

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

RIGORÓZNÍ PRÁCE

ÚČINEK MDOCTM NA TESTIKULÁRNÍ TKÁŇ

II

HISTOPATOLOGICKÁ STUDIE

EXPERIMENTÁLNĚ POŠKOZENÉHO VARLETE

Na tomto místě chci poděkovat Doc. RNDr. Vladimíru Semeckému, Csc. za odborné vedení a pomoc při psaní této práce.

Děkuji paní laborantce Pavlíně Jabůrkové za pomoc při zpracování biologického materiálu.

Prohlašuji, že jsem tuto rigorózní práci vypracoval samostatně a pouze s použitím literatury uvedené v seznamu.

Obsah	4
Seznam zkratek	6
Abstrakt	8
1. Cíl rigorózní práce	10
2. Teoretická část	12
2. 1. Vztah imunitního systému a testikulární tkáň	13
2. 1. 1. Varle jako imunitně privilegovaná struktura	13
2. 1. 2. Buňky imunitního systému ve varleti	14
2. 1. 3. Cytokiny	20
2. 2. Některé změny související s testikulárním poškozením	25
2. 3. Vlastnosti a použití polymerů glukózy a jejich derivátů	28
2. 3. 1. β -glukany	28
2. 3. 2. Oxidované deriváty glukánů	30
2. 3. 3. MDOC TM	32
3. Materiál a metody	34
3. 1. Pokusná zvířata, aplikace MDOC TM	35
3. 2. Odběr	35
3. 3. Zpracování materiálu	36
3. 3. 1. Příprava epoxidových pryskyřic a barvení polosilných řezů	36
3. 4. Honocení preparátů	37
4. Výsledky	38
4. 1. Makroskopické hodnocení	39
4. 2. Histologické hodnocení	39
5. Diskuze	42
6. Závěr	48

7. Přílohy	51
7. 1. Tabulková příloha	52
7. 2. Obrazová příloha	54
8. Literatura	62

Seznam zkratek

25-HCh	25-hydroxycholesterol
ATB	antibiotikum
CD	“cluster of differentiation“ – povrchový znak leukocytů
Cl ₂ MDP-1p	dichlormethyl difosfonát ve formě lipozómů
CR3	receptor pro komplement typ 3
CSF	faktor stimulující kolonie
DC	dendritická buňka
EAO	experimentální autoimunitní orchitida
EDS	ethyl-dimethylsulfonát
EK	experimentální kryptorchismus
FSH	folikuly stimulující hormon
GIT	gastro-intestinální trakt
GM-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů
hCG	lidský choriogonadotropin
HE	hematoxylin - eozin
ICAM-1	intracelulární adhezivní molekula
IFN- γ	interferon
IGFBP-3	protein vážící inzulinu podobný růstový faktor
IL-1	interleukin 1
IS	imunitní systém
LB	Leydigovy buňky
LH	luteinizační hormon
LIF	faktor inhibující leukémii
LPS	lipopolysacharid – bakteriální endotoxin

MC	žírná buňka
MCP-1	monocyty přitahující protein
MDF	od makrofágů odvozený faktor
MDOC TM	mikrodispergovaná oxidovaná celulóza
MF	makrofágy
MHC-II	hlavní histokompatibilní komplex třídy 2
MIF	faktor inhibující migraci makrofágů
NK	přírozený zabíječ
NO	oxid dusnatý
PMB	peritubulární myoidní buňky
ROI's	reaktivní kyslíkaté intermediáty
ROS	reaktivní kyslíkaté sloučeniny
SB	Sertoliho buňky
Tgf- β	transformující růstový faktor
TLR's	“toll – like“ receptory
TMF	testikulární makrofágy
Tnf- α	tumor nekrotizující faktor
TnfR1	receptor pro Tnf
TP	toluidin - pyronin
tPA	tkáňový aktivátor plazminogenu
VCAM-1	vaskulární adhezivní molekula
ZB	zárodečné buňky
ZT	zelený trichrom

Abstrakt. V této studii jsme studovali změny zárodečného epitelu potkana Wistar po aplikaci MDOCTM ve formě gelu na hrot experimentálně poraněného varlete. Experiment trval dvanáct dní. Délka operovaných varlat nebyla v porovnání s kontrolami významně snížena. Objevili jsme významnou degeneraci zárodečného epitelu. V lumen tubulů se nacházely apoptotické a mnohojaderné buňky. Početné populace testikulárních makrofágů vykazovaly známky fagocytární činnosti. Pozorovaly jsme buňky Langhansova typu. V apikální části varlete se objevila významná ložisková infiltrace buňkami imunitního systému, která měla charakter chronického zánětu. Tyto změny byly pravděpodobně zapříčiněny chemotaktickým působením MDOCTM.

Abstract. We had studied changes of Wistar rat germinal epithelium after application MDOC™ in the form of gel applied to experimentaly injured testicular peak. Our experiment had lasted for twelve days. Operated testicles was not reduced in size significantly compared with controls. There were apoptotic and multinuclear cells in seminiferous tubules. We recorded numerous populations of testicular macrophages and their phagocytic character. There were also Langhans giant cells. We observed significant infiltration of immune system cells in the apical part of operated testicles in focal way. Infiltration showed character of chronical inflammation. MDOC™ probably caused these changes by its chemotactic effects.

1. Cíl rigorózní práce.

Přípravky na bázi oxidované celulózy používané k zástavě krvácení a prevenci pooperačních adhezí jsou známy již po nějakou dobu. Pro potřeby lékařské vědy je nutné zkoumat mechanismy, kterými působí na organismus.

Na Katedře biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy probíhají již řadu let experimenty na modelových poškozeních zárodečného epitelu samců laboratorních potkanů. Má předchozí práce, která byla primárně zaměřena na studium apoptotických změn zárodečného epitelu potkana během experimentálního kryptorchismu, byla navíc obohacena o aplikaci MDOCTM. Výsledky byly překvapující, ukazovaly na interferenci této látky s imunitním systémem a do jisté míry předznamenaly směr dalšího výzkumu.

Tato práce má za cíl popsat obraz změn vyvolaných lokálním hemostyptikem MDOCTM ve formě gelu na testikulární tkáň.

2. Teoretická část

2. 1. Vztah imunitního systému a testikulární tkáně.

2. 1. 1. Varle jako imunitně privilegovaná struktura.

Ke strukturám, kde funguje imunitní systém ve zvláštním režimu (imunotolerance), se řadí přední oční komora, mozek, pregnantní děloha a varle. Ve varleti dochází v období puberty k tvorbě zralých spermatozoí, jejichž proteiny jsou imunogenní. V intersticiálním kompartmentu fungují mechanismy, které chrání zárodečné buňky před autoimunitní atakou. Ty dokonce zabraňují odhojení štěpu cizorodé tkáně, jak ukazuje řada experimentů. Imunotolerance byla dlouhou dobu vysvětlována pouze existencí hemato-testikulární bariéry. Její integrita ovšem není konstantní, navíc byla prokázána imunogenicita preleptotenních zárodečných buněk vně bariéry. Mezi další faktory podporující imunotoleranci lze zařadit produkci protizánětlivých cytokinů buňkami IS a somatickými buňkami, dále sníženou schopnost testikulárních makrofágů podpořit zánětlivou reakci, defekt v aktivaci lymfocytů T a tlumivé účinky androgenů na produkci zánětlivých cytokinů. Také je diskutována úloha testikulárních DC a MC.^{1,2,3,4,5}

Ovšem tyto mechanismy nejsou schopny za určitých podmínek zamezit zánětlivé reakci. U člověka je zánět reprodukčního traktu významný etiologický faktor neplodnosti. Zatímco symptomatická orchitida zapříčiněná bakteriální nebo virovou infekcí (nejvýznamnější je virus příušnic) je méně častá, asymptomatický zánět má u

infertilních mužů prevalenci vyšší. Biopsie varlat neplodných mužů odhalí zánětlivé infiltráty a granulomy kolem přímých tubulů a i v rete testis. Dále jsou zasaženy i vývodní tubuly a nadvarle, může dojít až nekrózám. U neplodných mužů také často nacházíme protispermiové protilátky v ejakulátu a v krvi. Mimo infekční příčiny bývá v anamnéze vasktomie, úraz, torze, nádor varlete, dále se uvádí cystická fibróza a expozice (ZB) cestou GIT. K vyvolání zánětu se v experimentech používá aktivní imunizace testikulární tkáně, nebo podání specifických lymfocytů T (EAO – viz. níže).

2,3,7

2. 1. 2. Buňky imunitního systému ve varleti.

Velká většina údajů pochází z experimentů na hlodavcích.

Testikulární makrofágy.

Až 25% z intersticiálních buněk varlete u savců jsou makrofágy. Představují zhruba 80% všech leukocytů ve varleti a vykazují mnoho pro MF typických znaků: Fc receptorem zprostředkovaná fagocytóza, receptor MHC II, receptor pro komplement, sekrece cytotoxických molekul, adherence ke skleněným povrchům atd. U potkanů jsou MF kulového tvaru s vroubkovaným jádrem, najdeme zde početné lysozomy, polymorfická reziduální tělíska, mikrovili a cytoplazmatické váčky. Dlouhé filopodie a lamelopodie vybíhají z povrchu MF do lymfatického prostoru. Nejzajímavějším ultrastrukturálním znakem jsou prstovité výběžky. Tyto struktury existují v místech, kde jsou MF a LB v přímém kontaktu. Jsou složeny z dlouhých výběžků LB, které jsou

vsunuty do opouzdřených jamek v MF. U potkana se výběžky tvoří těsně před pubertou.^{8,9,11,12,13}

Populace testikulárních MF není homogenní, lze ji rozdělit pomocí protilátek ED1 a ED2 na tři typy. MF ED1⁺ED2⁻, ED1⁺ED2⁺ a ED1⁻ED2⁺. První typ reprezentují cirkulující monocyty a “nově příchozí” MF, které mají pravděpodobně na starosti zánětlivou odpověď (demonstrována schopnost prezentovat antigen). Druhý typ je přechodný (“nově příchozí” MF se postupně mění) a třetí typ představuje rezidentní MF (okolo 85%), které produkují velké množství TGF-β a přispívají spíše k imunotoleranci. Populace TMF je udržována více proliferací (mitózou) než migrací zvenčí a pozitivně reaguje na podávání hCG.^{10,12,14,15,20}

Přítomnost testikulárních MF je nezbytná pro normální funkce a vývoj LB. Transgenní potkani s nízkým počtem MF vykazují malé hladiny testosteronu a sníženou fertilitu. Pokud jsou ovšem TMF aktivované během zánětlivých procesů (experimentálně pomocí LPS, či kolagenázy), je steroidogeneze též inhibována. Děje se tak pomocí produkce cytokinů TMF jako NO, IL-1 a TNF-α, které tlumí expresi genů pro steroidogenezi a produkce některých ROS, které poškozují mitochondrie LB.^{9,12,16}

Makrofágy, a to nejen testikulární, syntetizují 25-hydroxycholesterol (MDF). Ten, produkovaný TMF, je nejčastěji přeměňován na testosteron, ale působí i jako signální molekula, např. brzdí růst nádorových buněk, či zvyšuje akumulaci iontů vápníku v hladké svalovině. Byla prokázána negativní zpětná vazba mezi produkcí testosteronu a produkcí 25-HCh.⁹

Za podmínek EAO dochází k silnému zvýšení jak prozánětlivých tak rezidentních TMF. Pokud je potkanům podáván EDS k selektivní destrukci LB, dochází k významnému poklesu TMF (po přechodném mírném zvýšení), a to i v případě, že je

suplementován testosteron. Po znovuobjevení LB se vrací TMF k normálním počtům. LB (ale ne testosteron) jsou proto důležité pro existenci MF ve varleti.^{9,17,20}

Byla však také popsána nezbytnost TMF pro vývoj LB. Ve své studii provedli Gaytan a kol. selektivní depleci TMF pomocí Cl₂MDP-lp u potkanů různého stáří. Injikace pátý, desátý a patnáctý den stáří způsobila významnou inhibici vývoje LB. Normální vývoj byl nastolen až po znovuosídlení varlete MF. Dále byl v experimentu použit hCG, jehož podávání způsobilo 7krát vyšší nárůst počtu LB v testes obsahující MF a žádný nárůst v testes bez MF. Toto pozorování ukazuje na zprostředkovatelskou úlohu TMF v působení hCG na LB v postnatálním vývoji, TMF slouží pravděpodobně jako skladiště gonadotropinu. Ve varleti bez TMF (opět pomocí Cl₂MDP-lp) je také znemožněna normální diferenciací LB z jejich prekurzorů (u varlat dospělých potkanů po podání EDS), jak ukazuje další studie Gaytan a kol.^{18,19,24}

Ovlivnění počtu TMF zárodečnými buňkami není pravděpodobné. Za podmínek experimentálního kryptorchismu (deplece zárodečných buněk) nedochází ke změnám v počtu TMF.^{10,21}

Jak již bylo zmíněno, TMF lze experimentálně (in vivo) aktivovat pomocí kolagenázy, či LPS. Jejich schopnost produkovat prozánětlivé cytokiny je však v porovnání s MF z peritonea alterována, jak ukazují ve své studii Kern a kol. (použili LPS).¹¹

Bryniarski a kol. uvádějí vyšší hladiny produkce cytokinů (TNF- α , IL-6, -10, -12) u peritoneálních MF v porovnání s TMF za normálních podmínek. Po podání kolagenázy vzroste produkce cytokinů více u TMF. TMF však produkují méně ROI's, z čehož autoři usuzují na směřování imunitní odpovědi ve varleti spíše k humorální kaskádě.²⁴

Hedger a kol. popisují zvýšenou (400krát) produkci MCP-1 testikulárními buňkami (LB, peritubulární buňky aj.) jako odpověď na LPS. MCP-1 stimuluje nárůst počtu TMF.²²

Zajímavé údaje pocházejí se studie Zipara a kol. Ta zkoumala přítomnost TLR's na myších Sertoliho buňkách. Přítomnost receptorů byla prokázána, navíc jejich obsazení spustilo produkci MCP-1. Data indikují zapojení Sertoliho buněk v imunitní odpovědi.²³

Dále byla nalezena spojitost mezi hormony hypofýzy a TMF. Potkani, kterým bylo provedeno odstranění hypofýzy, vykazovali významné snížení počtu a velikosti TMF, LB nebyly tak citelně zasaženy. Po podání folitropinu a lutropinu došlo k signifikantnímu nárůstu počtu TMF.²⁵

Huang a kol. zaznamenali prolaktinem zprostředkované (u potkanů s hyperprolaktinemií) zvýšení produkce TNF- α v TMF, které vedlo ke snížení produkce testosteronu LB.²⁶

Rodriguez zkoumal poškození kontralaterálního varlete při experimentální testikulární torzi. TMF zde indukovaly apoptózu zárodečných buněk produkcí TNF- α .³¹

Důležité poznatky přináší studie Frungieri a kol. zaměřená na hodnocení TMF neplodných mužů. Makrofágy exprimují geny pro IL-1 a TNF- α a jsou lokalizovány jak v intersticiu tak ve stěně tubulů a dokonce v lumen tubulů. U mužů trpících "Sertoli cell only" a "germ cell arrest" syndromem vzrostl celkový počet TMF dvojnásobně. U všech neplodných mužů byl zřetelný posun TMF z intersticia do lumen tubulů.²⁷

Lymfocyty ve varleti.

