Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Účinek MDOC na testikulární tkáň II
Intratestikulární aplikace přípravku s MDOC.

Školitel : Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.

Jindřichův Hradec, únor 2009 Mgr. Martina Havlová

Děkuji Doc. RNDr. Vladimíru Semeckému, CSc. za odborné vedení a pomoc při sestavování rigorózní práce.

Děkuji paní laborantce Pavlíně Jabůrkové za pomoc při histologickém zpracování vzorků.

Děkuji za poskytnutí II. Interního grantu UK registrač. číslo 148/2004.

Obsah

Použité zkratky 2
1. Abstract 3
2. Úvod a cíl rigorózní práce 6
3. Teoretický úvod 8
   3.1 Sertoliho buňky 9
      3.1.1 Znaky diferenciace Sertoliho a zárodečných buněk ve fetálních a raně postnatálních lidských varlatech 11
   3.2 Hematotestikulární bariéra 13
      3.2.1 Funkce HTB 13
      3.2.2 Regulace HTB a modely používané k jejímu studiu 18
      3.2.3 Regulace dynamiky buněčných spojů v testis 20
   3.3 Leukocyty v testis 24
      3.3.1 Testikulární makrofágy 24
      3.3.2 Organizace prostředí testikulární imunity 25
      3.3.3 Zánět testis 26
   3.4 Mikrodispergovaná oxidovaná celulóza, MDOC 28
4. Materiál a metody 29
   4.1 Pokusná zvířata 30
      4.1.1 Experimentální provedení 30
      4.1.2 Odběry orgánů 31
   4.2 Zpracování orgánů 33
   4.3 Zpracování vzorků 35
      4.3.1 Příprava a zalití do epoxidových pryskyřic, barvení TM 35
5. Výsledky 37
   5.1 Výsledky makroskopických pozorování 38
   5.2 Výsledky histologického hodnocení 40
      5.2.1 Interval 6 dnů 40
      5.2.2 Interval 7 dnů 40
      5.2.3 Interval 12 dnů 41
      5.2.4 Kontrolní varlata a nadvarlata 42
6. Diskuse 44
7. Závěr 50
8. Obrazová příloha 53
9. Seznam literatury 64

Použité zkratky

atd.	a tak dále
c AMP	cyklický adenosin monofosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FSH	folikuly stimulující hormon
HTB	hematotestikulární bariéra
HE	barvení hematoxylin - eosin
IL	interleukin
LH	luteinizační hormon
MDOC	mikrodispergovaná oxidovaná celulóza
MFS	monocyto-fagocytární systém
obr.	obrázek
PAS	barvení Periodic Acid Schiff
TM	barvení toluidinová modř
TNF	tumor nekrotizující faktor
ZT	barvení zelený trichrom

1 Abstract

The aim of my rigorose work was to inspect and assess the effects of time and application of calcium/sodium salt of microdispersed oxidised cellulose (MDOC) to the structural components of testes, especially in the time after an operational localization of one testis into the intraabdominal cavity.

We used a model of an experimental unilateral cryptorchidism in the adult male Wistar rats.

The surgery was performed under standard conditions using a method introduced in the Department of Biological and Medical Sciences of the Faculty of Pharmacy Charles University. The rats were killed by overdosage of aether aenesthesia and the bilateral testes were removed. The tissues were immediately histologically processed. After the histological modifications we tained the sections with hematoxylin – eosin, green trichrome, Periodic acid Schiff and toluidin blue histological stainings.

The evaluation was histological with optical microscope. We compared our results with studies, which are described in the theoretical introduction of my work.

In the preparations from the time interval of 7 days after surgery with injection application of 1% solution of calcium/sodium salt of MDOC under the tunica albuginea we randomly measured the diameter of the seminiferous tubules. The diameter of the tubules that contained germ cells was about 200 μm. The diameter of the tubules almost without germ cells was about 80 – 150 μm. Germ cells in the seminiferous tubules were in most cases degenerating. The significant decrease in seminiferous tubules diameter is described just in the day 7 after operation in the abdominal testes.[10]

We observed the tubules filled mostly with Sertolli cells with a few germ cells, which were mostly apoptotic. In other tubules, we saw higher number of germ cells, near the basement membrane spermatogonies laid, some were apoptotic, near the lumen of the tubule were on the Sertolli cells' bodies connected other stages of seminiferous epithelium. Some of these cells were apoptotic. In the tubules were multinuclear giant cells. In the intersticium were wrinkled Leydig cells.

Unusual in this time was the appearance of the tubules with completely disintegrated construction of the germinative epithelium. The bodies of Sertolli cells were damaged, lumen was filled with free deposits of germ cells with the signs of degeneration and between them there were amorphous clusters of eosinophilous material. Studies described similar changes in day 15 of cryptorchidism.[10]

Another atypical finding was the clusters of macrophages. They were in the place of injection under tunica albuginea, but even in intersticium and near blood – vessels.

In the preparations from the time interval of 12 days after surgery with application of gel of calcium/sodium salt of MDOC into the cutted apex of the testis we observed tubules with apoptotic germ cells. In damaged tubules were macrophages phagocyting degenerated cells and lipids. Some tubules were completely degenerated and without germ cells. We observed lymphocytes, monocytes, multinuclear giant cells.

In time intervals 6, 7 and 12 days the application of calcium/sodium salt MDOC amplify the signal for chemotaction of cells MF system.

The application of calcium/sodium salt MDOC causes rasant changes in tubules, it is probably in connection with the rise of inflammation.

In control and contralateral testes there were no changes observed.

2 Úvod a cíl rigorózní práce

Úkolem rigózní práce bylo posouzení a sledování vlivu času a aplikace sodno-vápenaté soli mikrodispergované oxidované celulózy na strukturální komponenty varlat a to v časech 6, 7 a 12 dnů po umístění jednoho varlete intraabdominálně.

Model experimentálního unilaterálního kryptorchismu u potkana jsme použili pro studium změn, které mohou nastat i u lidských varlat ať už poruchou jejich intraskrotálního sestupu či aplikací xenobiotik poškozujících vývoj zárodečného epitelu.

Katedra biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy se delší dobu zabývá studiem tohoto modelu, látky poškozující semenotvorný epitel jsou často léčiva, velmi často antineoplastika, ale i pesticidy, těžké kovy a jiné látky ze životního prostředí.

Experiment jsme vyhodnotili pomocí makroskopických nálezů a histologických metod.

3 Teoretický úvod

3.1 Sertoliho buňky

Sertoliho buňky se rozprostírají od báze směrem k apexu semenotvorného epitelu a interagují s vyvíjejícími se zárodečnými buňkami od počátku do konce spermatogeneze. Mají enormní povrchovou plochu, ta jim poskytuje nést ohromný počet vyvíjejících se zárodečných buněk v poměru přibližně 1 : 50 (Sertol. buňka : zárodečné buňky).[1, 3]

Morfologicky jsou Sertoliho buňky klasifikovány do dvou kategorií. Typ A Sertol. buněk nese v cytoplazmických kryptách zralé spermatidy, připravené pro uvolnění do lumen tubulů. Typ B Sertol. buněk cytoplazmické krypty téměř neobsahuje. V průběhu 14 stádií epiteliálního cyklu se typ A přeměňuje v typ B Sertol. buněk a tím se Sertol. buňky přizpůsobují buněčným změnám nastávajícím v průběhu vývoje a pohybu zárodečných buněk.[3, 4]

Funkce Sertoliho buněk většinou přímo souvisí s vývojem a pohybem zárodečných buněk.

1. Cytoskelet Sertoliho buněk zajišťuje tvar, pozici a transport organel v testis, tvoří a stabilizuje buněčné membrány na stranách kontaktu buňka - buňka a buňka - extracelulární matrix, pomáhá při pohybu vyvíjejících se zárodečných buněk a podílí se na uvolnění zralých spermatid ze semenotvorného epitelu.

Skládá se ze tří hlavních složek, aktinu, intermediárních filament a mikrotubulů.

Aktinová filamenta jsou složena z monomerů aktinu, z nichž každý polymerizuje do lineárního řetězce se strukturou helixu. V Sert. buňkách se vyskytuje monomerní G aktin a polymerní F aktin, převaha jednoho či druhého typu ovlivňuje buněčný tvar a pohyb.

Intermediární filamenta jsou lokalizována na stranách připojení buňka - buňka a buňka - extracelulární matrix, kde asociují se dvěma typy kotvících spojů, s desmozómy a hemidesmozómy. Je známo několik typů intermediárních filament, účastní se nejspíše zajišťování integrity semenotvorného epitelu.

Mikrotubuly jsou tvořeny tubuliny, je známo šest základních typů tubulinů např. α, β, ε. Hlavní stavební složky cytoskeletu mikrotubulů jsou α a β tubuliny. Zajišťují sloupcovitý tvar, polohu a transport intracelulárních organel, přemístění

spermatid v semenotvorném epitelu a uzpůsobení tvaru membrány Sert. buněk nepravidelnému tvaru spermatických hlaviček, které jsou uloženy v kryptách během spermatogeneze.

2. Účast v přemisťování zárodečných buněk. Mikrotubuly společně s proteiny jako je dynein, myosin VII a , ATPázami a GTPázami napomáhá na straně ektoplazmových specializací při migraci elongovaných spermatid napříč semenotvorným epitelem.

3. Sertoliho buňky jsou nepostradatelné pro uvolnění zralých spermatid ze semenotvorného epitelu , účastní se kaskády zahrnující enkapsulaci hlaviček spermatid, vyloučení spermatid z krypt Sertol. buněk a uvolnění hlaviček spermatid.

4. Po uvolnění zralých spermatid z cytoplazmických krypt, fagocytují Sertol. buňky reziduální tělíska, která byla uvolněna ze spermatid i degenerované zárodečné buňky.

5. Sertol. buňky podstupují aktivní pinocytózu a receptory zprostředkovanou endocytózu v adluminálních a bazálních kompartmentech epitelia.

6. Sertol. buňky sekretují mnohé látky jako např. proteázy, inhibitory proteáz, hormony, energetické substráty, růstové a parakrinní faktory. Proteázy a inhibitory proteáz se účastní např. oprav, růstu a dělení tkání.[3]

Je prokázaná zvýšená sekrece aktivátoru plazminogenu (serinové proteázy) ve stádiích VII - VIII epitel. cyklu, což poukazuje na potřebnost této proteázy při štěpení spojů mezi Sertol. a zárodečnými buňkami a tím dojde uvolnění elongujících spermatid do lumen tubulů.[7]

Růstové, autokrinní a parakrinní faktory jsou molekuly, které budují na buněčný povrch receptory k indukci kaskády přenosu signálu ovlivňujícího růst buněk, jejich diferenciaci a funkci, patří sem např. TGF α, TGF β. Tyto faktory hrají hlavní roli v zajišťování spermatogeneze a pohybu zárodečných buněk.

