pochybností o jejím skutečném původu. Za zdroj jádra v experimentech telat také po přenosu jader somatických buněk z dospělých dárců, a tak ustaly i kritické hlasy označující narození Dolly za náhodný a neopakovatelný úspěch.

Představa o produkci neomezeného počtu identických jedinců se známým genotypem a fenotypem tak začala nabývat stále

konkrétnější podoby. Vzhledem k tomu, že řadu somatických buněk je možné bez větších problémů udržovat a množit v kultuře, případně je i zamrazit, otevřelo se nové pole působnosti pro odvětví genetického inženýrství a navození cílených změn genetické výbavy u potomstva. Z pohledu vlastního klonování zůstává však stále ještě otevřená otázka výběru nevhodnějších typů buněk. I když je obtížné porovnávat údaje pocházející z různých laboratoří, některé, např. kumulární buňky, které tvoří součást ovariálních folikulů a podporují oocyt během jeho vývoje, poskytují opakovaně lepší výsledky než buňky ze stěny vejcovodu nebo buňky kožních fibroblastů. Pro neschopnost indukovat dělení rekonstruovaného embrya byly zcela vyloučeny buňky nervové. Z obecně biologického hlediska jsou rozdíly mezi jednotlivými typy buněk

sice zajímavé, ale vzhledem k dostatku známých „osvědčených“ zdrojů mají pro aplikaci v praxi jen okrajový význam.

O některých publikovaných výsledcích dosažených za použití jader různých zdrojů somatických buněk podává informace tabulka. Uvedené údaje nejsou zdaleka vyčerpávající, ale dokumentují přesvědčivě nízkou efektivitu současné technologie přenosu jader. V tabulce nejsou ani zahrnuti všichni savci, u nichž se klonování podařilo, a pro úplnost by výčet mohl být doplněn o prase, kozu, koně, kočku, králíka, laboratorního potkana, muflona a jednoho z primátů. U nich, stejně jako u ostatních, jsou podíly narozených mláďat velmi nízké, někdy spíše dosažené šťastnou shodou náhod. V další části se pokusíme uvést alespoň některé z příčin podílejících se na selhání vývoje embryí vzniklých přenosem jader.

## Nový přístup k vývoji poledové doby ve střední Evropě (II)

### Vojen Ložek

Vývoj poznání holocénu popsany v prvním dílu (Živa 2005, 3: 100–103) vyústil v rozlišení terestricko-karbonátové facie jakožto nového přístupu k problematice holocénu v oblasti s nedostatkem rostlinných fosilií. Druhý díl proto hodnotí nové poznatky, které tento přístup zatím přinesl.

Výzkum postglaciálních sledů v terestricko-karbonátové facii se opírá o zcela jiné zdroje fosilních dokladů, než jsou pylové analýzy a případně stavba ložisek rašelinných a limnických uloženin. Navíc se váže i na odlišné krajinné typy, jako jsou zejména teplé suché pahorkatiny, ale i vyšší pohoří, pokud pozůstávají z vápnitých hornin. Proto odhaluje řadu různých dějů a podrobností, které podstatně zpestřují a upřesňují dosavadní obraz této nej-

mladší epochy historie naší přírody, jak se běžně uvádí v literatuře (např. Birks 1986). Přitom je třeba zdůraznit, že s ním není v zásadním rozporu, nýbrž ho jen rozvádí podchycením dosud málo známých území i korelací s řadou geologických pochodů (eroze, pedogeneze apod.). Pokusím se shrnout přínos nových poznatků k poznání poledové doby se zřetelem na poměry v českých zemích i na Slovensku, kde se dnes nachází nejhustší síť zpracovaných nalezišť.

### Metabolismus uhličitanu vápenatého

Rozpouštění, migrace a opětné srážení uhličitanu vápenatého ( $\text{CaCO}_3$ ) hraje v te-

restricko-karbonátovém vývoji prvořadou úlohu, neboť obráží nejen klimatické změny, ale má i významný dopad na vegetaci a drobnou faunu. Hlavním produktem opětného vylučování  $\text{CaCO}_3$  jsou sladkovodní vápence, především pěnovce usazené z pramenů a pramenných potoků, které místy tvoří i mnohametrová ložiska (Sv. Jan pod Skalou 17 m!). Ta byla již dlouho známa svým bohatstvím fosilních měkkýšů, a pokud obsahovala i kompaktní polohy, také otisků flóry. Málokdo se však zabýval jejich bližším rozbořem, ačkoli jejich stavba pozůstává z různých typů pěnovců i vloček svahovin a půd stejně jako statické rozboře jejich malakofauny obráží místní změny prostředí do překvapujících podrobností. Tak údolní ložiska umožňují sledovat svahové procesy — polohy čistého pěnovce odpovídají klidovým fázím, kdy se netvoří sutě. Nejvýraznější z nich spadá do pozdního boreálu a atlantiku, později v epiatlantiku je sedimentace pěnovce několikrát přerušena tvorbou slabých půd a přínosem svahového materiálu. Následujícím subboreálu pak odpovídá výrazná rendzina s příměsí suti, která na četných místech chová keramiku z pozdní doby bronzové. Ložiska jsou v té době vysušena, kdežto v následujícím subatlantiku ještě buď dozrívá tvorba pěnovce, nebo dochází k subrozi a posléze i k erozi ložisek. Schránky měkkýšů i otisky listů dokládají přítomnost biocenóz převážně lesního rázu. Ve Slovenském krasu znamená doba bronzová zvrát a velkému odlesnění a zestepnění svahů, jak je vidět třeba nad Hrhovem. Přitom z pevných travertinových poloh je zde předtím doložen buk, zatímco dnes jsou tu buď ostepněné pastviny, nebo křoviště dřínů a mahalebky.

$\text{CaCO}_3$  se ovšem srážel i v zamokřených vstupních úsecích jeskyní a v převisích v podobě sypkého sintru — pěnitce, který v profilech v xerothermních okrscích (např. v Českém, Moravském i Slovenském krasu), tvoří nápadné bělavé polohy v přímém podloží neolitických horizontů. V suchých krajinách je to jediná výrazná poloha pěnitce v rámci holocénu, která

*Nálezy malakofauny z výplní jeskyní a převisů umožňují sledovat vývoj biocenóz i v tak extrémních polohách, jako jsou horní brany údolních svahů nebo vrcholy. Výkop ve vchodu Hlubočepské jeskyně na návrší Bašta v přírodní rezervaci Prokopské údolí (biostratigrafický rozbor viz tab. na str. 150). Foto V. Ložek*