B-lymfocyty se ve varleti za normálních okolností nevyskytují, pouze při zánětu.⁵

Lymfocyty T se vyskytují v testes potkanů i člověka a zaujímají zde asi 10 až 20% buněk IS. V kontrastu ke krevnímu řečišti, kde převládají regulační $CD4^+$ T buňky, ve varleti hrají prim cytotoxické $CD8^+$ T buňky a NK buňky. $CD8^+$ T lymfocyty jsou primárně zodpovědní za ochranu proti virové infekci a za protinádorovou ochranu. NK buňky mají potenciál produkovat $IFN-\gamma$ a ovlivňovat tak TMF, zvyšují expresi MHC II na TMF a také produkci prozánětlivých cytokinů. Při experimentální depleci LB se snižuje poměr $CD8^+$ k $CD4^+$. U neplodných mužů bylo prokázáno zvýšení počtu T lymfocytů.^{5,8,10,28}

Ziparo a kol. demonstrují schopnost Sertoliho buněk tlumit proliferaci T lymfocytů. Aktivované periferní B a T lymfocyty exprimují molekulu PD-1; pokud je na ní navázán ligand PD-L1, dochází k inhibici proliferace. Sekrece PD-L1 Sertoliho buňkami pomáhá udržovat imunotoleranci testes.⁴

Ke známým mechanismům navození imunotolerance patří zajisté také systém Fas/FasL. Receptor Fas (též Apo-1 či CD95) po navázání svého ligandu (FasL) spouští signální kaskádu vedoucí k programované buněčné smrti – apoptóze. Některé buňky IS exprimují (inducibilně) obě molekuly. Existuje hypotéza vysvětlující imunotoleranci ve varleti interakcí autoreaktivních T lymfocytů nesoucích na svém povrchu Fas a Sertoliho buněk nesoucích FasL. Ta se však ukazuje jako chybná, protože T buňky a Sertoliho buňky spolu na normálních okolností nepřicházejí do kontaktu. Navíc Allesio a kol. nepotvrdili přítomnost FasL na SB, pouze na zralých spermatozoích.^{3,6}

Ve své studii Hedger a kol. hodnotili vztah T lymfocytů a prostředí testikulárního intersticia. Neprokázali signifikantní změnu v intenzitě tlumivých účinků

intersticia na T lymfocyty v souvislosti se změnami hladin hypofyzárních hormonů ani funkcí LB.²⁸

Dendritické buňky

U potkanů, myší i člověka jsou ve varleti relativně malá množství dendritických buněk. Jejich význam však rozhodně není zanedbatelný, prezentace autoantigenů (lymfocytům T) hraje důležitou roli v rozvoji autoimunity. Po navození EAO je počet DC zvýšen (zůstávají však v intersticiu), narůstá u nich produkce cytokinů a jejich receptorů, také schopnost stimulovat T buňky je vyšší.^{5,29,30}

Mastocyty (žírné buňky)

Ve varleti (člověk, potkan, pes) se vyskytují za normálních okolností pouze malá množství MC. Jejich aktivita je inhibována Leydigovými buňkami (byla nalezena negativní zpětná vazba mezi MC a testosteronem, pozitivní mezi MC a estradiolem). Podávání léčivých přípravků, které stabilizují MC se ukazuje jako přínosné pro léčbu některých typů neplodnosti.^{5,10}

Fijak a kol. zaznamenali desetinásobné zvýšení počtu MC, jejich částečnou degranulaci a lokalizaci v celém intersticiálním kompartmentu při EAO u potkana.³²

Ve své studii prokázali Roaiah a kol. dvě populace MC (intersticiální a peritubulární) u pacientů s azoospermií. Pacienti trpící “Sertoli cell only“ a “germ cell arrest“ syndromem vykazovali signifikantní nárůst počtu MC v obou skupinách.³³

MC jsou pravděpodobně zapojeny do indukce apoptózy cestou TNF- α /TNFR1.³¹

Neutrofilly.

Neutrofilly jsou přítomny ve varleti pouze za patologických podmínek. Patří sem infekce a zánět, některé nádory, testikulární torze, hormonální léčba, poškození varlete.^{5,10}

2. 1. 3. Cytokiny.

Cytokiny (a růstové faktory) jsou polypeptidy produkované mnoha druhy buněk imunitního i neimunitního původu. Působí auto-, či parakrinně a hrají důležitou úlohu v testikulárním prostředí. Je s podivem, že varle obsahuje takové cytokiny a v takových koncentracích, které by v jiných tkáních způsobily zánětlivou reakci. Patří sem např. IL-1, IL-6, TNF, IFN- γ , LIF a SCF. Ve varleti jsou produkovány buňkami IS, Sertoliho buňkami, Leydigovými a peritubulárními buňkami, spermatogoniemi a dalšími zárodečnými buňkami. Cytokiny řídí různé testikulární funkce, například proliferaci zárodečných buněk. Za patologických podmínek IS pomocí cytokinů reguluje imunitní odpověď, což má negativní dopad na spermatogenezi.^{5,34}

Rodina IL-1 zahrnuje dva ligandy IL-1 α (membránově vázaný) a IL-1 β (sekretován ven z buněk) a receptorového antagonistu IL-1ra. IL-1 je produkován ve varleti TMF, LB, SB (konstitutivní produkce IL-1 α), zárodečnými buňkami. Je zajímavé, že po experimentální depleci ZB dojde k vymizení IL-1 ze Sertoliho buněk. IL-1 má mnoho efektů zprostředkovaných receptory IL-1RI a IL-1RII. Podle více studií inhibuje IL-1 bazální a LH/hCG-stimulovanou produkci testosteronu LB. Naproti tomu IL-1 β (produkován stimulovanými TMF) podporuje proliferaci prepubertálních LB. Dále působí (IL-1 α) jako růstový faktor SB a podporuje též růst zárodečných buněk.

Během zánětlivých procesů zaznamenáváme ve varleti jeho zvýšenou produkci. IL-1 zánět podporuje např. proliferací lymfocytů přes zvýšenou tvorbu IL-2 v T-buňkách.^{11,34,35,36}

TNF- α je za fyziologických podmínek produkován ZB (zejména kulovými spermatidami). Působí přes receptory TNFR1 a TNFR2, které jsou na SB a LB. V zárodečném epitelu podporuje spermatogenezi stimulací hladin transferinu a laktátdehydrogenázy. V nízkých hladinách působí proti apoptóze ZB; pokud jsou jeho hladiny zvýšeny během patologických procesů (prozánětlivý efekt), apoptózu spouští. Má významný parakrinní efekt na SB, podporuje zde tvorbu IL-1 α , IL-6, či IGFBP-3. TNF- α je zapojen v dočasné restrukturalizaci těsných spojů a umožňuje tak průchod zárodečných buněk během spermatogeneze. Chronický přívod tohoto cytokinu způsobí ztrátu ZB.^{35,36,37}

TNF- α (stejně jako IL-1, IFN- γ a LPS) způsobuje in vitro nárůst ICAM-1 a VCAM-1 u potkaních SB, což jsou molekuly specificky vážící lymfocyty. Stejně cytokiny a LPS stimulují tvorbu také NO v Sertoliho buňkách. V intersticiu způsobuje TNF- α pokles hladiny testosteronu.^{3,36}

Produkce IL-6 je ve varleti (LB a SB) podmíněna zánětlivými impulzy (stimulují pomocí TNF- α a IL-1). IL-6 sám zánět podporuje (je to neúčinnější aktivátor B a T lymfocytů), stimuluje však také proliferaci SB a jejich tvorbu transferinu.^{3,35,40}

LIF je strukturálně podobný IL-6 a je produkován zejména peritubulárními buňkami. LIF má proliferační a antiapoptotický vliv na ZB, ale zřejmě hraje určitou roli i v intersticiu.³⁴

Úloha SCF a jeho receptoru c-kit ve varleti je klíčová pro primordiální spermatogonie (kmenové buňky v testes, typ Ap). Mutace cytokinu nebo receptoru způsobí infertilitu ztrátou schopnosti migrace, proliferace a schopnosti dělení těchto spermatogonií.³⁴

Interferony můžeme rozdělit na tři hlavní typy: IFN α, β (produkovan některými buňkami napadenými virem) a γ (produkovan aktivovanými lymfocyty a NK). Ve varleti probíhá nepřetržitá produkce IFN- γ časnými spermatidami, další tvorba je vyprovokovaná virovou infekcí. IFN- α je produkovan (průkaz in vitro) SB a PMB. Receptory se nacházejí na SB a LB. IFN- γ tlumí steroidogenezi v LB, jeho experimentální přívod vede ke ztrátě hmotnosti varlat. Podávání pacientům trpícím orchitidou způsobenou virem příušnic má léčebný efekt. Ziparo a kol. našli zvýšenou expresi PD-L1 (viz výše) a dokonce objevení se MHC třídy II u myších SB po podání IFN- γ .^{4,35,38}

TGF- α a β jsou růstové faktory přítomné ve varleti. TGF- α Působí zejména na časný vývoj testikulární tkáně. TGF- β působí jako protizánětlivý faktor produkovaný TMF (viz výše). Tento cytokin působí stejně jako TNF- α (viz výše) a testosteron při restrukturalizaci těsných spojů hematotestikulární bariéry.^{34,35,41}

Významným regulátorem imunologické homeostázy jak za fyziologických tak za patologických podmínek je systém Fas/FasL (viz výše). Experimentální podávání TNF- α a/nebo IFN- γ zvyšuje expresi Fas.³

Ziparo a kol. pozorovali zvýšení počtu ICAM-1, VCAM-1 a expresi ICAM-2 po kultivaci Sertoliho buněk s TNF- α , LPS, či INF- γ . První dva cytokiny také stimulovaly SB k tvorbě IL-6. Tato studie dokazuje souvislost mezi SB a buňkami IS zprostředkovanou cytokiny.³⁹

Jak bylo zmíněno výše, protizánětlivé cytokiny se podílejí na udržení imunotolerance ve varleti. Hedger a kol. sledovali expresi cytokinů i jejich mRNA ve varleti potkana po podání LPS a porovnávali s expresí v játrech (kontrola). Expese prozánětlivých IL-1 β a TNF- α byla v porovnání s kontrolní tkání nižší, naopak tvorba IL-6 byla zvýšena. Protizánětlivé cytokiny TGF- β a activin A vykazovaly vzhledem ke kontrole vysoké hladiny a to i bez stimulace LPS. Tyto dva cytokiny tlumí mnoho prozánětlivých procesů zprostředkovaných MF a lymfocyty, zejména produkci a působení jejich cytokinů.

U IL-1 β a TGF- β byla prokázána pouze jejich inaktivní forma, což ukazuje na testikulární regulaci cytokinů jak na transkripční tak na postranlační úrovni.⁴⁰

Kern a kol. zjistili podobné hladiny cytokinů IL-1, TNF- α a IL-6 u testikulárních I peritoneálních MF. Ovšem tvorba GM-CSF (pravděpodobně tlumí zánětlivou odpověď) byla u TMF osmkrát vyšší. Podání LPS zásadně nezvýšilo hladiny cytokinů u TMF (na rozdíl od peritoneálních), zato byl zaznamenán pokles GM-CSF čtyřikrát. Až podávání LPS v kombinaci s IFN- γ zvýšilo hladiny IL-1, TNF- α a IL-6 u TMF.¹¹

Aktivin a inhibin jsou glykopeptidy, které jsou ve varleti produkovány Sertoliho buňkami (aktivin též LB a PMB), každý se dělí ještě na podtyp A a B. Inhibin působí tlumivě na sekreci FSH, aktivin ji naopak podporuje, uplatňuje se zde negativní zpětná vazba. Aktivin vykazuje jak stimulační tak inhibiční vliv na buňky zárodečného epitelu. Hedger a kol. prokázali zpětnovazebný tlumivý vliv aktivinu A na hladiny IL-1 a IL-6 ve varleti potkana za podmínek normální spermatogeneze i zánětu.⁴²

MIF je od lymfocytů odvozený faktor, který vykazuje početné regulační účinky na MF, zvyšuje například jejich akumulaci v místě zánětu. LB produkují MIF konstitutivně a je to pravděpodobně jeden z mechanismů, jakým udržují příslušný počet MF v testes. Experimentálně snižuje MIF hladiny inhibinu, což ukazuje na jeho

parakrinní roli v regulaci SB. Hedger a kol. hovoří ve své studii o esenciální roli tohoto cytokinu. Po experimentální depleci LB totiž téměř okamžitě převzaly tvorbu MIF Sertoliho buňky.^{40,43}

M-CSF a MCP-1 (viz výše) se také podílejí na udržení populace MF ve varleti. Sekrece MCP-1 je vysoká při zánětlivých stimulech a byla lokalizována v SB, LB, PMB a “nově přichozích” MF (viz výše). MCP-1 je zodpovědný za příchod nových monocytů do varlat.^{22,23}

2. 2. Některé změny související s testikulárním poškozením.

Existuje celá řada modelů, na kterých můžeme popsat změny ukazující na poškození varlete. Patří sem experimentální autoimunní zánět, kryptorchismus, ischemie/reperfúze varlete, poranění, podání toxických látek, hormonální deprivace aj.

Během experimentálního kryptorchismu dochází vlivem tepelného stresu k postupné degeneraci zárodečného epitelu. Typická je masivní ztráta zárodečných buněk a jejich uvolňování do lumen semenotvorného kanálku. Objevují se mnohояderné spermatidy, jádra jsou pokroucená a chromatin dezorganizovaný. V těchto buňkách jsou také rozšířeny cytoplazmatické intercelulární můstky a rozrušen systém mikrotubul. Vyzrávání spermatid je zastaveno. Pozdní spermatidy můžeme nalézt u báze Sertolihových buněk, patrná je také vakuolizace epitelu. Snížení počtu SB nepříznivě ovlivňuje hemato-testikulární bariéru, dochází k redukci fibril těsných spojů. Leydigovy buňky byly pozorovány hypertrofické. Můžeme pozorovat apoptotické buňky. Ztráta ZB je dána jak apoptózou tak odlučováním, formací mnohояderných obřích spermatid. K dalším znakům degenerace patří také ukládání kapének lipidů do SB. Je zde redukce průměrů semenotvorných kanálků a také snížení hmotnosti varlete.