7. Složky extracelulární matrix na bazální membráně obklopující semenotvorné tubuly tvořící bazální membránu, která je spojena se Sertol. buňkami a vyvíjejícími se zárodečnými buňkami, mají účast na pohybu buněk. Sertol. buňky vylučují složky extracelulární matrix, kolagen a laminin, přispívající ke strukturální celistvosti semenotvorného epitelu. Laminin je klíčový

v zajišťování integrity těsných spojů Sertol. buněk, kolagen je důležitý pro regulaci bariéry těsných spojů Sertol. buněk.

8. Sertoliho buňky opatřují živiny, z nichž mnohé jsou nepostradatelné pro přežití zárodečných buněk, např. lipidy, aminokyseliny, ionty kovů, vitamíny. Když byly kultivovány zárodečné buňky, bylo jejich přežití významně prodlouženo po přidání kokultur Sertol. buněk.

9. Metabolismus Sertoliho buněk je velmi důležitý pro biologii testis, neboť výtěžek energie je nezbytný nejen pro spermatogenezi, ale i pro vývoj a pohyb zárodečných buněk. Sertol. buňky metabolizují glukózu na laktát, což je preferovaný zdroj energie zárodečných buněk a pyruvát. Nejspíše pomocí gap junctions je tento zdroj energie přenášen k zárodečným buňkám pro zajištění jejich přežití.[3]

3.1.1 Znaky diferenciace Sertoliho a zárodečných buněk ve fetálních a raně postnatálních lidských varlatech

Znalost výskytu fetálních znaků během prenatálního a časně postnatálního vývoje může být důležitá pro pochopení mechanismů vedoucích k jejich znovuobjevení při poruchách u dospělých varlat.[5]

Folker E. Franki (2004) provedl studii exprese markrů Sertoliho a zárodečných buněk u 25 lidských varlat v rozpětí období od 8 týdnů těhotenství do 4 let věku, za použití specifických protilátek.

Diferenciace Sertoliho a zárodečných buněk zahrnuje ztrátu exprese fetálních znaků v dospělosti. U Sertol. buněk to znamená ztrátu výskytu anti-Mülleriánského hormonu (AMH), membránového M_2A antigenu a cytokeratinu 18, proteinu intermediárních filament v pubertě. Exprese proteinu intermediárních filament vimentinu setrvává do dospělosti.

U zárodečných buněk se v normálních dospělých varlatech ztrácí fetální znaky zárodečné buňky jako je alkalická fosfatáza, somatická isoforma angiotenzin-konvertujícího enzymu (sACE) a M_2A antigen.[5]

Vývojové období	Embryonální 8 až 12 týdnů	Středně fetální 13 až 23 týdnů	Pozdně fetální 23 až 35 týdnů	Postnatální 2 až 5 let
AMH	+++	+++	+++	+++
CK18	+++	-	-	-
VIM	+++	+	+	+
M_2A	-	+	+	++
sACE	-	+	+	+

Imunohistologické znaky Sertoliho buněk během prenatálního a postnatálního vývoje (AMH anti-Mülleriánský hormon, CK18 cytokeratin 18, VIM vimentin, M_2A M_2A antigen, sACE somatický angiotenzin konvertující enzym).
+ a +++ indikuje intenzitu výskytu , - značí absenci výskytu znaku

AMH je specifický diferenciační znak Sertol. buněk. AMH byl identifikován v granulózních buňkách ovaria a v nádorech gonád, které měly původ v Sertoliho a granulózních buňkách.

Vimentin je obvyklým v Sertol. buňkách, ale exprese CK18 byla demonstrována pouze do dvaceti týdnů těhotenství. Pozdější výskyt exprese CK18 v Sertol. buňkách je znám za patologických stavů v dospělosti jako u poškození tubulů, zastavení vývoje spermatogónií atd.[5]

3.2 Hematotestikulární bariéra

Přiléhající Sertoliho buňky jsou k sobě poutány na úrovni spermatogonií systémem těsných spojů tzv. tight junctions (TJ), zonula occludens, ty tvoří hematotestikulární bariéru.[1, 2, 3]

3.2.1 Funkce hematotestikulární bariéry

Hematotestikulární bariéra (HTB) rozděluje semenotvorný epitel varlat do dvou kompartmentů.

Bazální kompartment obsahuje spermatogonie a spermatocyty ve stádiu preleptotene a leptotene. V adluminálním kompartmentu jsou spermatocyty ve stádiu meiózy a spermatidy v rozličných stádiích spermatogeneze a spermiogeneze. Takto je vytvořeno speciální morfologické a biochemické prostředí esenciální pro připevnění, dělení a pohyb zárodečných buněk.

V potkaních varlatech se HTB vytváří v čase 15 až 20 dnů věku.[1, 3, 9, 32]

Souhrnně jsou popsány tři základní funkce HTB :

1. Tvoří specializované prostředí : Sertoliho buňky syntetizují, vylučují a selektivně dodávají produkty nezbytné pro růst a diferenciaci zárodečných buněk.
2. Reguluje průchod molekul : Záleží na velikosti a chemické povaze látek.
3. Slouží jako imunologická bariéra : Zabraňuje vstupu imunoglobulinů a lymfocytů do adluminálního kompartmentu. [3, 7]

V semenotvorném epitelu se současně vyskytují tři morfologicky a funkčně odlišné typy buněčných spojů : a) těsné spoje (TJ), b) kotvící spoje (anchoring junctions) mezi které se řadí např. adherentní spoje (AJ) a dále c) komunikační spoje.[3]

a) Těsné spoje (TJ)

Těsné spoje jsou oblasti úzkého kontaktu mezi plazmatickými membránami sousedících buněk tvořené fibrilami, které obklopují bazální doménu každé buňky obvykle v počtu 50 - 100. Fibrily jsou složené z řady těsně uspořádaných transmembránových proteinů jako jsou okludin a klaudin. [3, 13]

Na rozdíl od těsných spojů nalezených v ostatních epitelech mají tyto spoje ve varleti jedinečnou lokalizaci v blízkosti bazální membrány, v bazální třetině semenotvorného epitelu.

Dvě hlavní funkce těsných spojů :

1. Tvoří bariéru : Semipermeabilní bariéra omezuje průchod molekul, z velké části ale pasáž molekul závisí na jejich molekulární hmotnosti a chemické povaze. Permeabilita TJ může být regulována odlišnými faktory a fyziologickými podmínkami.
2. Tvoří hranice : TJ vytváří hranice, které udělují semenotvornému epitelu buněčnou polaritu. Ohraničením epitelia do bazálního a adluminálního kompartmentu se předchází promíchání molekul. [3, 6]

Klaudiny jsou skupinou o nejméně 24 členech, mají schopnost polymerizace do lineárních fibril, což kontrastuje se schopností okludinu tvořícího pouze krátké fragmenty vláken. [3, 13]

Transmembránové proteiny identifikované až dosud v těsných spojích zahrnují tři hlavní skupiny : okludin, rodinu klaudinů a spojové adhezní molekuly (JAM). Integrální membránové proteiny okludin a klaudiny ustavují prameny těsných spojů, jež se chovají jako regulované „kanály“ pro paracelulární pasáž iontů a malých molekul. Po výzkumu Saitou, Furuse a kol. (2000) na okludin -/- deficientních myších se zjistilo, že okludin je nutný při spermatogenezi a pohybu zárodečných buněk.[3, 14]

Meng, Holdcraft a kol. (2005) potvrdili přítomnost okludinu - 3 u myší a jeho nezbytnost pro správnou funkci testis, avšak v lidských varlatech se nevyskytuje.[32]

JAM jsou vtaženy do vytváření buněčné polarity epiteliálních buněk.

Všechny transmembránové proteiny TJ přímo interagují s periferními TJ proteiny fungujícími jako adaptory. Adaptory obsahují několik protein budujících domén, to jim povoluje vytvářet mnohé bílkoviny TJ a spojovat je do signálních

molekul a cytoskeletu. Mezi adaptory se řadí např. proteiny jako zonula occludens-1 (ZO-1), ZO-2, ZO-3 (p 130/ZO-3).[3]

b) Kotvící spoje

Jsou rozlišeny 4 typy kotvících spojů: 1. adherentní spoje (AJ, zonula adherens), 2. fokální kontakty nebo adheze, 3. desmozómy, 4. hemidesmozómy.

Hlavní odlišnost mezi těmito čtyřmi typy spojů je ta, že adherentní spoje a fokální adheze používají k vazbě aktinová filamenta, zatímco druhé dva typy používají intermediární filamenta.

1. Adherentní spoje (AJ)

V testis jsou též přítomny dva modifikované typy adherentních spojů, ektoplazmické specializace a tubulotubulární komplex.

Společnou vlastností těchto spojů je to, že připojují cytoskelet buňky buď k další buňce nebo k extracelulární matrix a tím vytváří síť zajišťující tkáňovou celistvost. Je naznačeno, že se spoje mohou účastnit i transdukce signálů regulujících buněčné procesy jako proliferace buněk, diferenciace a pohyb.

Proteiny adherentních spojů identifikované v testis :

1. kadherin-katenin. Většina kadherinů jsou glykoproteiny složené z několika domén : dvou cytoplazmických, jedné transmembránové a pěti kalcium vázajících domén. Pokud je nedostatek kalcia, jsou kadheriny inaktivní a náchylné k proteolýze. Kadheriny se většinou váží k β-kateninu nebo γ-kateninu. Podání anti-N-kadherinových protilátek *in vitro* porušilo adhezi zárodečných buněk k Sertoliho buňkám.[3, 13]
2. nektin-afadin-ponsin, (NAP jednotka). Nektin je na kalciu nezávislý protein buněčné adheze, je složený ze tří domén: transmembránové, cytoplazmické a tří extracelulárních domén. Sestavení buněčné adhezní jednotky NAP je zprostředkováno z části každým členem rodiny nektinů interagujících homo/heterotypicky s další molekulou nektinu na protější buněčné membráně. Bouchard , Dong a kol. (2000) uvedli, že nektin 2-/-

myši byly infertilní a vykazovaly defektní morfologii spermatu.[15] Afadin má dvě varianty, 1-afadin byl nalezen ve všech tkáních. Takai, Nakanishi (2003) prokázali vazbu mezi α-kateninem a 1-afadinem, což dokazuje vztah mezi buněčnými adhezními jednotkami kadherin-katenin a NAP jednotkou.[16]

Ponsin se podílí na tvorbě komplexu buď vazbou s 1-afadinem nebo vinkulinem.[3]

3. integrin-laminin. Mercucio (1990) a Mecham (1991) uvedli, že γ 3 lamininový řetězec lamininu 12 (lamininy jsou glykoproteiny složené z α, β, γ řetězce) je v testis lokalizovaný u adluminálního kompartmentu semenotvorného epitelu. Výsledky zkoumání naznačují, že γ 3 lamininový řetězec může být stavební partner α 6 β 1 integrinu v ektoplazmických specializacích.[17, 18]

Specifické ektoplazmické specializace jsou modifikované typy adherentních spojů nalezené pouze v testis. Jsou důležité pro translokaci spermatid a nejspíše i stabilizaci ostatních typů spojů přítomných mezi Sertoliho a Sertoliho a zárodečnými buňkami.