Z hlediska hladin hormonů dochází při EK ke zvýšení plazmatických hladin FSH (až dvojnásobně) a LH (až trojnásobně), k postupnému zvyšování plazmatických hladin estrogenů, plazmatický testosteron je nezměněn, ale klesá jeho koncentrace v intersticiální testikulární tekutině a byla prokázána snížená tvorba Leydigovými buňkami in vitro.^{64, 65, 66, 67, 74}

U kryptorchických pacientů dochází k částečné (zralá stádia ZB), či úplné ztrátě zárodečných buněk a tato změna koreluje s poškozením hemato-testikulární bariéry. Při absenci ZB vykazují Sertoliho buňky znaky nezralosti (oválné jádro, jedno malé jadérko). Těsné spoje mezi SB jsou zde pokroucené, přerušované a často kolmé k bazální membráně. Pokud je zachována částečná produkce alespoň nezralých ZB, mají SB morfologické charakteristiky jako zralé, těsné spoje nejsou přerušované a hemato-testikulární bariéra je kompetentní.⁷⁵

Při experimentálním poranění varlete tupým předmětem unilaterálně popisují Srinivas a kol. výrazné snížení počtu haploidních buněk a to u obou varlat, přičemž poraněné varle bylo postiženo více. Sérové hladiny testosteronu byly nižší než u kontroly, naopak hladiny FSH a estradiolu byly vyšší. Hodnoty LH nebyly ovlivněny. Poškození epitelu je způsobeno protispermiovými protilátkami, proti poškození zdravého varlete působí orchiektomie ipsilaterálního a podávání cyklosporinu.^{68,69}

Özka a kol. hodnotili poškození kontralaterálního varlete. V experimentu použili jak skupinu potkanů s tupým poraněním ipsilaterálního varlete, tak s tržnou ranou (poškozená tunica albuginea). Obě skupiny měly snížené hladiny inhibinu B. Histologická analýza prokázala snížení Johnsonova skóre (u obou varlat).⁷⁰

Při unilaterálním poranění varlat u mužů (střelná, bodná a tupá poranění) byly také popsány některé markery. Patří sem zvýšení hladin FSH a LH a snížení produkce zralých spermií, případně nález protispermiových protilátek u pacientů, kteří podstoupili orchiektomii. Pacienti, kterým bylo poškozené varle zachráněno, nevykazovali zvláštní odchylky ve sledovaných parametrech.⁷¹

V experimentech s podáváním olova potkanům byl zjištěn škodlivý vliv na zárodečný epitel a změny hladin některých hormonů. Dochází k dávkově závislému poklesu počtu zárodečných buněk (od spermatogonií po zralé spermatidy). Byla pozorována zvýšená vakuolizace SB. Snížené hladiny plazmatického testosteronu (o 80%) ukazují na porušenou funkci LB. Také byly prokázány snížené hladiny FSH a LH.^{72,73}

Dalším modelem pro zkoumání testikulárního poškození je expozice 2,5-hexandionem. Tento toxický diketon způsobuje irreverzibilní testikulární atrofii. Dochází k vakuolizaci SB, snížení tvorby tekutiny semenotvorných kanálků, k masivní ztrátě zárodečných buněk apoptózou i odlučováním. Polymerací tubulinu SB je porušen transport zárodečných buněk. Také byla popsána změna tvorby SCF směrem k solubilní formě (x membránová), což poškozuje ZB.^{76,77}

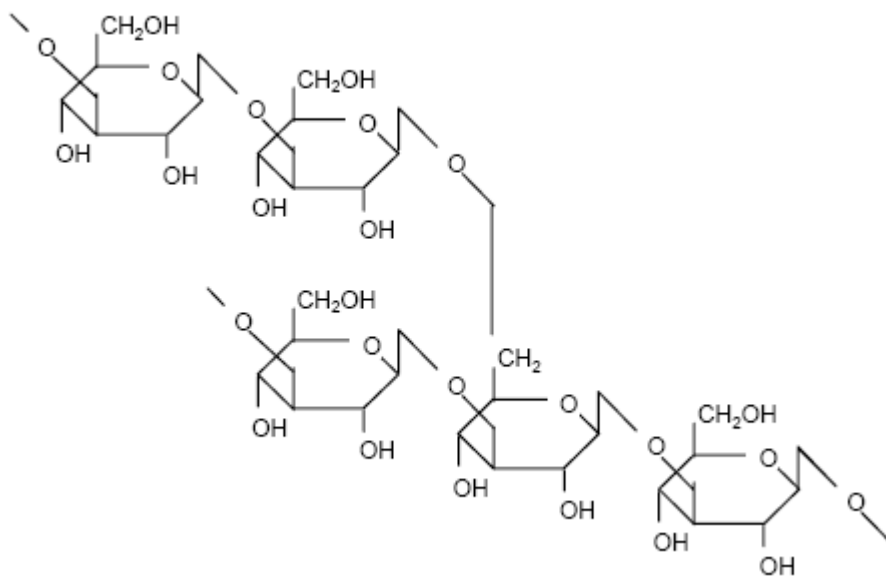
Ftaláty jsou dlouho známy svojí škodlivostí pro samčí reprodukční systém. Primárním cílem toxicity jsou Sertoliho buňky. Je přítomna vakuolizace SB, porušení jejich cytoskeletu, poškození funkce FSH receptorů. Výsledkem je apoptóza zárodečných buněk.⁷⁷

2. 3. Vlastnosti a použití polymerů glukózy a jejich derivátů.

2. 3. 1. β -glukany

β -glukan je chemické označení polymeru β -glukózy. Polymery můžeme dělit dle polohy glykosidové vazby.

(1->3)- β -D-glukany jsou intenzivně studovány pro své imunostimulační vlastnosti. Neaktivnější jsou ty, které obsahují postranní větvení v poloze C6 (viz Obr.1). Například schizophyllan (izolován z houby *Schizophyllum commune*) je rozvětvený na každé třetí glukózové jednotce a postranní větev je tvořena (1->6)- β -D-glukózovými zbytky.^{45,46}



Obr. 1 Molekula β -glukanu.⁴⁵

(1->3)- β -D-glukany (dále jen β -glukany) se nacházejí například v mořských řasách, bakteriích a obilovinách (zde obsahují rovněž glukózu vázanou $\beta(1\rightarrow4)$), ovšem nejčastěji jsou získávány z buněčných stěn hub. Obecně je lze rozdělit na rozpustné a nerozpustné ve vodě. Nejstudovanějšími β -glukany jsou lentinan, schizophyllan, grifolan a krestin.

Mezi hlavní imunofarmakologické vlastnosti β -glukanů patří zvýšení odolnosti proti bakteriálním, virovým, mykotickým a parazitálním onemocněním, důležitý je však také jejich protinádorový efekt.^{44,45,46}

Imunostimulační účinek je zprostředkován řadou mechanismů. Nejmarkantněji se projevuje zvýšení fagocytární a proliferativní činnosti fagocytů, zejména MF. β -glukany s vyšší molekulovou hmotností mohou být MF fagocytovány, tato aktivace vede k produkci cytokinů (IL-6, INF- γ , TNF- α a dalších). Důležité jsou interakce β -glukanů s receptory MF, patří sem receptory TLR-2, dectin-1, CR3, laktosylceramid a pravděpodobně i další. Navázání β -glukanu na receptory způsobuje zvýšený pohyb MF a jejich fagocytární schopnost, degranulaci, tvorbu ROI's a volných radikálů, tvorbu cytokinů (interleukiny, interferon, GM-CSF). Dále dochází také k aktivaci buněk B a T. Zajímavé je, že aktivace lymfocytů probíhá ve prospěch subpopulace Th1, což svědčí o protialergickém působení β -glukanů. β -glukany jsou také schopny přímo aktivovat NK buňky.^{44,45,47}

Důležité je, že aktivace imunitních mechanismů směřuje proti jakémukoli přítomnému antigenu, mikroorganismu či nádorové buňce. V Japonsku jsou využívány fungální β -glukany v léčbě rakoviny klinicky, hovoří se o úspěšné léčbě melanomu. Většina důkazů o protinádorové aktivitě se týká lentinanu, krestinu a schizophyllanu, využívá se také chemické modifikace jejich struktury (zejména pro lepší rozpustnost ve vodě). Dobrou účinnost vykazuje kombinace β -glukanu a klasické protinádorové

terapie, navíc existují důkazy potvrzující snížení nežádoucích účinků antineoplastik při podávání β -glukanů. Tento efekt je přisuzován jejich antioxidačnímu působení.

Protiinfekční (zejména protibakteriální) aktivita β -glukanů byla prokázána na řadě modelů. Léčba měla pozitivní efekt ve smyslu snížení mortality a poklesu počtu bakterií u zvířat infikovaných například *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium leprae*, *Streptococcus pneumoniae* a dalšími. Lentinan vykazuje též protivirovou aktivitu u chřipkového viru, herpes viru, myxoviru a dalším.^{45,48}

Opět se ukazuje benefit kombinace tradiční antiinfekční léčby a β -glukanu.

K dalším účinkům β -glukanů patří zlepšení hojení ran, snižování hladin glukózy v krvi či zlepšení GIT potíží. β -glukan získaný z obilovin (i vazby 1->4) pomáhá snižovat hladiny krevního i jaterního cholesterolu.^{44,45}

2. 3. 2. Oxidované deriváty glukanů

Cross a kol. popisují ve své práci oxidaci β -glukanu ze *Saccharomyces cerevisiae*, která zlepšila jeho rozpustnost ve vodě. Oxidovaný β -glukan si udržel své imunostimulační vlastnosti, které byly demonstrovány u T a B buněk a MF.⁴⁹

β -glukany, kde je lineární řetězec složen z D-glukózy nebo 2-deoxy-2-aminoglukózy vazbou 1->4, jsou nejrozšířenější přírodní polysacharidy. Patří sem celulóza, chitin a chitosan. Pokud necháme celulózu oxidovat na C6, vznikne polyglukuronová kyselina.

Oxidovaná regenerovaná celulóza (obchodní názvy Oxycel, Surgicel, Interceed a jiné) je snad nejvíce používaným materiálem pro zástavu místního krvácení (lokální hemostatikum).⁵⁰

Během chirurgických výkonů se k lokální hemostáze používá elektrokoagulace či ligace krvácející cévy nebo právě lokálních hemostatik, která jsou vhodná zejména u tkání s difúzním charakterem krvácení (mozek, játra ledviny, slezina, plíce). Používají se preparáty obsahující fibrin, trombin a kolagen (TachoSil), želatinové houby (Spongostan), kostní vosk, kyanoakrylátová tkáňová lepidla a oxidovaná regenerovaná celulóza (dále jen oxidovaná celulóza). Ta se přikládá přímo na krvácející místo nebo orgán, po nasycení krví se mění na hnědou až černou rosolovitou hmotu, která pomáhá při tvorbě krevní sraženiny a přitom vyvíjí mírný tlak na krvácející místo. Výhodou je biologická vstřebatelnost, antimikrobní účinek, schopnost vylučovat volné radikály. Oxidovaná celulóza se dále používá pro prevenci postoperačních adhezí a v léčbě ran. Pro léčbu ran bývá v kombinaci s kolagenem, taková krytí mohou navíc obsahovat stříbrné ionty působící mikrobicidně.^{50,51,52,53}

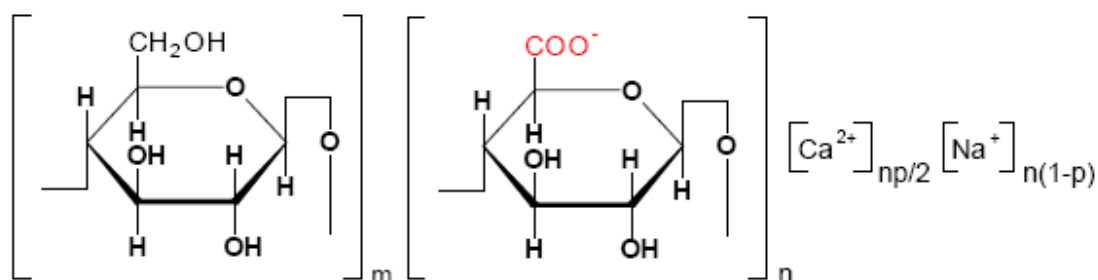
Gago a kol. ve své studii prokázali zvýšení produkce tPA u lidských mezoteliálních buněk vystavených působení oxidované celulózy in vitro. Díky tomu došlo ke zvýšení fibrinolytické aktivity. Tento účinek se uplatňuje v neprospěch postoperativních adhezí.⁵⁴

Bylo prokázáno snížení postoperativních adhezí u žen po laparoskopické myomektomii, taktéž snížení adhezí po operativních zákrocích na ovariích, nebo po zákrocích na děloze (oba dva králičí model).^{55,56,57}

Studie Spanglera a kol. potvrdila antimikrobní aktivitu oxidované celulózy *in vitro*, a to proti ATB-rezistentním bakteriím.⁵⁸

2.3.3. MDOCTM

MDOCTM je obchodní název pro mikrodispergovanou Ca²⁺/Na⁺ sůl kyseliny (1->4)-β-D-polyanhydroglukuronové (PAGA). Je vyráběna firmou Alltracel Pharma Ltd. (Dublin, Irsko) hydrolyzou oxidované celulózy (MDOCTM – mikrodispergovaná oxidovaná celulóza).



Obr.2 Chemická struktura MDOCTM. Náhodný kopolymer polyanhydroglukuronové kyseliny a polyanhydroglukózy ve formě soli.⁵⁹

Jedná se o bílý amorfní prášek o molekulové hmotnosti od 50 do 200 kDa. Látka je biokompatibilní, neutrální, vstřebatelné hemostyptikum, které se používá k zástavě kapilárního a parenchymatózního krvácení.^{59,61}

Jelínková a kol. zkoumali imunostimulační vlastnosti MDOCTM. Prokázali stimulaci spontánní proliferace myších splenocytů a lidských bílých krvinek (*in vitro*). Dále u těchto buněčných kultur došlo ke zvýšení produkce TNF-α. *In vivo* MDOCTM

dokázala u myši stimulovat buňky kostní dřeně, krevní monocyty a lymfocyty B. Stimulace myších splenocytů MDOCTM byla téměř souměřitelná se stimulací pomocí LPS.⁵⁰

Pecka a kol. zkoumali vliv různých iontů v molekule PAGA (MDOCTM) na její schopnost snižovat počet krevních destiček v nesrážlivé krvi. Nejvýraznější vliv vykazují ionty vápenaté, železité ionty mají mírnější účinek a u hlinitých iontů je účinek zpožděn. Zavedením sulfátové skupiny klesá významně hemostatická účinnost PAGA. Dále Pecka popisuje vliv organického kationtu (polybrenu), tvořícího s MDOC intermolekulární komplexy, opět na snížení počtu krevních destiček. Sloučenina nevykazovala očekávaný hemostatický efekt.^{60,61}

Nanovláknno

NanospiderTM je patentovaná technologie vyvinutá Technickou Univerzitou v Liberci (ČR) na katedře netkaných textilií, která umožňuje produkci nanovláknových textilií v průmyslovém měřítku.

Tato metoda je široce použitelná pro výrobu ultratenkých vláken z mnoha materiálů včetně polymerů. K výrobě vláken se používá elektrostatického pole o vysokém napětí mezi kolektorem a kapilárou. Na konci kapiláry tvoří kapky tekutého polymeru vlivem napětí tzv. Taylorův kužel. Když elektrické napětí překoná povrchovou tenzi kapky, vytryskne elektricky nabitý pramínek (nanovláknno) polymeru z vrcholu kužele, přičemž dochází k odpařování rozpouštědla. Nanovláknna jsou zachycována na rotujícím válci. Jejich poloměr se pohybuje od padesáti do tří set nanometrů.

Technologií NanospiderTM je vyráběno nanovláknno MDOCTM (Nano-MDOCTM). Textilie připravená z nanovláknna vykazuje dobrý hemostatický a antibakteriální efekt.^{62,63}

3. Materiál a metody.

3. 1. Pokusná zvířata, aplikace MDOC™

Do experimentu byli zařazeni samci laboratorních potkanů Wistar, chovaných za standardních podmínek ve viváriu FaF UK. Jednalo se o 5 zvířat, pokus byl proveden dne 26. 11. 2008. Zvířata podstoupila operaci v celkové anestezii za použití přípravku Narkamon Spofa v množství odpovídající hmotnosti zvířat a jejich individuální odpovědi. Subjektům jsme nařízli kůži a svalovinu peritonea (cca 2cm) a přemístili varle do peritonea. Jednalo se o pravé varle, levé sloužilo jako kontralaterální kontrola. Na operovaném varleti jsme provedli nastřížení hrotu varlete, a potření tohoto hrotu MDOC™ ve formě gelu LOT7180X. Poté jsme varle vrátili do břišní dutiny. Ránu jsme zašili třemi až čtyřmi stehy Cut-gut. Jeden potkan podstoupil pouze slepou operaci, která spočívala v rozříznutí kůže a svaloviny peritonea, přesunu varlete do peritonea a jeho opětovné navrácení do skrota.

3. 2. Odběr

Nejprve jsme zvířata zvážili. Poté jsme je usmrtili v exsikátoru přípravkem Ether pro narcosi. Po jejich otevření jsme odebrali varlata a nadvarlata. Varlata jsme změřili s přesností na milimetry. Odběr proběhl 8. 12. 2008.

3. 3. Zpracování materiálu

Materiál jsme zpracovali standardní metodou pro histologickou analýzu světelnou mikroskopií. Při tomto experimentu bylo na preparáty použito barvení Hematoxylin-eozin (HE) a Zelený trichrom (ZT). Nově byla použita metoda polosilných řezů.

3. 3. 1. Příprava epoxidových pryskyřic a barvení polosilných řezů

Pryskyřice: EPON – DURKUPAN

EPON 812.....	2,5 ml (1 dávka).....	5 ml (2 dávky)
D modrý.....	5,5 ml.....	11 ml
D červený.....	1,5 ml.....	3 ml
D žlutý.....	0,2 ml.....	0,4 ml
D zelený... pohyblivá složka podle vlhkosti vzduchu v boxu*		

* 0,1 až 0,35 na 1 dávku.

Příprava musí probíhat v digestoři, za použití gumových rukavic a při vlhkosti vzduchu maximálně 60%. Na jeden vzorek tkáně je potřeba 5 ml pryskyřice.

Barvení polosilných řezů:

Barvicí roztok (TP) sestává ze 40 ml 1% toluidinové modři, dále z 10 ml 1% pyroninu a z 30 ml redestilované vody. Roztok musí být několik dnů odstátý, před použitím nutno zfiltrvat.

Na řezy napnuté na podložním sklíčku nakapeme barvicí roztok. Žiháme nad plamenem 10 až 20 sekund, pak slijeme a opláchneme. Pak nakapeme na řezy 50% ethanol a necháme diferencovat, opláchneme. Osušené sklíčko zamontujeme.

3. 4. Hodnocení preparátů

Provedli jsme histologické vyhodnocení řezů za pomoci mikroskopu Olympus AX 70, kamery Pixelink PL-A642 a programu NIS-Elements AR 2.30.

4. Výsledky

4. 1. Makroskopické hodnocení.

Naměřené hodnoty hmotností pokusných zvířat a rozměr jejich operovaných varlat se po dvanáctidenním pokusu příliš neliší od kontroly. Zaznamenali jsme jen mírný pokles délky operovaných varlat některých potkanů v porovnání s kontralaterálními varlaty a s varlaty slepě operovaného potkana. Je třeba mít na zřeteli interindividuální rozdíly. Nalezli jsme hematomy na hrotu varlete a srůsty. Podrobněji viz tabulka 2.

4. 2. Histologické hodnocení.

Při hodnocení mikroskopických preparátů vzorků odebraných z našeho pokusu jsme se zaměřili zejména na zánětlivé změny testikulární tkáně. Všimli jsme si počtu a typů buněk, které souvisejí se zánětlivým poškozením a v neposlední řadě jsme také hodnotili degenerativní změny. (Výsledky jsme nakonec porovnali s těmi, které jsme odečetli v minulé práci týkající se aplikace MDOCTM při experimentálně navozeném kryptorchismu⁷⁷. Fotodokumentace z obou experimentů viz. Obrazová příloha.)

Na preparátu varlete kontrolního zvířete jsme pozorovali normální spermatogenezi v různých stádiích cyklu zárodečného epitelu. Intersticiium je v kontaktu s kanálky a není edematózní. Obr. 1.

Preparáty pocházející od zvířat, kterým byla aplikována MDOCTM ve formě gelu ukazovaly různé stupně degenerace zárodečného epitelu a různé stupně infiltrace buňkami IS.

Na Obr. 2 můžeme vidět intersticiium bez zánětlivé infiltrace, je edematózní. Semenotvorné kanálky trpí výraznou poruchou vyžrávání zárodečných buněk. Je zde mnoho degenerujících a non-dysjunkčních forem vývojové řady zárodečných buněk (mnohojaderné buňky, apoptotické buňky, shluky eozinofilního materiálu).

V dalším preparátu jsme pozorovali masivní infiltraci intersticia buňkami IS, která byla zapříčiněna chemotaktickým působením MDOCTM. Infiltrace je ložisková, nachází se v apikální části varlete a je koncentrována zejména kolem cévního řečiště. V jejím sousedství jsme zaznamenali rozsáhlou degeneraci zárodečného epitelu kanálků varlete. Zánětlivá infiltrace má chronický charakter, nejsou přítomny neutrofilny, ale zejména lymfocyty a makrofágy. Obr. 3. Na jiných preparátech jsme také pozorovali žírné buňky a rozšíření semenotvorných kanálků.

V místě poškození tunica albuginea (experimentálně roztržením) dochází k vyhřeznutí testikulární tkáně. Je vidět masivní infiltrace tkáně (kulatobuněčný infiltrát) a kompletní destrukce tubulárních struktur. Zánět má chronický aseptický charakter, uvnitř kanálků je nekrotická tkáň (eosinofilní – červeně zbarvená). Obr. 4.

Díky preparátům zhotoveným jako polosilné řezy jsme doplnili celkový obraz změn zárodečného epitelu po testikulárním poškození a aplikaci MDOCTM o další

elementy monocyto-fagocytárního systému. Jedná se o mnohojaderné buňky Langhansova typu. Vyskytovaly se zejména v centrální části infiltrátů. Obr. 5.

Makrofágy, které se dostaly do nitra tubulů, obsahují lipidový pigment jako důsledek fagocytární činnosti. Obr. 6.

Ve vzdálenějších partiích od porušené tuniky jsme pozorovali početnou populaci makrofágů, která se v nepoškozeném varleti nevyskytuje. Makrofágy nesly známky fagocytární činnosti, což se na řezech projevilo jako bílé bubliny uvnitř MF. Obr. 7.

Při zkoumání preparátů nadvarlat pocházejících od poškozených testes jsme zaznamenali rozdílné obrazy. Buď byla jejich lumen téměř prázdná (Obr. 8), což svědčí o těžké poruše spermatogeneze, nebo měla v lumen kromě zralých spermií ještě nezralé buněčné elementy, což svědčí o mírnější poruše.

5. Diskuze

MDOCTM coby mikrodispergovaná sodno-vápenatá sůl kyseliny polyanhydroglukuronové je oxidovaným derivátem celulózy. Patří tedy do velké rodiny β -glukanů. Mnohé z β -glukanů mají významné imunomodulační vlastnosti a kurativní potenciál. Je jistě přínosné hledat paralely mezi účinky MDOCTM a dalšími β -glukany a jejich deriváty.

Nativní β -glukany izolované například z hub nebo mořských řas stimulují imunitu v boji proti četným onemocněním (bakteriální, virová, mykotická, parazitární, nádorová).^{44, 45, 46}

Jejich účinek je nejvíce vyjádřen stimulací fagocytů, hlavně makrofágů. Mechanismem je interakce β -glukanů s jejich receptory. Přes makrofágy dochází ke stimulaci B a T lymfocytů. β -glukany také přímo aktivují NK buňky. Takto stimulovaná imunita pak dokáže bojovat proti přítomným antigenům.^{44,45,47}

Jako další účinky β -glukanů jsou uváděny: snížení hladiny krevní glukózy a cholesterolu, zlepšení funkcí GIT či hojení ran.^{44,45}

Oxidované β -glukany mají dnes své nezastupitelné místo v chirurgii. Cross a kol. demonstrovali imunostimulační vlastnosti (na T a B lymfocytech) u oxidovaného β -glukanu z kvasinek.⁴⁹

Oxidovaná celulóza je široce používána jako místní hemostatikum. Je biologicky vstřebatelná, má antimikrobní účinek a schopnost vychytávat volné radikály. Dále se používá k prevenci postoperačních adhezí a v léčbě ran.^{51, 52, 53}

Spangler a kol. popisují antimikrobní aktivitu oxidované celulózy in vitro proti ATB rezistentním bakteriím⁵⁸.

Jelínková a kol. zkoumali imunomodulační vlastnosti MDOCTM in vivo a in vitro. Zjistili stimulaci proliferace lidských leukocytů a myších splenocytů in vitro a jejich produkci TNF- α . U myši in vivo měla MDOCTM stimulační efekt na buňky kostní dřeně, krevní monocyty a lymfocyty B.⁵⁰

Tnf- α stimuluje ve varleti tvorbu prozánětlivých IL-1, IL6, ICAM-1 a VCAM-1.^{3,35}

V našem experimentu jsme po dvanáctidenním pokusu s aplikací MDOCTM ve formě gelu potkanům našli degenerativní změny testikulární tkáně a její zánětlivou infiltraci buňkami IS. Infiltrace je ložisková s lokalizací hlavně kolem cévního řečiště v apikální části varlete a účastní se jí zejména lymfocyty a makrofágy. Nalezli jsme také mastocyty a mnohojaderné buňky Langhansova typu.

V místě, kde došlo k vyhřeznutí testikulární tkáně vně tunica albuginea, jsme zaznamenali masivní infiltraci buňkami IS a kompletní destrukci semenotvorných kanálků.

V naší minulé práci jsme aplikaci MDOCTM (intratestikulárně) skombinovali s navozením experimentálního kryptorchismu. Kryptorchismus byl navozen přestřihnutím gubernakula. V mikroskopických preparátech jsme našli výrazně více makrofágů, než je obvyklé při kryptorchismu samotném. Dále jsme pozorovali ložisko (granulom) populace MF těsně pod tunica albuginea, kde se nacházely i lymfocyty. (Obr. 12)⁷⁸

Tato pozorování vedou k závěru, že MDOCTM s vysokou pravděpodobností působí chemotakticky na buňky IS.

Makrofágy zaujímají až 25% ze všech intersticiálních buněk varlete a jsou esenciální pro normální funkce testes. Při experimentálním zánětu varlat jsou populace makrofágů markantně zvětšeny.^{9,17}

U mužů trpících “Sertoli cell only” a “germ cell arrest” syndromem vzrostl dle studie Frungieri a kol. počet testikulárních makrofágů dvojnásobně. U všech sledovaných neplodných mužů byl zaznamenán posun TMF z intersticia směrem do lumen kanálků.²⁷

Lymfocyty B se ve varleti vyskytují pouze při zánětu. Na druhou stranu lymfocyty T se vyskytují ve varlatech potkanů i člověka fyziologicky. U neplodných mužů bylo prokázáno zvýšení počtu lymfocytů T.^{5,8}

Fijak a kol. zjistili desetinásobné zvýšení počtu mastocytů v intersticiu při experimentálním zánětu varlat u potkana.³²

Poškození varlete můžeme zkoumat z hlediska různých parametrů (hormonální, histologické, histochemické, aj.) na řadě experimentálních modelů.

Během experimentálního kryptorchismu dochází ke ztrátě zárodečných buněk apoptózou a uvolňováním nezralých ZB do lumen kanálků. Objevují se mnohojaderné spermatidy, intercelulární můstky, vakuolizace zárodečného epitelu, lipidické kapénky v SB. Hematotestikulární bariéra je porušena. Snižuje se průměr semenotvorných kanálků a hmotnost varlete.^{64,66}

Srinivas popisuje výrazné snížení počtu haploidních buněk u experimentálního poranění varlete potkana tupým předmětem.⁶⁹

Özka a kol. hovoří o snížení Johnsova skóre při tupém i tržném poranění varlete u potkana.⁷⁰

V našem předchozím experimentu s aplikací MDOCTM za podmínek experimentálního kryptorchismu (přestřížení gubernakula) jsme zaznamenali mnoho degenerativních změn (Obr 9 až 14). Pro ně hovoří už samotná redukce hmotnosti a délky operovaných varlat. U délky byla zjištěna redukce o 22,4%, u hmotnosti o 52,6%. Po sedmidenním kryptorchismu jsme pozorovali jak téměř prázdné semenotvorné kanálky, tak ty, které vykazovaly degenerovaná stádia zárodečných buněk. Degenerace se projevila pyknózou jader a rozpadem (apoptóza), silnou eozinofilií cytoplazmy, formací mnohjaderných buněk. Také jsme našli kanálek s kompletně desintegrovanou stavbou, kde nebyla zachována ani těla Sertoliho buněk.⁷⁸

V této práci nebylo potkanům přestříženo gubernakulum, varle tedy mohlo z dutiny břišní sestoupit do skrota a vliv teploty je tedy diskutabilní. Mírnější vliv teploty naznačuje i nižší úbytek délky varlat v porovnání s naším předchozím experimentem. Semenotvorné kanálky vykazovaly na histologických preparátech degenerativní změny. Jednalo se o přítomnost apoptotických a mnohjaderných buněk, či shluky eozinofilního materiálu.

Jak je zmíněno výše, MDOCTM je pravděpodobně látkou, která působí chemotakticky na buňky IS. Obraz změn na zárodečném epitelu, jak jsme jej pozorovali v této práci je odlišný od změn nalezených v experimentu předchozím. To je dáno rozdílnými podmínkami experimentů. Další práce na tomto poli by mohly odhalit, jak

jsou degenerativní změny zárodečného epitelu závislé na aplikační formě MDOCTM a způsobu jejího podání.