Existují apikální a bazální ektoplazmické specializace, s apikálními nejvíce interaguje NAP komplex, s bazálními spíše kadherin-katenin komplex. Prokázaný protein přítomný v apikálních ektoplazmických specializacích je např. $\alpha_6 \beta_1$ integrin. Mezi další proteiny ektoplazmických specializací se řadí např. fimbrin, espin, paxilin, vinkulin, myosin VII A atd.[3]

Tubulotubulární komplex

Další modifikovaný typ adherentních spojů je tubulotubulární komplex nalezený mezi Sertoliho buňkami na úrovni těsných spojů a mezi Sertoliho buňkami a elongovanými spermatidami zralými pro uvolnění do lumen tubulů. Tubulotubulární komplex existuje jako dvojice tubulárních struktur obklopených aktinem.

Apikální tubulotubulární komplexy jsou viditelné v epitelu až ve stádiu VII a na konci stádia VIII jsou rychle degradovány lysozómy Sert. buněk. Bazální tubulotubulární komplexy jsou tvořeny ve stádiích II - V. Apikální tubulotubulární

komplexy jsou nepatrně delší než bazální. Každá zralá spermatida může obsahovat 4 až 24 tubulotubulárních komplexů, které nejspíše předchází předčasnému uvolnění elongovaných spermatid do lumen tubulů.[3]

2. Fokální kontakty

Fokální kontakty nebo též fokální adheze jsou složené většinou z integrinů a připojují aktinová filamenta buněk k extracelulární matrix. Jsou nalezeny téměř ve všech epitelech, ačkoli nebyly zkoumány v testis, jejich proteiny zde byly identifikovány a předpokládá se jejich účast na buněčné adhezní funkci v ektoplazmických specializacích. Fokální adheze jsou dynamické struktury regulující pohyb buněk a účastnící se transdukce signálu. Proteiny fokálních adhezí jsou např. integrity, vinkulin, talin, paxillin.

3. Desmozómy

Desmozómy jsou kotvící spoje buňka-buňka používající intermediární filamenta. Jsou složené ze dvou hlavních domén : extracelulární jádro (dřeň, desmoglea) a symetrická hustota cytoplazmických plaků ležící paralelně s plazmatickou membránou. Intermediární filamenta se připojují k cytoplazmickým plakům a vytváří napříč buňkou celistvou síť. Proteiny desmozómů jsou kadheriny, armadillo proteiny a plakiny.

4. Hemidesmozómy

Hemidesmozómy jsou buněčné spoje spojující cytoskelet buňky s pod ní ležící bazální membránou. Jsou připojeny k cytoskeletu pomocí intermediárních filament.

c) Komunikační spoje

Ze dvou typů komunikačních spojů : gap junctions a chemické synapse jsou v souvislosti s pohybem zárodečných buněk prozkoumány gap junctions. Pomocí gap junctions jsou mezi dvěma přilehlým buňkami vyměňovány ionty a malé molekuly, zprostředkovávají také signály mezi Sertoliho a zárodečnými buňkami, mají účast na koordinaci pohybu zárodečných buněk v semenotvorném epitelu. Tvoří je proteiny konexiny. [3]

3.2.2 Regulace HTB a modely používané k jejímu studiu

HTB je vysoce dynamická struktura, protože musí být schopna periodického rozestavění se pro umožnění migrace zárodečných buněk napříč bariérou.

Během spermatogeneze prochází napříč HTB preleptotenní a leptotenní spermatocyty, které jsou umístěny v bazálním kompartmentu.

Tento proces vyžaduje schopnost oddělitelnosti a znovuobnovení spojů Sertoliho buňka - Sertol. buňka a Sertol. buňka - zárodečná buňka.

HTB je regulována poměrně složitou sítí signálních kaskád a rychlým obratem spojových molekul.[3, 6]

Sertoliho buňky kultivované *in vitro* na Matrigelem potažených plátech za buněčné hustoty průměrně mezi 0,5 a 1,2 x 10^6 buněk/cm^2 vytvořily funkční bariéru z těsných spojů. Shromáždění a udržování bariéry z těsných spojů byly vyměřeny transepiteliální elektrickou rezistencí (TER), polarizovanou sekrecí proteinů Sertoliho buněk atd. Tento in vitro model použilo mnoho vědců, např. Lui W.Y. (2001).[3, 19]

Bylo prokázáno, že rozhodujícími regulátory dynamiky HTB jsou cytokiny (např. TGF β_3, TNF α), kinázy, fosfatázy, oxid dusný, intracelulární Ca^{2+}.[3, 6]

Tento model *in vitro* však není dokonalý, těsnost bariéry HTB, která je jednou z nejpevnějších bariér v savčím těle, je *in vitro* nižší.

Přidání androgenů, cAMP, proteázových inhibitorů do kultur Sertoliho buněk může zvýšit pevnost HTB *in vitro*, což naznačuje příspěvek mnohých biologických faktorů *in vivo* k těsnosti této bariéry.

Tento *in vitro* model je použitelný pro studium dynamiky těsných spojů. Tvobu HTB *in vivo* podporují i složky extracelulární matrix jako je heparan sulfát a laminin. Pro funkčnost těsných spojů je esenciální také protein kolagen, protože kultivace Sertoliho buněk *in vitro* za přítomnosti antikolagenu α_3 znamenala porušení shromáždění těsných spojů.

Formace HTB není závislá na přítomnosti zárodečných buněk, jejich ztráta ze semenotvorného epitelu *in vivo* nezabránila vytvoření bariéry.

Dodání testosteronu do kultury Sertoliho buněk in vitro zvýšilo TER. Testosteron má též přinejmenším zčásti vliv na regulaci permeability HTB,

nejspíše ovlivněním hladiny okludinu a ZO – 1. Estrogeny ovšem funkci bariéry těsných spojů neregulují.[3, 20, 21, 32]

Okanlawon a Dym (1996) ukázali, že chlorochin (antimalarikum a inhibitor proteáz) je schopný zvýšit TER v závislosti na dávce a zvyšovat tak těsnost bariéry HTB v porovnání se Sertoliho buňkami kultivovanými za nepřítomnosti chlorochinu.[20]

Při studiu regulace dynamiky v TJ byl použit *in vivo* model u potkanů medikovaných $CdCl_2$. Bylo zjištěno, že dynamika HTB je *in vivo* regulována $TGF\beta_2$ a $TGF\beta_3$ cestou p38 MAP kinázy. Poškození bylo doprovázeno ztrátou occludinu a ZO -1 ze struktur na aktinu založených adherentních spojů, jmenovitě kadherin/katenin a nektin/afadin proteinových komplexů. Došlo též k indukci nespecifického proteázového inhibitoru makroglobulinu α_2 chránícího epitel před nechtěnou proteolýzou. Výsledky studie ukázaly, že TGFβ/p38MAP kináza signalizační kaskáda je užita k regulaci AJ a TJ dynamiky v testis a celý děj je zprostředkován působením $TGF\beta_3$ na integrální membránové proteiny a adaptéry AJ a TJ. [8]

Další *in vivo* model studia HTB je glycerolový. Podobně jako po podání chloridu kademnatého, rozruší intratestikulární injekce glycerolu HTB a v důsledku toho spermatogenezi. Glycerol nezasahuje steroidogenezi Leydig. buněk nebo sérové hladiny FSH a LH.[22]

Cytokíny (např.TGF β) mohou reverzibilně porušit HTB a adhezi mezi Sertol. - zárodečnými buňkami v epitelu prostřednictvím p38-mitogenně aktivované proteinové kinázy signalizační dráhy snížením hladiny TJ proteinů (např. okludin) a adaptorů (ZO-1) v HTB.[3, 6]

V HTB je využíván jedinečný mechanismus „zavázání“ a „odvázání“ mezi adherentními a těsnými spoji, bez narušení integrity HTB, umožňující pohyb preleptotenních a leptotenních spermatocytů.[8]

Současná existence a interakce mezi AJ a TJ je pro fyziologii HTB nezbytná.[3, 6]

Jedinečná architektura AJ a TJ je ovšem i příčinou extrémní citlivosti varlat na toxikanty z vnějšího prostředí (např. kadmium, Cd). Primárním cílem kadmia je E-kadherin, součást AJ. V epitelech jako je např. tenké střevo, jsou TJ umístěny v apikální části buněčného epitelu a AJ je následují, tím TJ

„zapečeťují“ environmentální jedy z dosahu AJ. V testis jsou tak AJ přilehlé k extracelulární matrix přiléhající k intersticiu, kam environmentální jedy mohou bezprostředně přistoupit jako např. Cd k E-cadherinu AJ. Efekt kadmia je časově a dávkově závislý. [6]

AJ přítomné v testis po boku TJ se tak mohou stát molekulárním terčem jedů z vnějšího prostředí. [6]

HTB má důležitou roli v integritě spermatogeneze. Porušení této bariéry způsobuje poškození gametogeneze.[3, 9]

HTB nemůže být lehce rozrušena např. fyzikálními vlivy, nevratná ztráta TJ vede ke kompletní degeneraci zárodečného epitelu.[3]

3.2.3 Regulace dynamiky buněčných spojů v testis

1. Cytokíny.

Na těsné spoje v rozličných tkáních mají vliv prostřednictvím : a) zasažení exprese a/nebo syntézy, b) redistribucí, c) stupněm fosforylace v proteinech těsných spojů. Ve varleti se podílí TGF β_2 a TGF β_3 a TNF α na dynamice těsných spojů Sertoliho buněk zasažením exprese okludinu a /nebo ZO-1.

Cytokíny mohou měnit stádium fosforylace proteinů adherentních spojů nebo porušovat interakce existující mezi jejich proteiny a aktinovými vlákny.[3, 6]

2. Proteázy a inhibitory proteáz.

Proteázy jsou enzymy hydrolyzující peptidové vazby ve specifických místech, dělí se na endopeptidázy a exopeptidázy.

Exopeptidázy (peptidázy) štěpí peptidové vazby u C a N konce polypeptidu, obvykle 1 nebo 2 aminokyselinové zbytky od jejich konce.

Peptidové vazby vnitřně štěpí endopeptidázy (proteinázy), jsou např. serinové, aspartázy atd.[3]

Serinová proteáza PA (41 kDa) zasahuje *in vitro* sekreci Sertoliho buněk. Sekrece PA byla pozorována na nejvyšší úrovni ve stádiích VII a VIII epitel. cyklu.[3, 23]

Mezi cysteinové proteázy patří kathepsiny, kathepsin L (39 kDa) je sekreční produkt Sertol. buněk. Kathepsin L je experimentálně stanoven v nejvyšší

koncentraci ve stádiích VI a VII, což naznačuje jeho účast na pohybu elongovaných spermatid k lumen tubulů. Zjistilo se, že kathepsin L může být stimulován onkogeny a nádorovými proteiny a může se podílet na metabolismu a invazi nádorových buněk.[3, 24]

V testis, rete testis, epididymis a ductus efferens je přítomna aspartáza, kathepsin D. Kathepsin D se vyskytuje v primárních spermatocytech, v Sertoliho i Leydigových buňkách, nejvíce ve stádiích VII až IX epitel. cyklu, je tudíž možný jeho vliv na uvolnění zralých spermatid do lumen tubulů .

Mezi metaloproteázy se řadí např. N-arginin dibázické konvertázy a účastní se nejspíše zrání a uvolňování spermií.[3]

Do rodiny proteázových inhibitorů patří :

a) Serinové proteázové inhibitory. Jsou to velké molekuly složené z průměrně 400 aminokyselinových zbytků. Sertoliho a peritubulární myoidní buňky syntetizují např. PA inhibitor, PAI-1. Hladina PAI-1 narůstá v peritubulárních myoidních buňkách po jejich vystavení TGF β nebo TGF α.[3]

b) Inhibitory cysteinových proteáz. Jsou známy tři typy : cystatiny, stefiny, kininogeny. Z mnoha typů cystatinů vyskytujících se v tělních tekutinách je v Sertoliho a Leydigových buňkách syntetizován cystatin C, ten může inhibovat aktivitu kathepsinů.

Velké multifunkční proteiny kininogeny přítomné v systémové cirkulaci se podílí např. na zánětlivé reakci, krevním srážení.[3]

c) Inhibitory aspartázových proteáz. V testis jsou přítomny aspartázové proteázy jako kathepsin D, ACE a renin, specifické inhibitory proti této třídě nebyly dosud popsány. Sertoliho buňkami produkovaný α_2 makroglobulin může aspartázové proteázy inhibovat. Přítomnost nespecifického proteázového inhibitoru α_2 makroglobulinu je ve stádiích I až VI epiteliálního cyklu. Ukázalo se, že α_2 makroglobulin se spojuje s TGF β_3 a N-kadherinem či β-kateninem, ale ne s β_1-integrinem a to jasně naznačuje důležitou roli inhibitorů proteáz v dynamice adherentních spojů. Regulací parakrinních faktorů v testis se α_2 makroglobulin účastní pohybu zárod. buněk z bazálního k adluminálnímu kompartmentu.[3]

d) Inhibitory metaloproteáz. Sertoliho buňky syntetizují TIMP-1 a TIMP-2, které mají význam v dynamice spojů. Sledováním interakce TIMP-1/MMP-9 bylo zjištěno, že ovlivňuje množství kolagenu, jenž bude pod možným vlivem TNF α v bazální membráně.

Ukázalo se, že protilátka proti kolagenu IV nebo rekombinantnímu TNF α může porušit funkčnost bariéry těsných spojů Sertoliho buněk. Je naznačeno, že cytokíny regulují homeostázu extracelulární matrix prostřednictvím svých efektů na inhibitory metaloproteáz a metaloproteázy, které obratem zasahují funkčnost těsných spojů.[3, 25]

3. Proteinové kinázy a fosfatázy.

Přibližně 30% všech buněčných proteinů je fosforylováno a fosforylace proteinů asociovanými se spoji je důležitá v regulaci dynamiky adherentních i těsných spojů v testis. Proteiny jako okludin, kadherin, nektin, katenin a β_1 integrin jsou předpokládané substráty proteinu tyrosinu a/nebo serin/threoninové kinázy a jejich funkce jsou regulovány fosforylací na specifických stranách. Je známo, že Sertoliho a zárodečné buňky jsou vybaveny rozličnými kinázami jako FAK, glykogen syntáza-kináza-3β, PI-3-kináza, MAPK atd., z nichž některé regulují dynamiku adherentních spojů Sertoliho - zárodečných buněk fosforylací β_1 integrinu.

Předpokládaným substrátem tyrosin-kinázy je např. signální molekula β-katenin regulující funkci adherentních spojů. Tyrosinová fosforylace β-kateninu koreluje se ztrátou kadherinem zprostředkované buněčné adheze. Oba receptory tyrosin-kinázy a fosfatázy koimunoprecipitují se složkami funkční jednotky kadherin-katenin, což ilustruje účast fosforylace proteinů na regulaci dynamiky adherentních spojů. Adheze buněk závisí i na stupni fosforylace komplexu kadherin-katenin.[3, 25]

4. cAMP a cGMP.

Při použití Sertoliho buněk kultivovaných in vitro, se ukázal dibutyryl c AMP, analog c AMP, který je neštěpitelný fosfodiesterázou c AMP, mít dvojitý efekt na funkčnost bariéry těsných spojů Sertoliho buněk. Ve 4-20 μm nebo 100-500 μm

dibutyryl c AMP buď podporuje nebo porušuje bariéru těsných spojů. Efekty c AMP na těsné spoje Sertol. buněk jsou tedy koncentračně závislé.[26]

Byl prokázán přechodný, ale znatelný nárůst v intracelulárních hladinách c AMP a c GMP v Sertol. buňkách v průběhu sestavování bariéry těsných spojů *in vitro*.

Po sestavení bariéry těsných spojů se snižuje množství intracelulárního c AMP a c GMP k jejich bazálním hladinám. To naznačuje, že zatímco c AMP a c GMP nemusí být nutné pro zajištění bariéry těsných spojů Sertoliho buněk, jsou potřebné pro její sestavení.[3, 27]

5. GTPázy.

Rho GTPázy jsou důležitými regulátory aktinového cytoskeletu a tím morfologie a pohybu eukaryotických buněk. Inaktivací Rho GTPáz v boviním spermatickém ocásku C3 koenzymem došlo k inhibici pohybu spermií. Rho-B je nalezena v potkaních testis na straně bazálních a apikálních ektoplazmických specializací a asociuje široce se Sertol. buňkami, spermatocyty a elongujícími, ale ne již elongovanými spermatidami v epitelu.

Rab GTPázy. V testis je přítomná např. Rab8B, podílí se na transportu vezikul z Golgiho sítě k bazolaterální membráně a podporuje polarizaci buněk, což je nezbytné pro sestavení a zachování těsných a nejspíše i adherentních spojů v epiteliálních buňkách.[3]

6. Kalcium.

Vápník je důležitým regulátorem dynamiky spojů i v netestikulárních tkáních. Vyčerpání kalcia ze Sertol. buněk kultivovaných *in vitro* může porušit funkci bariéry těsných spojů během 15 minut. Za absence kalcia se kadheriny stávají citlivé k proteolýze.[3]

3.3 Leukocyty v testis

Leukocyty, přesněji makrofágy, lymfocyty a žírné buňky se nachází v testes většiny savců. Stejně jako v ostatních tkáních těla se účastní imunologického dohledu, imunoregulace a remodelace tkání.

Přirozená imunita je schopnost rozpoznat a usmrtit mikroorganismy a ostatní patogeny, zahrnuje především monocyty - makrofágy, polymorfonukleární buňky a některé lymfocyty.

Leukocyty jsou odvozeny od běžných kmenových buněčných linií v kostní dřeni procesem zvaným hematopoéza.[11, 12]

3.3.1 Testikulární makrofágy

Na svém povrchu vytváří MHC třídy II a jejich schopnost vylučovat několik důležitých zánětlivých cytokínů zahrnujících IL-1, TNF α je redukovaná v porovnání s ostatními rezidentními makrofágy.

V nezralých potkaních testis je relativně málo přítomných makrofágů, jejich počet narůstá v období, kdy se objevují dospělé populace Leydig. buněk a začíná meiotické dělení spermatogenních buněk. Počet makrofágů vzrůstá do dospělosti a objem intersticiální tkáně určuje jejich počet v normálních dospělých testis.

Regulace počtu testikulárních makrofágů během pubertálního vývoje a u dospělých testis zahrnuje LH, který působí přes stimulaci Leydigových buněk. Makrofágy jsou blízce spojeny s Leydigovými buňkami a projevují se mezi nimi vysoce specializované cytoplazmické kontakty, buď přímo či pomocí testosteronu nebo neandrogenními produkty Leydig. buněk. Kompletní ablace Leydig. buněk v testis působením cytotoxinu specifického pro Leydig. buňky (EDS ethandimethansulfonát) zredukovala počet makrofágů asi o 50%. Je též možný vliv cytokínu IL-1 nebo FSH. [11, 12]

3.3.2 Organizace prostředí testikulární imunity

Je značná mezidruhová rozdílnost v organizaci intratestikulárního složení lymfatických imunitních buněk. Intersticium lidských testis se skládá z rozptýleně osídlené volné pojivové tkáně s velkými jasně definovanými lymfatickými cévami a značným počtem „usedlých“ leukocytů, hlavně makrofágů. Intersticiální tkáně potkanů a myší jsou podobné lidským, leukocytů obsahují velký počet, ale lymfatická tkáň je u těchto druhů souvislá s intersticiální tekutinou.

Makrofágy jsou za normálních podmínek upoutány k intersticiální tkáni.

Lymfocyty byly pozorovány v epitelu semenotvorných tubulů u rete testis. Je dokázáno, že protilátky mohou přestupovat rete testis , čímž je naznačena nekompletnost HTB v tomto místě.

Leukocyty se nachází po celém genitálním traktu, makrofágy a lymfocyty jsou často pozorovány v epitelu ductus eferens, epididymis, vas deferens a přidatných žlázách.[11]

a) Funkce leukocytů v testis

Důležitost makrofágů pro správnou testikulární funkci je vyjádřena pokusem, kdy mutantní myši mužského pohlaví měly redukovaný počet makrofágů v celém těle a rovněž měli sníženou fertilitu.

Nejspíše nejdůležitější funkcí testikulárních makrofágů je účast ve vývoji Leydigových buněk. Rezidentní testikulární makrofágy mají pozitivní efekt na steroidogenezi Leydig. buněk, nejspíš pomocí své trofické aktivity.