6. Závěr

1. Sledovali jsme účinky MDOCTM na testikulární tkáň potkana Wistar. K dispozici jsme měli pět zvířat, která byla chována za standardních podmínek ve viváriu FaF UK. Operovaní jedinci podstoupili přemístění pravého varlete do břišní dutiny, nastříhnutí jeho hrotu a potření MDOCTM ve formě gelu. Levé varle sloužilo jako kontralaterální kontrola. Pátý potkan byl slepě operován a sloužil jako kontrola.
2. Dvanáctý den byla zvířata usmrcena, byla odebrána varlata spolu s nadvarlaty, změřena a zpracována standardní metodou pro histologickou analýzu světelnou mikroskopií. Na hrotu operovaných varlat jsme našli hematomy a srůsty. Zaznamenali jsme jen mírný pokles délky operovaných varlat v porovnání s kontrolami.
3. Histologické preparáty odhalily v porovnání s kontrolou významnou poruchu spermatogeneze, projevující se jak apoptotickými, tak mnohojadenými zárodečnými buňkami v semenotvorných kanálcích. Kanálky nadvarlat byly buď prázdné, nebo obsahovaly nezralé zárodečné buňky. Na preparátech se objevily početné populace testikulárních makrofágů nesoucí známky fagocytární činnosti. V apikální části varlete byla nalezena masivní infiltrace buňkami imunitního systému, která měla charakter chronického zánětu. V místě, kde se testikulární tkáň dostala za tunica albuginea, došlo k destrukci semenotvorných kanálků. V operovaných varlatech se také objevily buňky Langhansova typu.

4. MDOCTM ve formě gelu s vysokou pravděpodobností působí chemotakticky na buňky imunitního systému lymfocyty, mastocyty a buňky monocyt-fagocytárního systému.

7. Přílohy

7. 1. Tabulková příloha

Tabulka 1. Hmotnosti potkanů před operací. 26. 11. 2008.

zvíře	1	2	3	4	5
označení zvířete	H	LP	LZ	PP	PZ
hmotnost zvířete [g]	240	260	260	280	240

Tabulka 2. Hmotnosti potkanů po operaci a makroskopické hodnocení odebrané tkáně. 8. 12. 2008

zvíře	1	2	3	4	5(kontrola)
označení zvířete	H	LP	LZ	PP	PZ
hmotnost zvířete [g]	340	300	360	380	320
délka varlete operované [mm]	17	20	16	18	20
délka varlete kontrolní [mm]	21	20	20	21	20
nález	rána zhojena, hematom na hrotu varlete	rána zhojena, přirostlá hrana varlete	velký hematom na hrotu varlete, varle přirostlé	hematom, srůst vaziva	-----

Tabulka 3. Hmotnosti zvířat před navozením experimentálního kryptorchismu. 8. 11. 2005⁷⁸.

zvíře	1	2	3	4	5
označení zvířete	H	LP(kontrola)	PP	PZ	LZ
hmotnost zvířete [g]	385	395	335	395	375

Tabulka 4. Hmotnosti zvířat a makroskopické hodnocení odebrané tkáně po sedmi-denním experimentálním kryptorchismu. 15. 11. 2005⁷⁸.

zvíře	1	2	3	4	5
označení zvířete	H(uhynul)	LP(kontrola)	PP	PZ	LZ
hmotnost zvířete [g]	---	333	390	401	365
hmotnost kryptor chického varlete [g]	---	---	0,8	1,1	0,8
hmotnost skrotálního varlete [g]	---	1,6	1,8	1,9	1,6
délka kryptor chického varlete [mm]	---	---	19	18	18
délka skrotálního varlete [mm]	---	23	23	25	23

7. 2. Obrazová příloha

Seznam obrázků

Obrázek 1 Slepě operovaná kontrola, varle, ZT, zvětšeno 100x.

Obrázek 2 MDOC™ + poranění, varle, ZT, zvětšeno 100x.

Obrázek 3 MDOC™ + poranění, varle, HE, zvětšeno 200x.

Obrázek 4 MDOC™ + poranění, varle, HE, zvětšeno 100x.

Obrázek 5 MDOC™ + poranění, varle, TP, zvětšeno 200x.

Obrázek 6 MDOC™ + poranění, varle, TP, zvětšeno 400x.

Obrázek 7 MDOC™ + poranění, varle, TP, zvětšeno 400x.

Obrázek 8 MDOC™ + poranění, nadvarle, ZT, zvětšeno 100x.

Obrázek 9 Kryptorchismus 7 dnů, varle, HE, zvětšeno 200x⁷⁸.

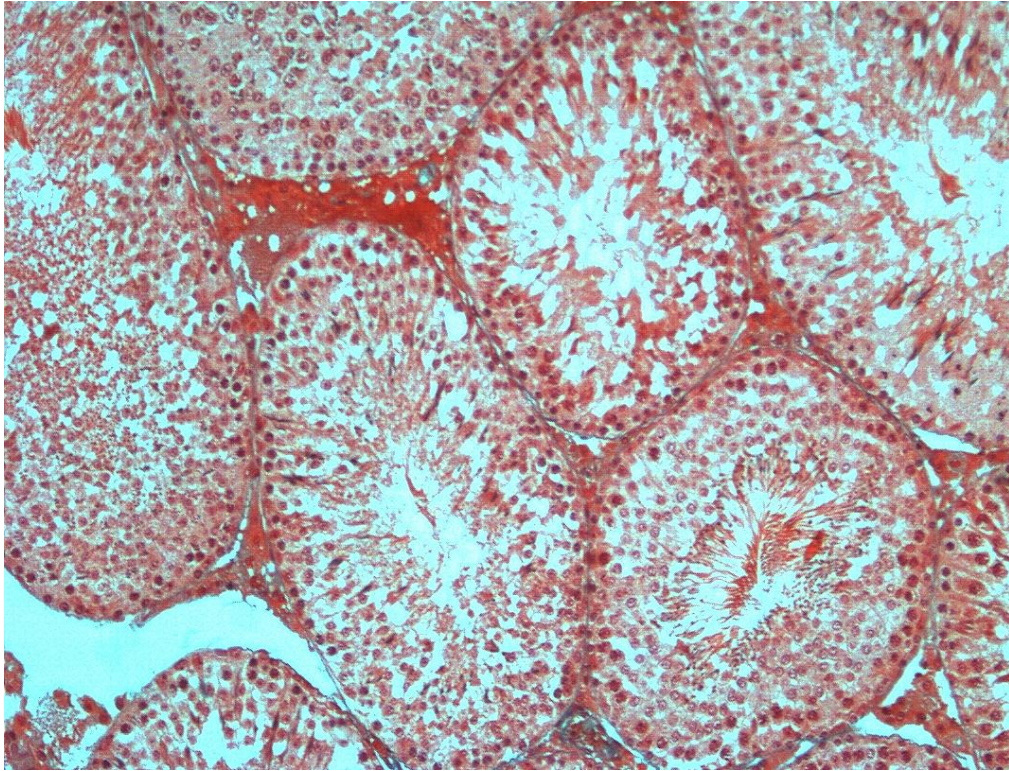
Obrázek 10 Kryptorchismus 7 dnů, varle, ZT, zvětšeno 400x⁷⁸.

Obrázek 11 Kryptorchismus 7 dnů, varle, ZT, zvětšeno 200x⁷⁸.

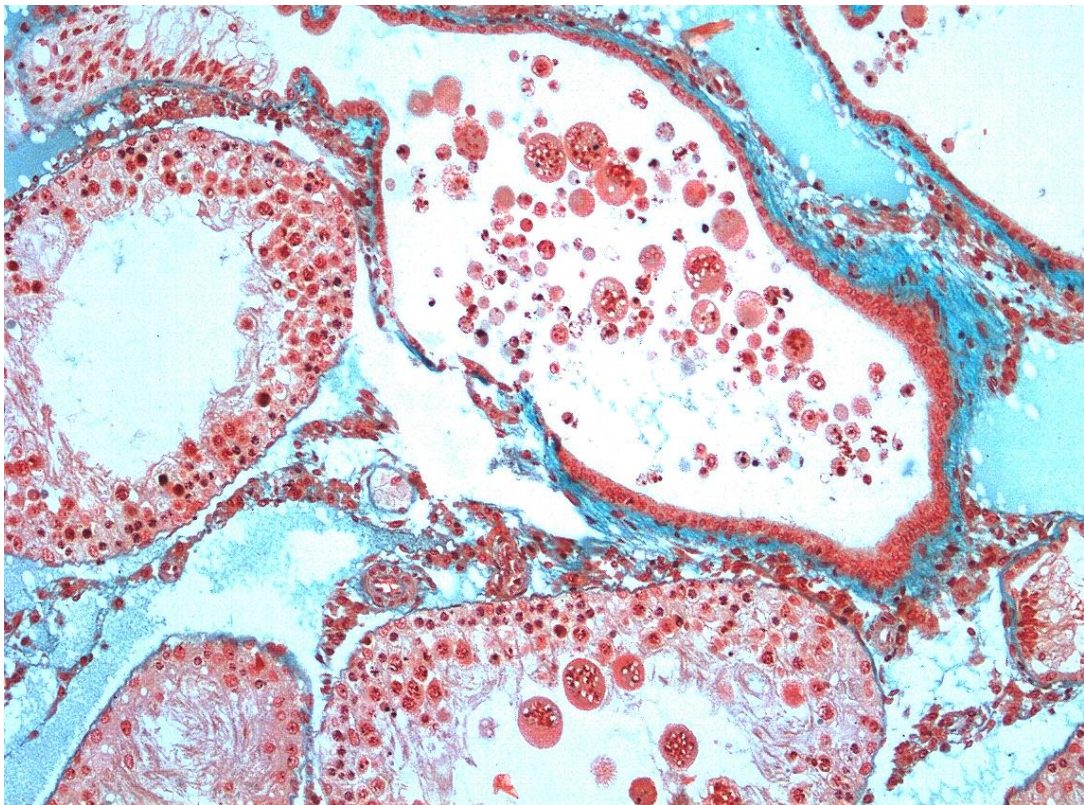
Obrázek 12 Kryptorchismus 7 dnů, varle, HE, zvětšeno 400x⁷⁸.

Obrázek 13 Kryptorchismus 7 dnů, varle, HE, zvětšeno 200x⁷⁸.

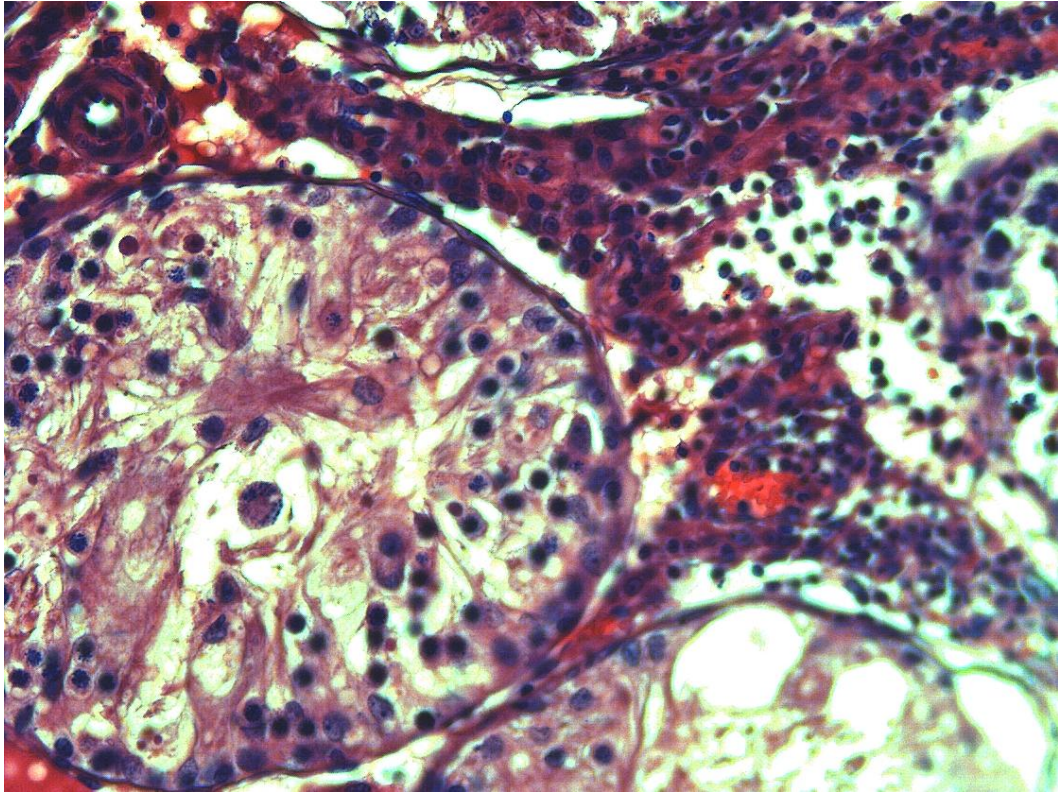
Obrázek 14 Kryptorchismus 24 hodin, nadvarle, ZT, zvětšeno 200x⁷⁸.



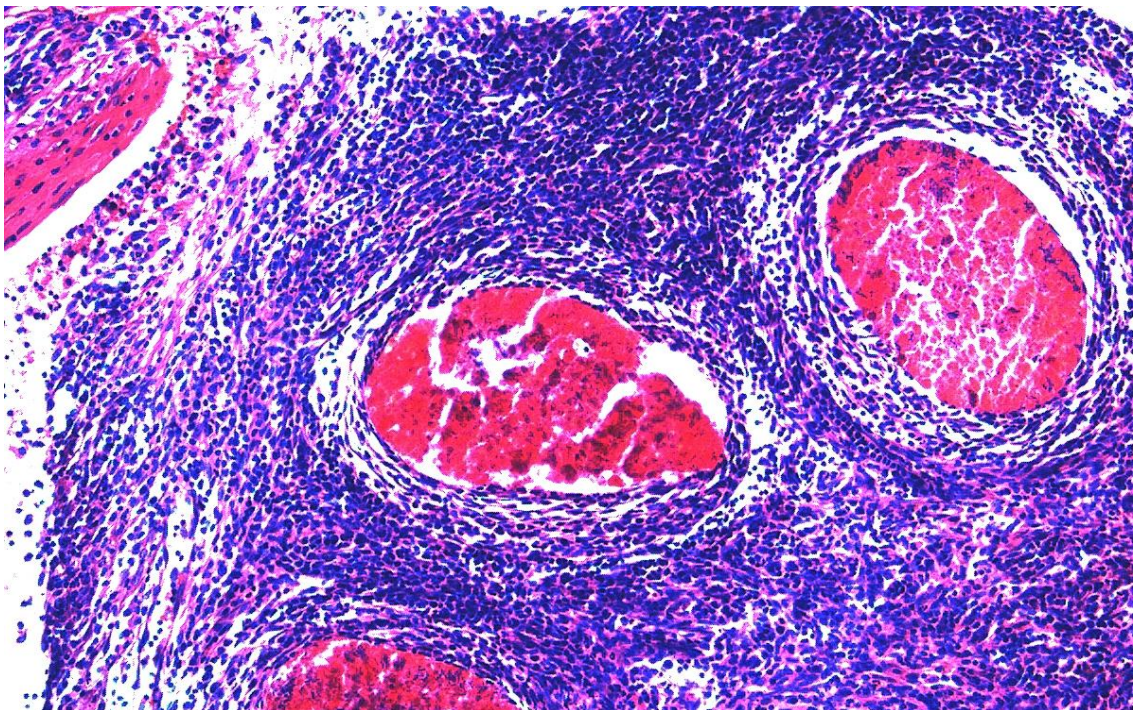
Obrázek 1. Varle, slepě operovaná kontrola. ZT, zvětšeno 100x. Probíhá normální spermatogeneze v různých stádiích zárodečného epitelu.



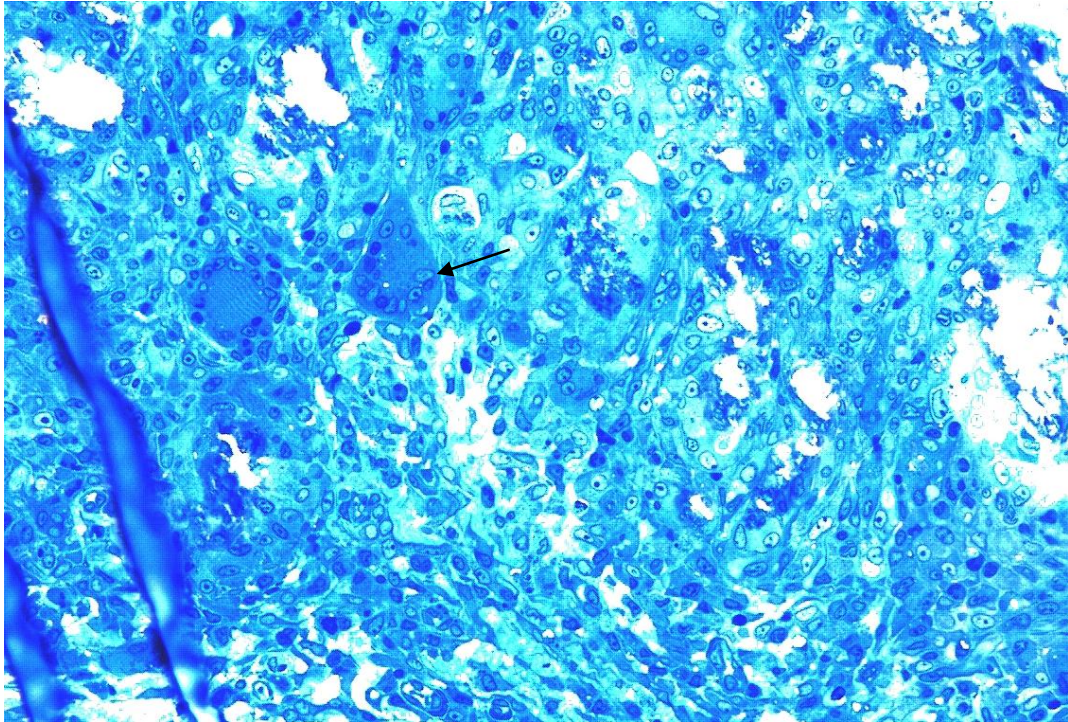
Obrázek 2. Varle, MDOCTM + poranění. ZT, zvětšeno 100x. Porucha vyzrání ZB.



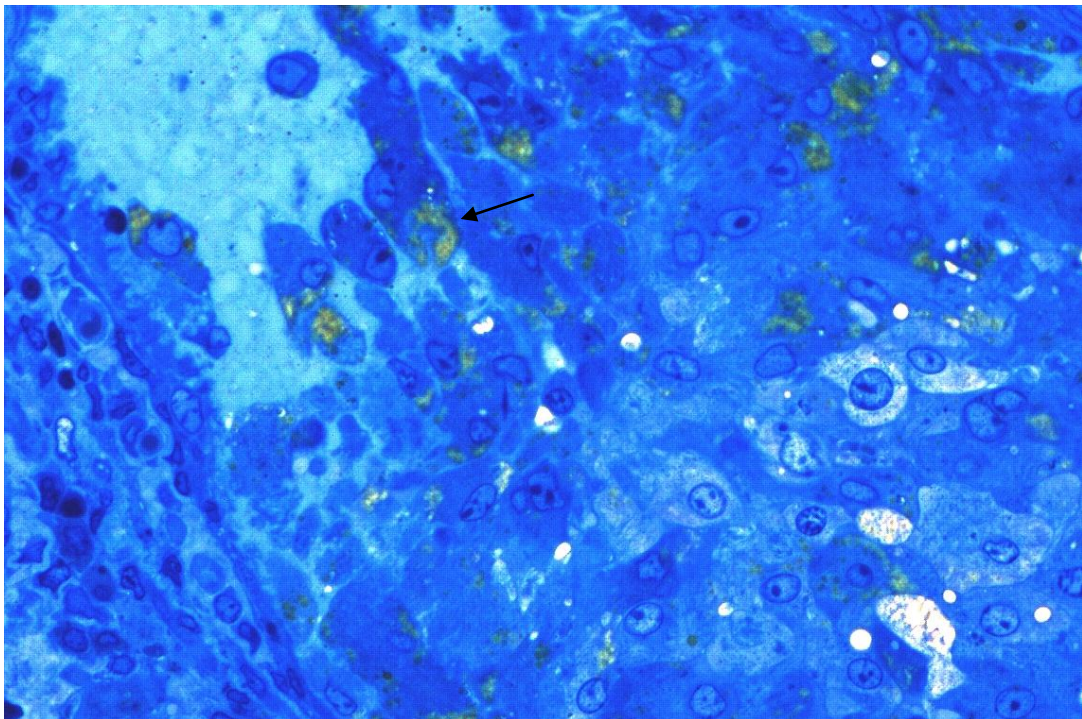
Obrázek 3. Varle, MDOC™ + poranění. HE, zvětšeno 200x. Degenerace zárodečného epitelu a infiltrace intersticia.



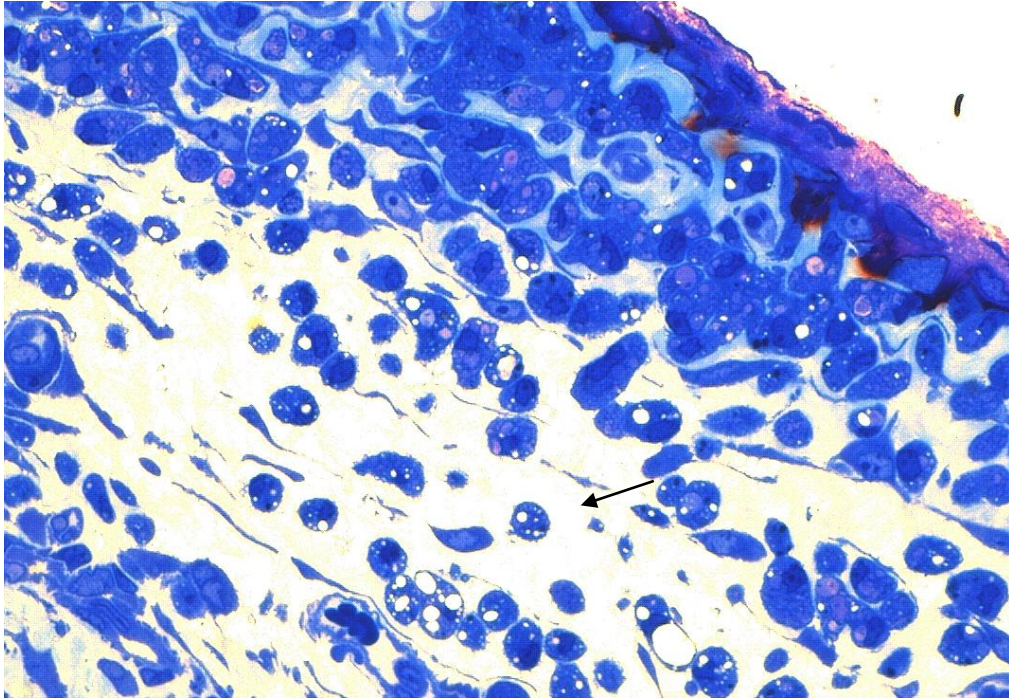
Obrázek 4. Varle, MDOC™ + poranění. HE, zvětšeno 100x. Masivní infiltrace buňkami IS, nekróza kanálků. Vlevo nahoře tunica albuginea.



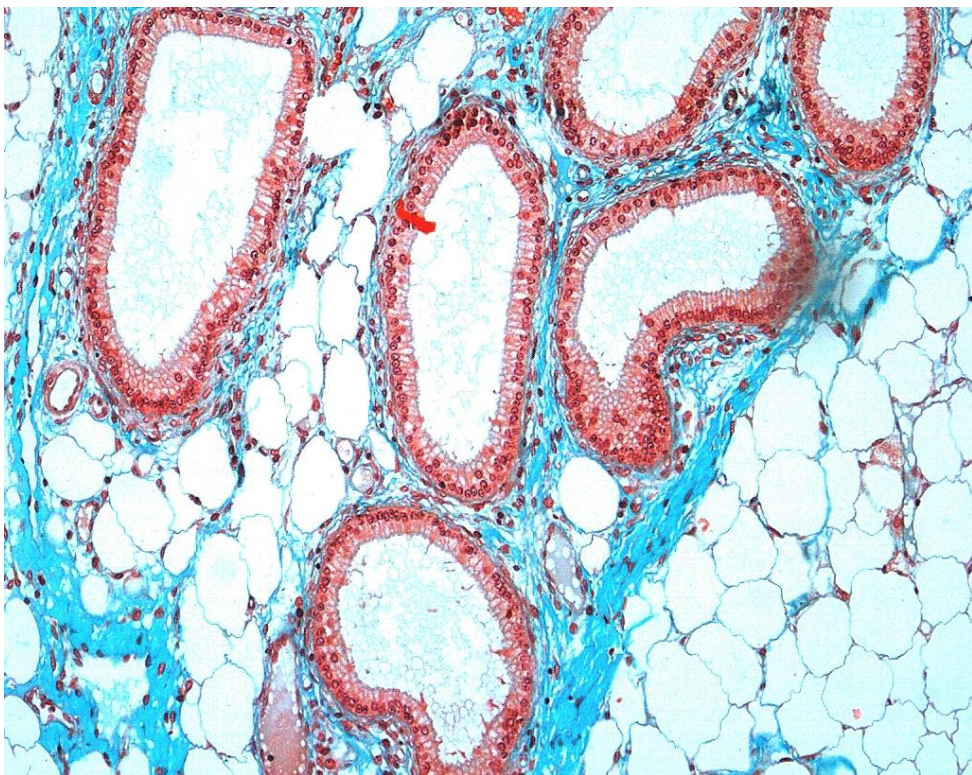
Obrázek 5. Varle, MDOCTM + poranění. TP, zvětšeno 200x. Zde pozorujeme mnohojaderné buňky Langhansova typu.



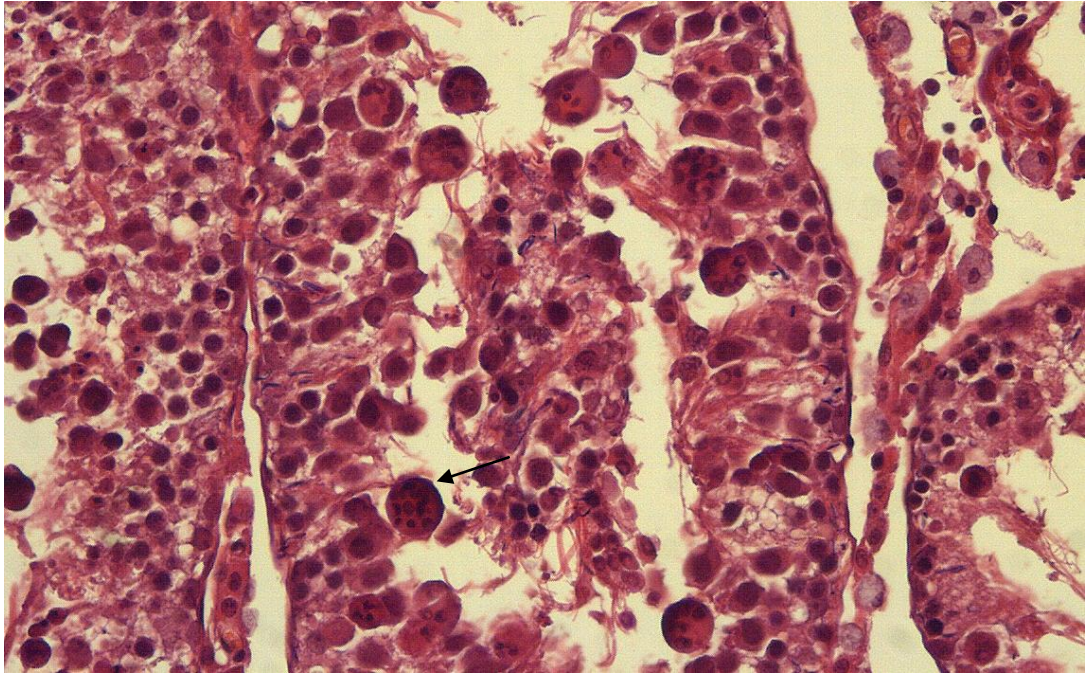
Obrázek 6. Varle, MDOCTM + poranění. TP, zvětšeno 400x. Patrné jsou makrofágy s fagocytovaným lipidovým materiálem.



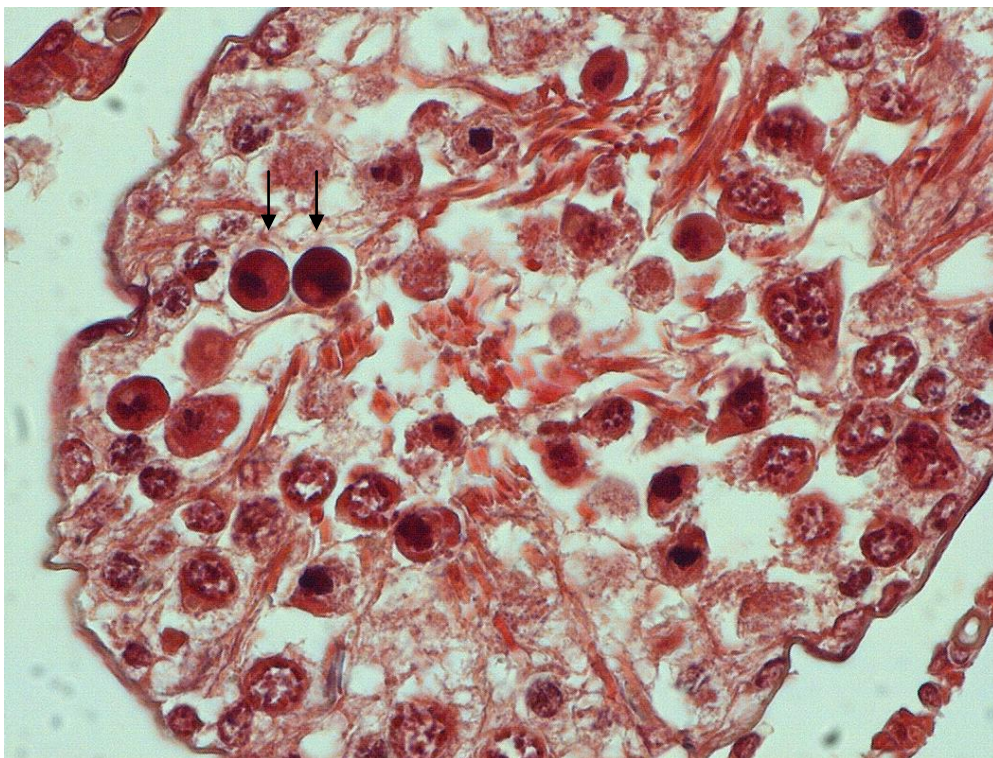
Obrázek 7. Varle, MDOCTM + poranění. TP, zvětšeno 400x. Velký počet MF pod tunica albuginea.