Testikulární leukocyty nejspíše neovlivňují spermatogenezi přímo, ale např. GM-CSF granulocyty-makrofágy kolonie stimulující faktor je testikulárními makrofágy produkován ve vysoké koncentraci *in vitro* a jeho vliv na semenotvorné tubuly je zkoumán.

Citlivost spermatogenních buněk k autoimunitnímu ataku může být dán faktem, že jejich vývoj se uskutečňuje dlouho po zrání imunity. Byly provedeny experimenty naznačující, že odmítnutí intratestikulárních štěpů může být indukováno imunizací oproti antigenům štěpu na zevní straně testis.

Autoimunita může vznikat z nedostatku „periferní tolerance“ k antigenům, kdy autoreaktivní T buňky nejsou vymazány během zrání.

V populaci testikulárních potkaních leukocytů převažují buňky účastnící se fagocytózy, což jsou makrofágy, cytotoxické CD8 buňky a NK buňky. Testis má zvýšenou vrozenou imunitní ochranu, jako možný kompenzační mechanismus pro limitování růstu a rozvoje nádoru nebo potenciální infekce mikroorganismy v testikulárním prostředí, kde je jinak antigen-specifická imunitní odpověď omezena nebo nedostatečná. Leydigovy buňky jsou do zajištění této ochrany zapleteny prostřednictvím stimulace testik. makrofágů a počtu cytotoxických T- buněk.[11]

3.3.3 Zánět testis

Nejběžněji je způsoben virovými infekcemi, jako je např. objevení se orchitidy u příušnic. Ostatními příčinami jsou infekce reprodukčního traktu, environmentální jedy, trauma, autoimunita.

Následkem zánětu je vtok cirkulujících monocytů, lymfocytů a neutrolilů a produkce zánětlivých cytokínů těmito buňkami může aktivovat pro varle specifické lymfocyty, následkem je autoimunitní orchitis nebo tvorba protilátek. Cytokíny mohou též interagovat se svými receptory v semenotvorných tubulech a v Leydigových buňkách a měnit normální tubuly i homeostázu Leydigových buněk.

Poškození varlete zánětem nemusí vždy vyústit v neplodnost. Nicméně experimentální a klinická zjištění naznačují, že zánět testis snižuje funkce Leydigových buněk a že muži, kteří prodělali období zánětu varlete, mohou být později citliví na nedostatky funkce Leydig. buněk.

Činnost Leydig. buněk je snížena během kritického onemocnění a u revmatoidní artritidy, což naznačuje také efekt periferního imunitního systému na tyto buňky.

Monocyty a produkty žírných buněk ovlivňují krevní průtok a vaskulární permeabilitu, které mají velký efekt na funkci testis.

Hyperstimulace Leydig. buněk např. luteinizačním hormonem indukuje též přechodnou zánětlivou odpověď v potkaních testis s narůstající

permeabilitou kapilár, akumulací neutrofilů a poškozením spermatogenních buněk. To je důkazem existence komunikační osy mezi Leydig. buňkami a monocyty, makrofágy a žírnými buňkami.

Proces zánětu může narušit spermatogenezi a steroidogenezi.

Znalosti o interakci mezi testis a imunitním systémem jsou stále ve vývoji, přesto jsou důležité pro porozumění např. autoimunitní neplodnosti nebo idiopatické infertilitě.[11, 12]

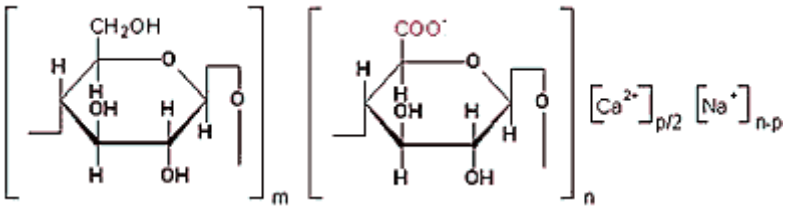
3.4 Mikrodispergovaná oxidovaná celulóza, MDOC

V našem pokusu č. 1531 a 1559 jsme aplikovali do potkaních varlat mikrodispergovanou oxidovanou celulózu MDOC (m.doc^{TM} Alltracel Pharma ltd., Ireland) ve formě 1% vodného roztoku její sodno-vápenaté soli. Roztok byl připraven z lyofilizovaného prášku ve vodě dobře rozpustného krémově bílé barvy.

V pokusu 1666 jsme do potkaních varlat aplikovali gel sodno-vápenaté soli MDOC.

Strukturní vzorec znázorňuje sodno-vápenatou sůl MDOC, což je kopolymer tvořený z jednotek polyanhydroglukózy a 1,4 β-D-polyanhydroglukuronové kyseliny:

MDOC



$m \in \langle 0,0;0,4 \rangle$; $n \in \langle 0,6;1,0 \rangle$; p označuje molární frakci vápenatých a sodných iontů

Sodno-vápenatá sůl MDOC je využívána v různých aplikačních formách v přípravcích používaných pro hojení a obnovu tkání, má významný hemostatický účinek.[28]

4 Materiál a metody

4.1 Pokusná zvířata

Experimentální část práce byla prováděna na dospělých samcích laboratorního potkana kmene Wistar. Byli chováni za standardních podmínek ve viváriu FAF UK, krmeni standardní potravou. Chov a zacházení s pokusnými zvířaty byly v souladu s pravidly schválenými Odbornou komisí pro ochranu zvířat proti týrání.

Potkani byli označeni pomocí kyseliny pikrové: 1. zvíře – H, 2. – LP, 3. – LZ, 4. – PP, 5. – PZ. Klece byly označeny standardně pomocí zavěšených umělohmotných štítků.

U první skupiny zvířat jsme chirurgicky navodili unilaterální kryptorchismus a to na časové intervaly : 6 dnů a 7 dnů. Hmotnost potkanů se pohybovala v rozmezí mezi 333 – 640 g.

Při pokusu provedeném 26.11.2008, kdy jsme sledovali vliv roztoku MDOC na tkáň varlete, bylo operací varle umístěno abdominálně a nebylo chirurgicky zabráněno případnému sestupu varlete z břišní dutiny. Hmotnost zvířat se pohybovala v rozmezí 300 – 380 g.

Tkáně z odběru 8.11. 2006 jsme označili číslem 1531, tkáně z odběru 30. 5. 2006 číslem 1559 a tkáně z odběru 8.12. 2008 číslem 1666.

4.1.1 Experimentální provedení

Všechna zvířata byla operována v celkové anestézii v podmínkách relativní asepse. K anestézii byl použit Narkamon (Spofa) 1% inj. sol. podaný intraperitoneálně. Množství podaného roztoku jsme určili z hmotnosti zvířat a jejich individuální odpovědi.

a) Navození experimentálního kryptorchismu

Kůží a svalovinou jsme vedli řez o velikosti asi 2 cm. Lehkým tlakem na skrotum jsme vytlačili levé varle a nadvarle do otevřené břišní dutiny. Po přestřižení m. cremaster jsme varle změřili. U pokusu 1531 jsme do dolního pólu varlat

injekčně aplikovali 1% roztok přípravku Loturon (sodno–vápenatá sůl MDOC). U pokusu 1559 jsme 1% roztokem sodno–vápenaté soli MDOC varle potřeli. Poté jsme varle opatrně uložili do břišní dutiny. Sešitím břišní svaloviny a kůže catgutem jsme operační ránu uzavřeli.

b) Aplikace gelu sodno-vápenaté soli MDOC na abdominálně umístěné varle s nastřiženým hrotem bez přestřižení m. cremaster

Při operaci jsme varle opatrně vyjmuli, hrot varlete nastřihli a potřeli gelem Loturon 7180X (sodno-vápenatá sůl MDOC). Nepřestřihli jsme m. cremaster ani vazivový pruh gubernaculum testis, nebyl tedy operačně navozen klasický experimentální kryptorchismus. Varle jsme zasunuli zpět do břišní dutiny a operační ránu jsme sešitím břišní svaloviny a kůže pomocí catgutu uzavřeli.

V pokusech a) i b) byl postup dále stejný : po operaci jsme zvířata umístili zpět do klecí. Pravidelně jsme je až do probuzení z anestézie pozorovali, zda nemají zapadlý jazyk, v následujících dnech jsme sledovali jejich zdravotní stav a potravní chování.

Kontrolní zvířata (shame operated) jsme operovali provedením řezu kůží a břišní svalovinou, bez aplikace MDOC. Operační ránu jsme sešili stejnou technikou jako u pokusných zvířat.

4.1.2 Odběr orgánů

Euthanasii jsme u všech zvířat provedli předávkováním celkového inhalačního anestetika Aether pro narcosi (Synhesia, Pardubice-Semtín) v uzavřeném prostoru exsikátoru.

Bezprostředně po usmrcení potkanů jsme provedli otevření dutiny břišní a vyňali varlata a nadvarlata. Po jejich očištění jsme změřili s přesností na milimetry jejich délku (u pokusů 1531, 1559, 1666). Poté jsme varlata i nadvarlata zvážili na vahách Soehnle s přesností na desetiny gramu (u pokusů 1531, 1559). Varlata i nadvarlata jsme ihned dále histologicky zpracovali.

4.2 Zpracování orgánů

Co nejrychleji po odebrání jsme tkáně vložili do fixační tekutiny. Při fixaci dochází k rychlé denaturaci bílkovin protoplazmy buněk a tkání, musí se zabránit samovolnému rozkladu tkáně působením enzymů. K fixaci většiny tkání jsme použili Bouinovu fixační tekutinu, k části formalín.

Po odvodnění, projasnění a prosycení jsme tkáně zalili do parafinu. Odvodnění jsme provedli pomocí vzestupné alkoholové řady nebo acetonu. Doba trvání je 6 až 24 hodin. Projasnění jsme provedli rozpouštědlem parafinu – xylen, benzen. Doba trvání je 1 až 6 hodin.

Po prosycení tkání parafinem a zalití vzorků do včelím voskem zkvalitněného parafinu jsme vytvořili tkáňové bločky. Doba trvání je 1 až 3 hodiny. U pokusu 1666 jsme vzorky tkání prosycovali epoxidovou pryskyřicí a do bločků zalévali také epoxidovou pryskyřicí.

Po ztuhnutí jsme tkáně v bločcích krájeli na sáňkovém mikrotomu Leitz na řezy tenké 2 až 3 μm. U pokusu 1666 jsme připravovali polosilné řezy 0,2 až 0,3 μm.

Nakrájené řezy jsme lepili na podložní sklíčka pomocí glycerinu s bílkem.

Před barvením jsme řezy odparafinovali řadou xylen, sestupná alkoholová řada, voda. Na řezech jsme provedli barvení hematoxylin – eosin, zelený trichrom a PAS (Periodic Acid Schiff). Po vlastním barvení jsme provedli odvodnění pomocí vzestupné alkoholové řady a projasnění xylenem. Obarvené řezy jsme zamontovali do kanadského balzámu.

U pokusu 1666 jsme nakrájené řezy nanesli na podložní sklíčko s redestilovanou vodou, po jejím odpaření jsme provedli barvení 1% toluidinovou modří. Po obarvení jsme na řezy nakapali 50% ethanol, nechali diferencovat a poté slili a opláchnuli redestilovanou vodou. Řezy jsme nechali osušit a zamontovali je do pryskyřice.

Hodnocení preparátů jsme prováděli v mikroskopu Hund Wetzlar V300. Dokumentaci pokusů 1531, 1559 jsme pořizovali pomocí digitální kamery Pixe - LINK PL-A642, Vitana Corp., USA, světelného mikroskopu Nikon Eclipse E200, Japan a programu LUCIA, verze 5.0, Laboratory Imaging, Praha, s.r.o.

U pokusu 1666 jsme dokumentaci pořizovali digitální kamerou Pixe - LINK PL-A642, Vitana Corp., USA, světelným mikroskopem Olympus AX7O a pomocí programu NIS – ELEMENTS AR 2.30.

4.3 Postupy zpracování vzorků

Postup fixace a zalití tkání do parafinu, metody barvení hematoxylin – eosin, zelený trichrom, PAS – Periodic Acid Schiff jsou popsány detailně v diplomové práci.[29]

4.3.1 Příprava a zalití do epoxidových pryskyřic, barvení toluidinovou modří

Epoxidové pryskyřice se v uzavřených lahvičkách musí nechat 24 hodin ustálit při pokojové teplotě. Pryskyřice se míchají v kádince na elektromagnetické míchačce za pomalých otáček v digestoři. Jednotlivé složky pryskyřice se přidávají dle návodu a mezi přidáními složek je nutné směs promíchávat alespoň 5 minut. Po přidání poslední složky se směs míchá 30 minut. Namíchaná směs pryskyřice se uchovává v uzavřené injekční stříkačce při pokojové teplotě. Na prosycení a zalití 1 vzorku tkáně do bločku je potřeba 5 ml pryskyřice.

Epoxidové pryskyřice :

Směs EPON – DURKUPAN:

Epon 812	2,5 ml
DURKUPAN modrý	5,5 ml
DURKUPAN červený	1,5 ml
DURKUPAN žlutý	0,2 ml
DURKUPAN zelený (dle vlhkosti vzduchu)	0,1 ml – 0,35 ml

1.) 1% toluidinová modř

redestilovaná voda	50 ml
toluidinová modř	1 g
boritan sodný	1 g

2.) 1% pyronin

redestilovaná voda	50 ml
pyronin	0,5 g
boritan sodný	0,5 g

3.) barvicí roztok

1% toluidinová modř	40 ml
1% pyronin	10 ml
redestilovaná voda	30 ml

Barva se ponechá několik dní zrát v lednici při 5°C a před barvením se přefiltruje.

Výsledek barvení : zvýrazněny složky monocyto-fagocytárního systému a částice obsahující lipidy.

5 Výsledky

5.1 Výsledky makroskopických pozorování

Sestavili jsme tabulku z naměřených hodnot získaných při odběrech. V každém z pokusů bylo použito 5 potkanů, v pokusu 1531 jeden z pokusných potkanů z neznámých příčin uhynul po operaci, proto máme odebrány tkáně z celkem 4 pokusných zvířat v časovém intervalu 7 dnů po operaci. V časovém intervalu 6 dnů po operaci (1559) a 12 dnů po operaci (1666) jsme vždy odebrali tkáně z 5 potkanů.

Kryptorchismus, časový interval 7 dnů, mokré hmotnosti a délky varlat

Injekční aplikace sodno-vápenaté soli MDOC, unilaterální kryptorchismus, 1531				
číslo potkana	hmotnost abdominální varle (g)	hmotnost skrotální varle (g)	délka abdominální varle (mm)	délka skrotální varle (mm)
1	0,8	1,6	18	23
2	1,6	1,6	23	23
3	0,8	1,8	19	23
4	1,1	1,9	18	25

Potkan č.2 byl kontrolní. Hmotnosti i délky abdominálních varlat jsou oproti kontralaterálním skrotálním nižší.

Kryptorchismus, časový interval 6 dnů, mokré hmotnosti a délky varlat

Aplikace sodno-vápenaté soli MDOC, unilaterální kryptorchismus, 1559				
číslo potkana	hmotnost abdominální varle (g)	hmotnost skrotální varle (g)	délka abdominální varle (mm)	délka skrotální varle (mm)
1	0,9	1,9	22	27
2	1,3	2,2	20	24
3	1,0	2,0	22	25
4	1,3	1,9	24	27
5	1,5	1,8	26	24

Potkan č.5 byl kontrolní, je fyziologické, že hmotnost levého a pravého varlete se může lišit o několik desetin gramu. Hmotnosti a délky abdominálních varlat jsou oproti kontralaterálním skrotálním nižší, ale méně výrazně než po injekční aplikaci sodno-vápenaté soli MDOC pod tunica albuginea v pokusu 1531.

Aplikace gelu sodno-vápenaté soli MDOC, časový interval 12 dnů, hmotnost potkana před operací, před odběrem, délky varlat při odběru

Aplikace gelu sodno-vápenaté soli MDOC, abdominální varle, 1666				
číslo potkana	hmotnost před operací (g)	hmotnost před odběrem (g)	délka operované varle (mm)	délka skrotální varle (mm)
1	240	340	17	21
2	260	300	20	20
3	260	360	16	20
4	280	380	18	21
5	240	320	20	20

Potkan č.5 byl kontrolní, délky abdominálních varlat se od skrotálních příliš neliší, u 3 potkanů jsou mírně zmenšené. Hmotnostní přírůstek v průběhu 12 dnů od operace poukazuje na dobrý zdravotní stav zvířat.

5.2 Výsledky histologického hodnocení

Hodnocení jsme prováděli u každého zvířete na řezech obarvených základním barvením hematoxylin – eosin, zelený trichrom i PAS a toluidinová modř.

Hodnocení histologických preparátů jsem řadila podle časových intervalů kryptorchismu a operativní aplikace sodno-vápenaté soli MDOC.

5.2.1 Interval 6 dnů, aplikace sodno-vápenaté soli MDOC, unilaterální kryptorchismus

Stratifikace zárodečného epitelu byla narušena vakuolizací a přítomností velkých mnohojaderných buněk (obr.1). V okolí cév a pod tunica albuginea jsme pozorovali aktivované makrofágy, jejichž množství lze pokládat za fyziologické.

5.2.2 Interval 7 dnů, injekční aplikace sodno-vápenaté soli MDOC, unilaterální kryptorchismus

V semenotvorných kanálcích jsme pozorovali bohatou cytologickou výbavu (obr.2), i když některé kanálky byly vyplněny téměř výhradně Sertoliho buňkami. Cytoplazma Sertoliho buněk byla výrazně rozvětvena. Směrem od bazální membrány, která se jevila jako rovnější, jsme viděli na bázi tmavá jádra spermatogonií, některá podléhala degeneraci. Další vrstvy směrem k luminu jsou tvořeny jádry a těly Sertoliho buněk a k nim jsou přiřazena vývojová stádia zárodečného epitelu od spermatocytu I (velké buňky) po spermatozoa. U všech těchto stádií však lze pozorovat znaky degenerace od pyknózy jader po silnou eozinofilii cytoplazmy.

Na přehledném příčném řezu varletem jsme pod eozinofilní vrstvou tunica albuginea pozorovali příčné řezy stočenými semenotvornými kanálky a změřili jejich průměr. Průměr tubulů se výrazně odlišoval v závislosti na tom, zda tubuly neobsahovaly téměř žádné buňky germinativního epitelu a nebo

pokud v nich byla přítomná stádia zárodečného epitelu. Stádia zárodečného epitelu se jevila degenerovaná.

Randomizačním měřením jsme stanovili tloušťku 80, 100, 150 až 200 μm u tubulů bez zárodečného epitelu. Tubuly se zárodečným epitelem měly průměr podstatně vyšší a to nad 200 μm. Porovnat lze s kontrolními varlaty (obr.3).

Domníváme se, že v souvislosti s injekční aplikací sodno-vápenaté soli MDOC, jsme pozorovali velké množství makrofágů (obr.4, obr.5). Aktivované makrofágy i monocyty (rohlíčkovitý tvar jádra) jsme pozorovali v intersticiu, v okolí kanálků a cév zásobujících intersticium (obr.4.). Pod vrstvou tunica albuginea v místě injekčního vpichu MDOC jsme nalezli početné ložisko makrofágů, které jsou zvýrazněné PAS barvením (obr.5).

Sledovali jsme začáteční stádia mnohojaderných buněk představující non-dysjunkci jader při mitotickém dělení zárodečné buňky. Na obrázku 1, ale i v detailu na obrázku 6 lze vidět, že jádra mnohojaderných buněk jsou většinou uložena po okrajích buňky v počtu 5 až 20 v silně eozinofilní cytoplazmě. Jádra jsme pozorovali s chromatinem rozprostřeným i srpkovitým.

Na obrázku 7 jsme v intersticiu pozorovali ostrůvky Leydigových buněk v okolí cév. Fyziologicky mají měchýřkovitý tvar, zde jsou svraštělé (srovnání viz kontrola obr.3).

5.2.3 Interval 12 dnů, aplikace gelu sodno-vápenaté soli MDOC do abdominálně umístěného varlete po nastřižení jeho hrotu, 1666

Na obrázku 8 lze pozorovat edematózní intersticium, které je odtržené od semenotvorných kanálků. Kanálky nesou znaky poruchy vyzrávání zárodečných buněk, v širokých luminech kanálků se vyskytuje populace degenerovaných a non-dysjunkčních forem vývojové řady spermatických buněk.

Výstelka kanálků nadvarlete (obr.9) byla prázdná a nejevila znaky zánětu.

V místě porušení tunica albuginea jsme pozorovali přítomnost buněk zánětu (obr.10). Zánětlivě infiltrované intersticium mělo ložiskový charakter

v apikální části varlete jako důsledek porušení jeho obalu injekční aplikací sodno-vápenaté soli MDOC. V okolí cévního řečiště a v okolním intersticiu jsme pozorovali též rozsáhlou degeneraci zárodečného epitelu kanálků. Vnitřek kanálků byl silně eozinofilní, růžově zbarvený, došlo v něm ke kompletní destrukci tubulárních struktur.