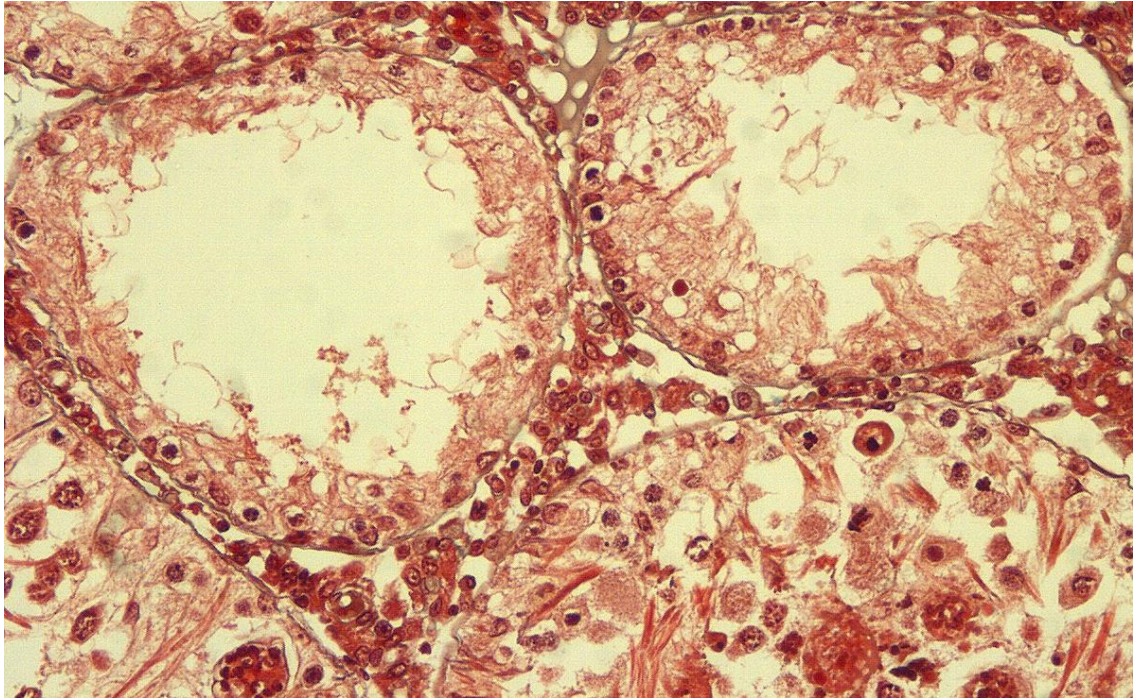
Obrázek 8. Nadvarle, MDOCTM + poranění. ZT, zvětšeno 100x. Kanálky nadvarlete bez zárodečných buněk.



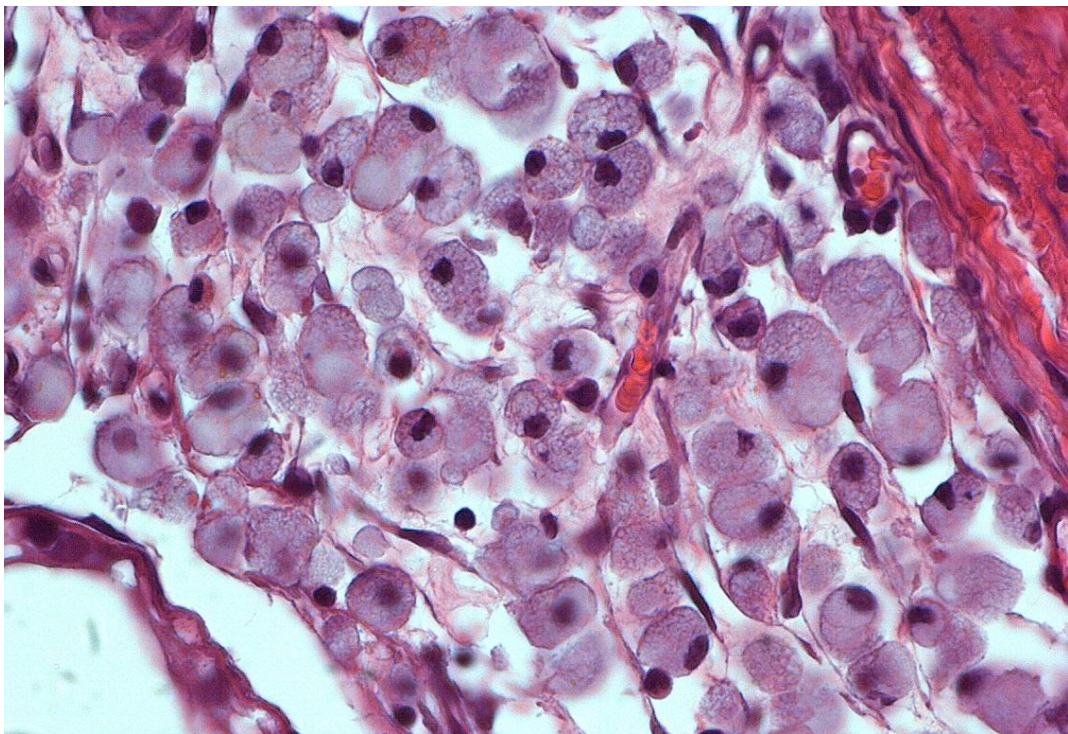
Obrázek 9. Varle, kryptorchismus 7 dnů. HE, zvětšeno 200x. Degenerace tubulu s velkým počtem mnohojaderných buněk.



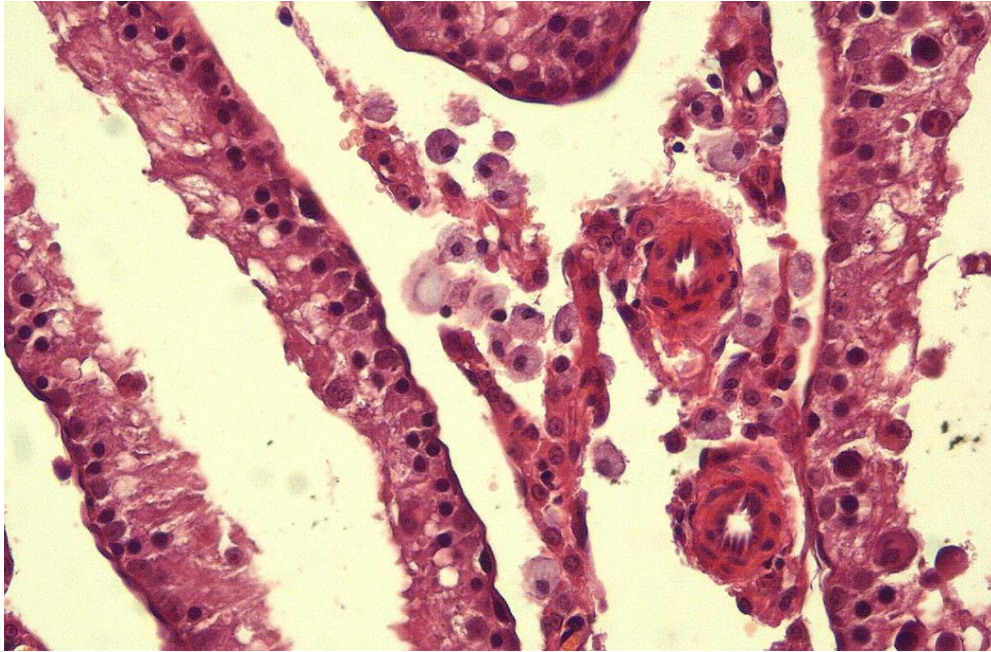
Obrázek 10. Varle, kryptorchismus 7 dnů. ZT, zvětšeno 400x. Apoptotické buňky



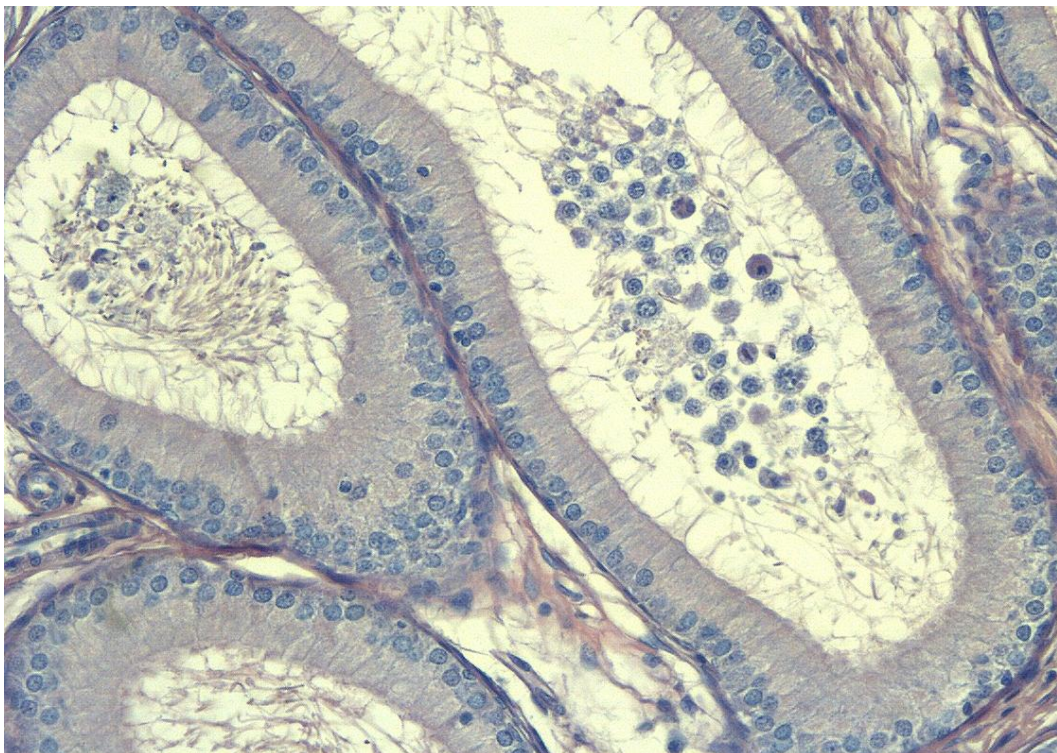
Obrázek 11. Varle, kryptorchismus 7 dnů. ZT, zvětšeno 200x. Výrazně barveny Sertoliho buňky v degenerovaném kanálku.



Obrázek 12. Varle, kryptorchismus 7 dnů. HE, zvětšeno 400x. Infiltrace makrofágy pod tunica albuginea.



Obrázek 13. Varle, kryptorchismus 7 dnů. HE, zvětšeno 200x. Populace makrofágů v intersticiu.



Obrázek 14. Nadvarle, kryptorchismus 24 hodin. ZT, zvětšeno 200x. Nezralé zárodečné buňky v lumen kanálku.

8. Literatura

1. Fijak, M., Meinhardt, A.: The testis in immune privilege. *Immunol Rev.*, Vol. 213, 2006, s. 66-81.
2. Schuppe, H., Meinhardt, A.: Immune privilege and inflammation of the testis. *Immunology of gametes and embryo implantation. Chem Immunol Allergy.*, Vol. 88, 2005, s. 1-14.
3. Filippini, A., Riccioli A., Padula, F., Lauretti, P., D'Alessio, A., Cesaris, P., Gandini, L., Lenzi, A., Ziparo, E.: Immunology and immunopathology of the male genital tract – Control and impairment of immune privilege in the testis and in semen. *Human reproduction update*, Vol. 7, 2001, s. 444-449.
4. Ziparo, E., Riccioli, A., Giampietri, C., Starace, D., Secco, V., Paone, A., Galli, R.: Molecular mechanisms regulating the immune response in the testis: a balance between immune privilege, tissue homeostasis and autoimmune disorders. www.istitutopasteur.it/userfiles/file/abstract_ziparo.pdf, 30. 3. 2008.
5. Testicular immunology, http://en.wikipedia.org/wiki/Testicular_immunology, 1. 2. 2008.
6. Alessio, A., Riccioli, A., Lauretti, P., Padula, F., Muciaccia, B., Cesaris, P., Filippini, A., Ziparo, E.: Testicular fasl is expressed by sperm cells. *PNAS*, Vol. 98, 2001, s. 3316-3321.
7. Nouza, K., Madar, J., Nováková, D.: Imuologie a imunopatologie mužského a ženského pohlavního systému, http://www.zdrava-rodina.cz/med/med0500/med0500_32.html, 24. 5. 2000.
8. Tompkins, A., Hutchinson, P., Kretser, D., Hedger, M.: Characterization of lymphocytes in the adult rat testis by flow cytometry: Effects of activin and transforming growth factor β on lymphocyte subsets in vitro. *Biology of reproduction*, Vol. 58, 1998, s. 943-951.

9. Hutson, J.: Physiologic interactions between macrophages and leydig cells. *Exp biol med*, Vol. 231, 2006, s. 1-7.
10. Hedger, M.: Testicular leukocytes: what are they doing? *Reviews of reproduction*, Vol. 2, 1997, s. 38-47.
11. Kern, S., Robertson, S., Mau, V., Maddocks, S.: Cytokine secretion by macrophages in the rat testis. *Biology of reproduction*, Vol. 53, 1995, s. 1407-1416.
12. Hutson, J.: Interactions between testicular macrophages and leydig cells. *Journal of andrology*, Vol. 19, 1998, s. 394-397.
13. Miller, S., Bowman, B., Roxland, H.: Structure, cytochemistry, endocytic activity, and immunoglobulin (Fc) receptors of rat testicular interstitial-tissue macrophages. *American journal of anatomy*, Vol. 167, 2005, s. 1-13.
14. Bryniarski, K., Szczepanik, M., Maresz, K., Ptak, M., Ptak, W.: Subpopulations of mouse testicular macrophages and their immunoregulatory function. *Am. J. Reprod. Immunol.*, Vol. 52, 2004, s. 27-35.
15. Hedger, M.: Macrophages and the immune responsiveness of the testis. *Journal of reproductive immunology*, Vol. 57, 2002, s. 19-34.
16. Hales, D.: Testicular macrophage modulation of leydig cell steroidogenesis. *Journal of reproductive immunology*, Vol. 57, 2002, s. 3-18.
17. Fijak, M., Iosub, R., Schneider, E., Linder, M., Respondek, K., Klug, J., Meinhardt.: Identification of immunodominant autoantigens in rat autoimmune orchitis. *J. Pathol.*, Vol. 207, 2005, s.127-37.
18. Gaytan, F., Bellido, C., Aguilar, E., Rooijen, N.: Requirement for testicular macrophages in leydig cell proliferation and differentiation during prepubertal development in rats. *Journal of reproduction and fertility*, Vol. 102, 1994, s. 393-399.