V detailu kanálku (obr.11) lze vidět makrofágy. Pozorovali jsme i nediferencované monocyty a dělící se makrofágy. V místě, kde byla poškozená tunica albuginea se vyskytoval i výrazný kulatobuněčný infiltrát, lymfocyty.

Barvením toluidinovou modří se zviditelnily další složky monocyto – fagocytárního systému (obr.12). Zejména v centrální části infiltrátu se objevily mnohojaderné buňky.

V makrofázích lze pozorovat zfagocytované tmavě zbarvené částečky lipidových pigmentů vyniklé barvením toluidinovou modří (obr.13). Lipidový pigment se uvolňuje například z rozpadlých membrán a makrofágy, které se dostaly do nitra poškozených tubulů odstraňují fagocytózou degenerovaný materiál.

Semenotvorné kanálky s poškozenou spermatogenezí byly výrazně rozšířené (obr.14) a obsahovaly různé formy zániku zárodečného epitelu. Dobře lze porovnat s kontrolním varletem (obr.15).

Bezprostředně u místa vpichu MDOC pod tunica albuginea jsme v ložisku degenerace pozorovali početnou populaci makrofágů (obr.17, 18). Nejvíce eozinofilní kanálky lze pozorovat na (obr. 16). Makrofágy se vyskytovaly v hojném počtu a v detailu (obr.18) jsme nalezli vysoký počet buněk s černými granuly, mastocyty.

5.2.4 Kontrolní varlata a nadvarlata

Na snímku kontrolního varlete (obr.3) jsme náhodně proměřili průměr kanálků, pohyboval se kolem 200 μm. Semenotvorné kanálky obrázku 3 a 14 obsahují kompletní populaci germinativních buněk.

U kontrolních nadvarlat jsme pozorovali reziduální tělíska a hlavičky spermií.[28]

Na obr.3 jsou průřezy kanálky s volným lumen s normální spermatogenezí a vedle nich jsou kanálky s normální spermatogenezí, avšak lumen těchto kanálků je vyplněno shlukem zárodečných buněk v různých stádiích vývoje, přítomny jsou i patologicky uvolněné nezralé buňky. Uvolňování nezralých stádií takovýmto způsobem je popisováno jako artefakt související s odběrem biologického materiálu.

6 Diskuse

Pro studium poškození funkce hematotestikulární bariéry se experimentálně využívá unilaterálního i bilaterálního kryptorchismu a to jednak navozeného operací či ovlivněním hormonálního stavu v prenatálním až brzkém postnatálním období a nebo získaného vrozenou mutací. Používají se zvířecí modely srovnatelné s lidským modelem (potkani, myši, opice, vepři, králíci atd.).[10, 31]

Kryptorchismus je poměrně častá porucha formování pohlavního systému novorozených chlapců a může indukovat abnormality v testikulárních buňkách.

Vědecký výzkum v oblasti kryptorchismu je velmi široký, přesto příčiny a mechanismy všech změn při kryptorchismu nastávajících nejsou zcela jasné.

V našem experimentu jsme použili operační navození unilaterálního kryptorchismu u potkanů standardní metodou prováděnou na Katedře biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy. V časových intervalech 6, 7 a 12 dnů jsme sledovali vliv sodno-vápenaté soli MDOC v souvislosti s experimentálním unilaterálním kryptorchismem.
V časovém intervalu 6 dnů jsme abdominálně umístěné varlete zevně potřeli roztokem 1% sodno-vápenaté soli MDOC, v čas. intervalu 7 dnů jsme 1% roztok sodno-vápenaté soli MDOC aplikovali injekčně do horního pólu abdominálně umístěného varlete.
V časovém intervalu 12 dnů jsme aplikovali gel sodno-vápenaté soli MDOC na abdominálně umístěné varle s nastřiženým hrotem. Při tomto pokusu jsme ovšem nepřerušili m. cremaster a nebylo tudíž chirurgicky zabráněno sestupu abdominálně umístěnému varleti.

Hodnotili jsme změny varlat a nadvarlat v různých časových intervalech po navození experimentálního unilaterálního kryptorchismu a současné aplikaci sodno-vápenaté soli MDOC makroskopicky a mikroskopicky pomocí optického světelného mikroskopu. Histologické metody barvení, které jsme použili jsou hematoxylin – eosin, zelený trichrom, PAS (Periodic Acid Schiff) a toluidinová modř.

Odchylky hmotností a délek kryptorchických varlat od kontralaterálních skrotálních i skrotálních varlat kontroly jsme zaznamenali v časových intervalech 6 dnů i 7 dnů. Došlo ke snížení hmotnosti a délky kryptorchických varlat. V časovém intervalu 12 dnů jsme u abdominálních varlat pozorovali velmi malé snížení délky oproti kontralaterálním skrotálním a skrotálním kontroly. Udává se postupné snižování hmotnosti kryptorchických varlat u potkanů či myší se signifikantním poklesem ve dni 7 od operace a dlouhodobější sledování udává další pokles hmotnosti mezi dny 8 až 16 u unilaterálního kryptorchismu.[10] Někteří autoři uvádí nárůst hmotnosti u kontralaterálního skrotálního varlete po navození unilaterálního kryptorchismu, ale postupně až do 6 až 12 týdnů od operace a poté její ustálení.[31]

Je mnohými výzkumy potvrzeno, že v kryptorchických varlatech se s časem zmenšuje průměr semenotvorných kanálků, snižuje se počet zárodečných buněk a nastává postupně degenerace germinativního epitelu.[3, 9, 10, 31]

V preparátech připravených z tkání v časovém intervalu 6 dnů, po aplikaci 1% roztoku sodno-vápenaté soli MDOC jsme pozorovali znatelnou vakuolizaci zárodečného epitelu, byly přítomny velké mnohojaderné buňky. Výskyt obřích mnohojaderných buněk je uváděn ve dni 7 po navození experimentálního unilaterálního kryptorchismu u potkanů v abdominálních varlatech s jejich maximálním počtem ve dni 5.[10]

Některé zárodečné buňky byly zdegenerované. Na řezech obarvených metodou PAS daly PAS pozitivní reakci nejen akrozomální komponenty u plně konfigurovaných spermatozoí a mnohojaderných buněk, objevili jsme i PAS barvením zdůrazněné aktivované makrofágy, jejichž množství však bylo možno pokládat za fyziologické. Monocyty a makrofágy reprezentují běžnou buněčnou populaci v intersticiu varlat potkanů i člověka. Udává se, že regulace jejich počtu je závislá na Leydigových buňkách.

V preparátech z časového intervalu 7 dnů po injekční aplikaci 1% roztoku sodno-vápenaté soli MDOC pod tunica albuginea jsme sledovali jednak změny

typické pro experimentální unilaterální kryptorchismus , ale i překvapivé změny nejspíše související s aplikací této látky.

Průměr semenotvorných kanálků jsme proměřili na náhodně vybraných kanálcích přehledného příčného řezu, výrazně se odlišoval v závislosti na obsahu buněk zárodečného epitelu. Kanálky obsahující buňky zárodečného epitelu měly průměr kolem 200 μm, u kanálků, jež téměř neobsahovaly buňky zárodečného epitelu, byl zjištěný průměr nižší a to většinou od 80 do 150 μm. Znatelný pokles průměru tubulů je popisován právě ve dni 7 navozeného kryptorchismu.[10] Buňky zárodečného epitelu obsažené v kanálcích jevily degeneraci.

Nalezli jsme kanálky vyplněné výhradně podpůrnými Sertoliho buňkami s jenom ojedinělými zárodečnými buňkami. Barvením HE jsme podle výrazné eozinofilie cytoplazmy a tmavých pyknotických jader usoudili, že zárodečné buňky podléhaly apoptotické smrti.

V intersticiu jsme pozorovali ostrůvkovitě uspořádané svraštělé Leydigovy buňky.

V jiných kanálcích jsme nalezli větší množství zárodečných buněk, u bazální membrány spermatogonie podléhající apoptóze, u lumen kanálku byla na těla Sertoliho buněk napojena další vývojová stádia semenotvorného epitelu, jež projevovala taktéž rysy degenerace. V kanálcích jsme nalezli obrovské mnohojaderné buňky.

Neobvyklým jevem v tomto časovém období experimentálního kryptorchismu bylo objevení kanálků s kompletně dezintegrovanou stavbou zárodečného epitelu. Těla podpůrných buněk byla poškozena, lumen kanálku vyplňovaly volně uložené eozinofilní zárodečné buňky a mezi nimi se objevovaly amorfní shluky sférického eozinofilního materiálu. Prázdné lumen většiny semenotvorných kanálků s fibrózním materiálem a vyplněné vakuolami je popisováno ve dni 15 po operaci u kryptorchického varlete.[10]

Dalším atypickým nálezem byly shluky aktivovaných makrofágů. Nevyskytovaly se pouze pod vrstvou tunica albuginea u místa vpichu, ale i ve vztahu ke stěně kanálku, vyživujícím cévám a v intersticiu.

U kontrolních a kontralaterálních skrotálních varlat jsme nepozorovali poškození, kromě uvolněných nezralých buněk v lumen několika kanálků, což souvisí s nekropsií. Existují i studie popisující změny u kontralaterálního skrotálního varlete při unilaterálním kryptorchismu,[29] například snížení počtu pozdních spermatid, my jsme podobné změny v námi hodnoceném časovém období neobjevili.

V preparátech z časového intervalu 12 dnů po aplikaci gelu sodno-vápenaté soli MDOC na abdominálně umístěné varle, u kterého byl nastřižen jeho hrot, jsme v širokých luminech kanálků pozorovali degenerované a non-dysjunkční formy vývojové řady spermatických buněk. Rozsáhlá degenerace zárodečného epitelu byla zejména v kanálcích okolo oblasti injekčního vpichu pod tunica albuginea, kde došlo k porušení obalu varlete. V bezprostřední blízkosti místa vpichu sodno-vápenaté soli MDOC byla ložiska masivní zánětlivé infiltrace, v jejichž dosahu došlo ke kompletní destrukci tubulárních struktur a též intersticium zde bylo výrazně zánětlivě infiltrované. Kanálky se jevily silně eozinofilní, vyplněné nekrotickým infiltrátem. Zejména v centrální části infiltrátu jsme pozorovali další složky monocyto-fagocytárního systému, mnohojaderné buňky. V okolí byly též znatelné hojně zastoupené kulatobuněčné lymfocyty i nediferencované monocyty. Ve vzdálenějších částech od místa vpichu, ve výrazně rozšířených a poškozených tubulech fagocytovaly makrofágy degenerované součásti, zejména lipidy, zvýrazněné barvením toluidinovou modří. Některé kanálky se jevily prázdné, měly zcela zfagocytovaný obsah. V okolí kanálků jsme nalezli i vyšší počet mastocytů. Další kanálky byly opět výrazně rozšířené a obsahovaly různé formy zániku zárodečného epitelu.