19. Gaytan, F., Bellido, C., Morales, C., Reymundo, C., Aguilar, E., Rooijen, N.: Effects of macrophage depletion at different times after treatment with ethylene dimethane sulfonate (EDS) on the regeneration of leydig cells in the adult rat. *Journal of andrology*, Vol. 15, 1994, s.558-564.
20. Hedger, M., Kretser, D., Schlatt, S.: Mitosis of resident macrophages in the adult rat testis. *Journal of reproduction and fertility*, Vol. 116, 1999, s.223-228.
21. Hedger, M., Meinhardt, A., Bacher, Metz, Ch., Bucala, R., Wreford, N., Lan, H., Atkins, R.: Local regulation of macrophage subsets in the adult rat testis: Examination of the roles of the sominiferous tubules, testosterone and macrophage-megration-inhibitory factor. *Biology of reproduction*, Vol. 59, 1998, s.371-378.
22. Hedger, M., Bryan, M., Paterson, D., Sebire, K., Kretser, D., Gerdprasert, O.: Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage colony-stimulating factor in normal and inflamed rat testis. *Molecular human reproduction*, Vol. 8, 2002, s.518-524.
23. Ziparo, E., Riccioli, A., Starace, D., Galli, R., Fuso, A., Scarpa, S., Palombi, F., Cesaris, P., Filippini, A.: Sertoli cells initiate testicular innate immune responses through TLR activation. *The journal of immunology*, Vol. 117, 2006, s.7122-7130.
24. Bryniarski, K., Szczepanik, M., Ptak, M., Ptak, W.: Modulation of testicular macrophage activity by collagenase. *Folia histochemica et cytobiologica*, Vol. 43, 2005, s-37-41.
25. Gaytan, F., Bellido, C., Romero, J., Morales, C., Reymundo, C., Aguilar, E.: Decreased number and size and the defective function of testicular macrophages in long-term hypophysectomized rats are reversed by treatment with human gonadotrophins. *Journal of endocrinology*, Vol. 140, 1994, s.399-407.

26. Huang, W., Yeh, J., Kan, S., Chang, L., Wang, P.: Role of testicular macrophages in regulating testosterone release in hyperprolactinemia. *Journal of cellular biochemistry*, Vol. 88, 2002, s.766-777.
27. Frungieri, M., Calandra, R., Lustig, L., Meineke, V., Köhn, F., Vogt, H., Mayerhofer, A.: Number, distribution pattern, and identification of macrophages in the testes of infertile men. *Fertility and sterility*, Vol. 78, 2002, s.298-306.
28. Hedger, M., Wang, J., Lan, H., Atkins, R., Wreford, N.: Immunoregulatory activity in adult rat testicular interstitial fluid: Relationship with intratesticular CD8⁺ lymphocytes following treatment with ethane dimethane sulfonate and testosterone implants. *Biology of reproduction*, Vol. 58, 1998, s.935-942.
29. Fijak, M., Rival, C., Lustig, L., Iosub, R., Guazzone, V., Schneider, E., Meinhardt.: Identification of a dendritic cell population in normal testis and in chronically inflamed testis of rats with autoimmune orchitis. *Cell tissue res.*, Vol. 324, 2006, s. 311-318
30. Fijak, M., Meinhardt, A., Rival, C., Guazzone, V., Wulffen, W., Hackstein, H., Schneider, E., Lustig, L.: Expression of costimulatory molecules, chemokine receptors and proinflammatory cytokines in dendritic cells from normal and chronically inflamed rat testis. *Mol. Hum. Reprod.*, Vol. 13, 2007, s. 853-861
31. Rodriguez, M.: Immunohistopathology of the contralateral testis of rats undergoing experimental torsion of the spermatic cord. *Asian Journal of Andrology*, Vol. 8, 2006, s.576-583.
32. Fijak, M., Iosub, R., Klug, J., Schneider, E., Frölich, S., Blumbach, K., Wennemuth, G., Sommerhoff, C., Steinhoff, M., Meinhardt, A.: Development of testicular inflammation in the rat involves activation of proteinase-activated receptor-2. *Pathol.*, Vol. 208, 2006, s. 686-698.

33. Roaiah, M., Khatab, H., Mostafa, T.: Mast cells in testicular biopsies of azoospermic men. *Andrologia.*, Vol. 39, 2007, s.185-189.
34. Huleihel, M., Lunenfeld, E.: Regulation of spermatogenesis by paracrine/autocrine testicular factors. *Asian J Androl*, Vol. 6, 2004, s.295-268.
35. Petersen, C.: Paracrine regulation of Sertoli cell proliferation. Karolinska University Press, ISBN 91-7349-443, 2003, s.5-9.
36. Lysiak, J.: The role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 in the mammalian testis and their involvement in testicular torsion and autoimmune orchitis. *Reproductive Biology and Endocrinology*, Vol. 2, 2004,
37. Li, M., Xia, W., Mruk, D., Wang, C., Yan, H., Siu, M., Lui, W., Lee, W., Cheng, C.: Tumor necrosis factor α reversibly disrupts the blood-testis barrier and impair Sertoli-germ cell adhesion in the seminiferous epithelium of adult rat testes. *Journal of Endocrinology*, Vol. 190, 2006, s. 313-329.
38. Kanzaki, M., Morris, P.: Identification and regulation of testicular interferon- γ (IFN- γ) receptor subunits: IFN- γ enhances interferon regulatory factor-1 and interleukin-1 β converting enzyme expression. *Endocrinology*, Vol. 139, 1998, s. 2636-2644.
39. Ziparo, E., Riccioli, A., Filippini, A., Cesaris, P., Barbacci, E., Stefanini, M., Starace, G.: Inflammatory mediators increase surface expression of integrin ligands, adhesion to lymphocytes and secretion of interleukin 6 in mouse Sertoli cells. *Proceedings of the national academy of sciences of the USA*, Vol. 92, 1995, s. 5808-5812.
40. Hedger, M., O'Bryan, M., Gerdprasert, O., Nikolic-Paterson, D., Meinhardt, A., Muir, J., Foulds, L., Phillips, D., Kretsef, D.: Cytokine profiles in the testes of rats treated with lipopolysaccharide reveal localized suppression of inflammatory responses. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, Vol. 288, 2005, s. 1744-1755.

41. Yan, H., Mruk, D., Lee, W., Cheng, Y.: Blood-testis barrier dynamics are regulated by testosterone and cytokines via their differential effects on the kinetics of protein endocytosis and recycling in Sertoli cells. *Faseb J.*, Vol. 22, 2008, s. 1945- 1959.
42. Hedger, M., Kretser, D., Okuma, Y., Saito, K., O'Connor, A., Phillips, D.: Reciprocal regulation of activin A and inhibin B by interleukin-1 (IL-1) and follicle-stimulating hormone (FSH) in rat Sertoli cells in vitro. *Journal of Endocrinology*, Vol 185, 2005, s. 99-110.
43. Hedger, M., Meinhardt, A., Bacher, M., O'Bryan, M., McFarlane, J., Mallidis, C., Lehman, CH., Metz, N., Kretser, D., Bucala, R.: A switch in the cellular localization of macrophage migration inhibitory factor in the rat testis after ethane dimethane sulfonate treatment. *Journal of Cell Science*, Vol. 112, 1999, s. 1337-1344.
44. Novák, M.: β -glukany, historie a současnost. *Chem. Listy*, Vol 101, 2007, s. 872-880.
45. Chovancová, A., Šturdík, E.: Vplyv beta-glukánov na imunitný systém človeka. *Nova Biotechnologica V-I*, 2005, s. 105-118.
46. Gallusová, J., Sovová, M., Jahodář, L.: Imunomodulancia přírodního původu, *Solutio* 2004/2005, <http://www.medon-solutio.cz/online2005/index.php?linkID=txt2&lang=1>, 2005.
47. Volný, T.: imunomodulace a nutriční doplňky, <http://www.edukafarm.cz/clanek.php?id=543>, 29. 12. 2005
48. Tzianabos, A.: Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 13, 2000, s. 523-533.

49. Cross, G., Jennings, J., Whitfield, M., Penney, L., Zacharie, B., Gagnon, L.: Immunostimulant oxidized beta-glucan conjugates. *Int Immunopharmacol.*, Vol. 1, 2001, s. 539-550.
50. Jelínková, M., Briestenský, J., Santar, I., Říhová, B.: In vitro and in vivo immunomodulatory effects of microdispersed oxidized cellulose. *International Immunopharmacology*, Vol. 2, 2002, 1429-1441.
51. Víte co je lokální hemosatikum?, http://www.jnjcz.cz/file/pdf/tisk/e-letter/0707_fuze_obratlu_vs.nechtene_srusty.pdf, 2007, staženo 23. 4. 2008
52. Němec, L., Skříčka, T.: Principy lokální hemostázy v chirurgii, <http://www.strategie.cz/scripts/detail.php?id=274019>, 1. 10. 2006, staženo 23. 4. 2008
53. Novotný, T.: „Ranhojiči“ zaznamenali zvýšený zájem o obor, <http://www.medical-tribune.cz/archiv/mtr/181/5042>, 25. 2. 2008,
54. Gago, L., Saed, G., Elhammady, E., Diamond, M.: Effect of oxidized regenerated cellulose (Interceed®) on expression of tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in human peritoneal fibroblasts and mesothelial cells. *Fertility and sterility*, Vol. 86, 2006, s. 1223-1227.
55. Mais, V., Ajossa, S., Piras, B., Guerriero, S., Marongiu, D., Melis.: Prevention of do-novo adhesion formation after laparoscopic myomectomy: a randomized trial to evaluate the effectiveness of an oxidized regenerated cellulose absorbable barrier. *Hum reprod.*, Vol. 10, 1995, 3133-3135.
56. Ates, U., Ata, B., Ortakuz, S., Seyhan, A., Urman, B.: Prevention of adhesion formation following ovarian surgery in a standardized animal model: Comparative study of Interceed and double layer Surgicell, *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, Vol. 34, 2008, s. 12-17.

57. Nishimura, K., Bieniarz, A., Nakamura, R., diZerega, G.: Evaluation of oxidized regenerated cellulose for prevention of postoperative intraperitoneal adhesions, *Surgery Today*, Vol. 13, 1983, s. 159-163.
58. Spanger, D., Rothenburger, S., Nguyen, K., Jampani, H., Weiss, S., Bhende, S.: In vitro antimicrobial activity of oxidized regenerated cellulose against antibiotic-resistant microorganisms, *Surgical Infections*, Vol. 4, 2003, s. 255-262.
59. MATERIAL SAFETY DATA SHEET - MDOC (Microdispersed Oxidised Cellulose), Alltracel Pharma Ltd, 10 Church Place, Sallynoggin, Co. Dublin, Ireland, 1999.
60. Pecka, M.: Haemostats bonded within intermolecular complexes and their effect on platelet count decrease in anticoagulated blood. *J Thromb Haemost*, Vol. 5 Supplement 2, 2007, P-T-105.
61. Pecka, M., Briestenski, J., Malý, J., Pešková, E., Dyr.: Pokles krevních destiček po aplikaci PAGA s navázanými ionty některých kovů. *Laboratorní hematologie 2006*, HK Credit, ISBN 80-86780-29-5, 2006, s. 131-133.
62. NanospiderTM, <http://www.nanopeutics.net>, staženo 23. 4. 2008
63. Rozek, Z., Kaczorowki, W., Lukáš, D., Louda, P., Mitura, S.: Potential applications of nanofiber textile covered by carbon coating. *Journal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering*, Vol. 27, 2008, s. 36.
64. Jones, T., Anderson, W., Fang, V., Landau, R., Rosenfield, R.: Experimental cryptorchidism in adult male rats: Histological and hormonal sequelae. *Anat. Rec.*, Vol. 189, 177, s. 1-28.
65. Sharpe, R., Cooper, I., Doogan, D.: Increase in Leydig cell responsiveness in the unilaterally cryptorchid rat testis and its relationship to the intratesticular levels of testosterone. *Journal of Endocrinology*, Vol. 102, 1984, s. 319-327.

66. Chaki, S., Misro, M., Ghosh, D., Srinivas, M.: Apoptosis and cell removal in the cryptorchid rat testis. *Apoptosis*, Vol. 10, 2005, s. 395-405.
67. Grizard, G., André, M., Boucher D.: Plasma and pituitary gonadotrophins before and after LRH in normal, cryptorchid and castrated rats. *Acta endocrinologica*, Vol. 95, 1980, s. 454-464.
68. Srinivas M., Chandrasekharam, S., Degaonkar, M., Gupta, D., Jha, P., Jagannathan, N., Das, S.: Effects of unilateral grade I testicular injury in rat. *Urology*, Vol 60, 2002, s 548-551.
69. Srinivas, M., Hashim, S., Mitra, D.: Unilateral blunt testicular trauma in pre-pubertal rats. *Pediatric Surgery International*, Vol. 15, 1999, s. 457-460.
70. Özkan, Keramettin., Küçükaydin, M., Muhtarolu, S., Kontas, O., Karaca, F.: Serum inhibin B levels reflect contralateral testicular damage following unilateral testicular trauma. *Urol. Int.*, Vol. 71,2003, s. 73-74.
71. Lin, W., Kim, E., Quesada, E., Larry, I., Lipshultz, L., Coburn, M.: Unilateral testicular injury from external trauma: evaluation of semen quality and endocrine parameters. *The Journal of Urology*, Vol. 159, 1998, s. 841-842.
72. Manlay, A., Calle, V., Olivier, F., Soufir, C., Masse, R., Pinon G.: Impairment of testicular endocrine function after lead intoxication in the adult rat. *Toxicology*, Vol. 100, 1995, s. 101-109.
73. Batra, N., Nehru, B., Bansal M.: Reproductive potential of male Portan rats exposed to various levels of lead regard to zinc status. *British Journal of Nutrition*, Vol. 91, 2004, s. 387-391.
74. Lui, Y-W., Mruk, D., Lee, M. W., Cheng, Y. C.: Sertoli cell tight junction dynamics: their regulation during spermatogenesis. *Biology of reproduction*, Vol. 68, 2003, s. 1078-1097.

75. Cavicchia, J., Sacerdote, F., Ortiz, L.: The human blood-testis barrier in impaired spermatogenesis. *Ultrastructural Pathology*, Vol. 20, 1996, s. 211-218.
76. Blanchard, K., Lee, J., Boekelheide, K.: Leuprolide, a gonadotropin-releasing hormone agonist, reestablishes spermatogenesis after 2,5-hexanedione-induced irreversible testicular injury in the rat, resulting in normalized stem cell factor expression. *Endocrinology*, Vol. 139, 1998, s. 236-244.
77. Boekelheide, K., Fleming, L. S., Johnson, J. K., Patel, R. S., Schoenfeld, A. H.: Role of Sertoli cells in injury-associated testicular germ cell apoptosis. *P.S.E.B.M.*, Vol. 225, 2000, s. 105-115.
78. Komrska, J.: Diplomová práce. Apoptóza zárodečných buněk navozená uměle vytvořeným kryptorchismem. *Universita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové*, 2007.