Při hodnocení změn v časovém intervalu 12 dnů lze ze zastoupení složek MF systému usuzovat na vznik zánětu chronického charakteru.[12, 33] Byly

přítomny přeměněné mastocyty mnohojaderné buňky, aktivované makrofágy, lymfocyty a nikoliv neutrofily.

Možných mechanismů vedoucích k poškození zárodečného epitelu a apoptotické smrti zárodečných buněk při kryptorchismu je více, vedle porušení osy hypothalamus – hypofýza – varle jím pravděpodobně může být snížení intratestikulární hladiny testosteronu.[10] Důležité je poškození Sertoliho buněk mající za následek nedostatečnou funkci hematotestikulární bariéry a z toho vyplývají následky vedoucí až ke ztrátě zárodečného epitelu.

Pro přesnou identifikaci apoptózy se používají metody jako je např. TUNEL analýza.[32] My jsme použili méně citlivou klasickou metodu histologického barvení a vyhodnocení optickým mikroskopem.

Sodno-vápenatá sůl MDOC jak v případě časových intervalů 6 a 7 dnů, tak v intervalu 12 dnů způsobila aktivaci monocyto-fagocytárního systému.

Z intenzivnější odpovědi monocyto-fagocytárního systému v časovém intervalu 12 dnů, kde byl při aplikaci látky MDOC nastřižen hrot varlete, můžeme usuzovat, že sodno-vápenatá sůl MDOC jako biodegradabilní materiál zesiluje signál pro migraci monocyto-fagocytárního systému.

7 Závěr

Pokusným modelem pro sledování změn v zárodečné tkáni po navození experimentálního kryptorchismu s aplikací sodno-vápenaté soli MDOC byli dospělí samci laboratorního potkana kmene Wistar. Byli chovaní za standardních podmínek ve viváriu fakulty. U experimentálních jedinců byl navozen unilaterální kryptorchismus a u abdominálního varlete injekčně či zevně a u pokusu v časovém intervalu 12 dnů injekčně i zevně aplikována sodno-vápenatá sůl MDOC zavedenou operační technikou prováděnou na katedře. U každé skupiny byla provedena u jednoho zvířete slepá operace – kontrolní zvíře.

Varlata a nadvarlata lokalizovaná abdominálně i fyziologicky byla odebrána v časových intervalech 6, 7 a 12 dnů po operaci. Byla změřena jejich dlouhá osa, u pokusů v časových intervalech 6 a 7 dnů též stanovena mokrá hmotnost. Vzorky tkání byly zpracovány standardní technikou a vyšetřeny histologickými metodami. Hodnocení bylo optické světelným mikroskopem.

Histologická analýza pomocí světelného mikroskopu prokázala v intervalu 6 dnů se zevní aplikací 1% roztoku sodno-vápenaté soli MDOC u abdominálně umístěného kryptorchického varlete degeneraci části zárodečných buněk. Byly přítomny velké mnohojaderné buňky, makrofágy v množství, jež lze pokládat za fyziologické a zárodečný epitel byl porušen vakuolizací.

V intervalu 7 dnů po navození unilaterálního kryptorchismu a injekční aplikaci 1% roztoku sodno-vápenaté soli MDOC pod tunica albuginea abdominálního varlete jsme nalezli více změn v porovnání s řezy kontrolními varlaty. Některé semenotvorné kanálky obsahovaly směrem od bazální membrány spermatogonie, z nichž část podléhala apoptóze, směrem k lumen jsme pozorovali těla a jádra Sertoliho buněk, k nim byla přiřazena další vývojová stádia germinativního epitelu, z nichž některé buňky taktéž jevily známky apoptotické smrti. Jiné tubuly obsahovaly téměř výhradně těla Sertoliho buněk téměř bez přítomnosti buněk zárodečného epitelu. Kanálky bez germinativního epitelu měly podstatně menší průměr v porovnání s kanálky obsahujícími zárodečný epitel. Nalezli jsme i kanálky, které překvapivě už

v tomto období měly silně porušené Sertoliho buňky a jejich lumen bylo vyplněno volně uloženými buňkami s projevy degenerace a mezi nimi byl přítomný amorfní eozinofilní materiál. V řezech v místě vpichu injekce sodno-vápenaté soli MDOC i v okolí cév varlete a v intersticiu se objevila PAS pozitivní ložiska makrofágů. Sledovali jsme velké mnohojaderné buňky.

V intervalu 12 dnů při aplikaci gelu sodno-vápenaté soli MDOC na abdominálně umístěné varle, u něhož byl operačně nastřižen hrot, jsme sledovali rozsáhlou degeneraci zárodečného epitelu. V bezprostřední blízkosti místa vpichu sodno-vápenaté soli MDOC byla ložiska masivní zánětlivé infiltrace, v jejichž dosahu došlo ke kompletní destrukci tubulárních struktur a též intersticium zde bylo výrazně zánětlivě infiltrované. Rozšířené kanálky se jevily silně eozinofilní, vyplněné nekrotickým infiltrátem. Zejména v centrální části infiltrátu jsme pozorovali mnohojaderné buňky. V okolí byly též znatelné hojně zastoupené kulatobuněčné lymfocyty i nediferencované monocyty. Ve vzdálenějších částech od místa vpichu, ve výrazně rozšířených a poškozených tubulech fagocytovaly makrofágy degenerované hlavně lipidické složky. Některé kanálky se jevily prázdné, měly zcela zfagocytovaný obsah. V okolí těchto kanálků jsme nalezli i vyšší počet mastocytů. Další kanálky byly opět výrazně rozšířené a obsahovaly různé formy zániku zárodečného epitelu. Směrem od apikální části varlete byly kanálky méně rozšířené a nejevily výraznou eozinofilii, v intersticiu se nenacházely téměř žádné makrofágy.

Při hodnocení změn v časovém intervalu 12 dnů lze ze zastoupení složek monocyto-fagocytárního systému v souvislosti s aplikací sodno-vápenaté soli MDOC usuzovat na vznik zánětu chronického charakteru.

V časových intervalech 7 dnů a 12 dnů, kdy byla sodno-vápenatá sůl MDOC aplikována do abdominálního varlete injekčně a nastřižením hrotu varlete, došlo k zesílení signálu pro chemotaxi buněk monocyto-fagocytárního systému.

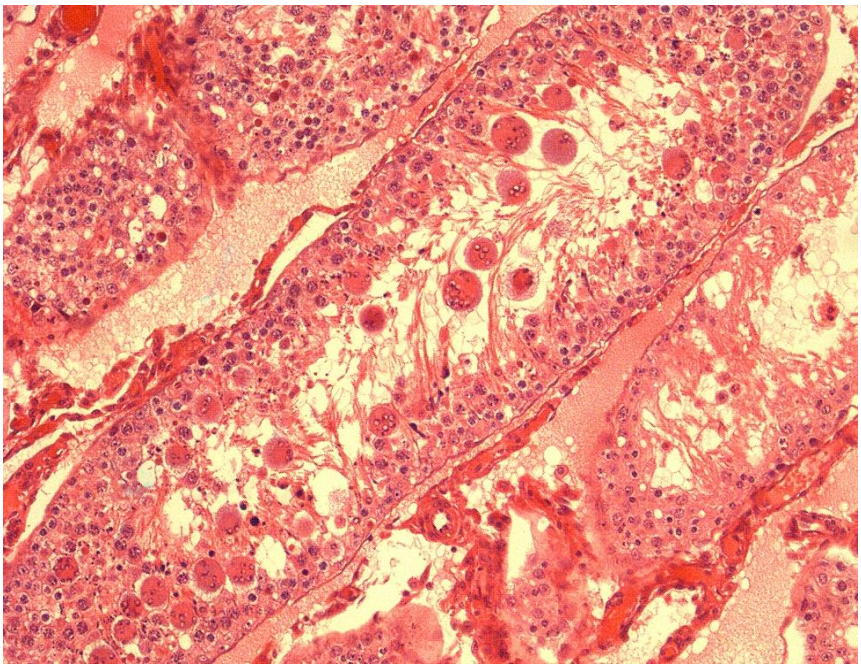
V časovém intervalu 12 dnů po aplikaci gelu sodno-vápenaté soli MDOC do abdominálního varlete po nastřižení jeho hrotu jsme pozorovali razantní změny v architektonice semenotvorných tubulů související nejspíše se vznikem zánětu.

Žádná z popisovaných změn nebyla pozorována u kontrolních varlat.

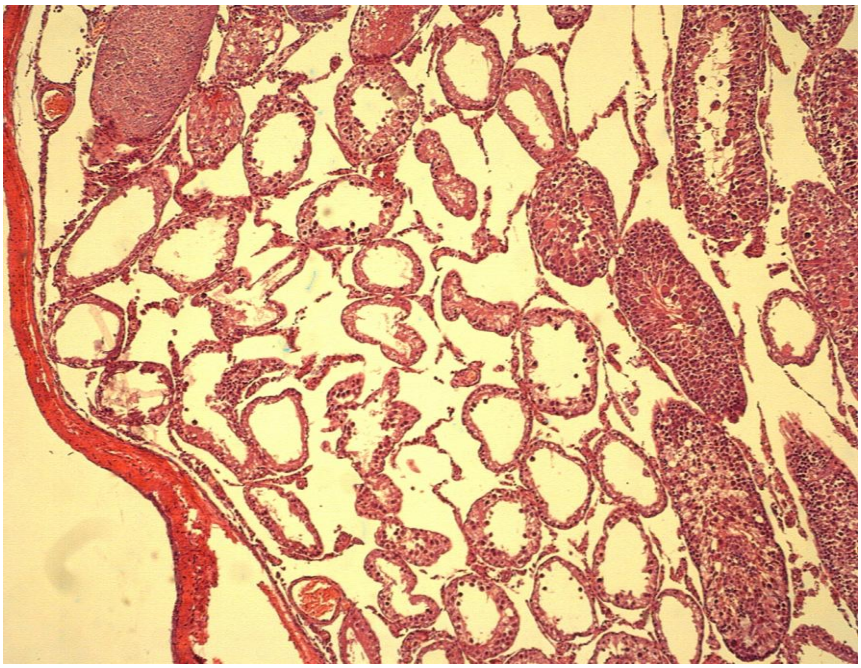
8 Obrazová příloha

Seznam obrázků :

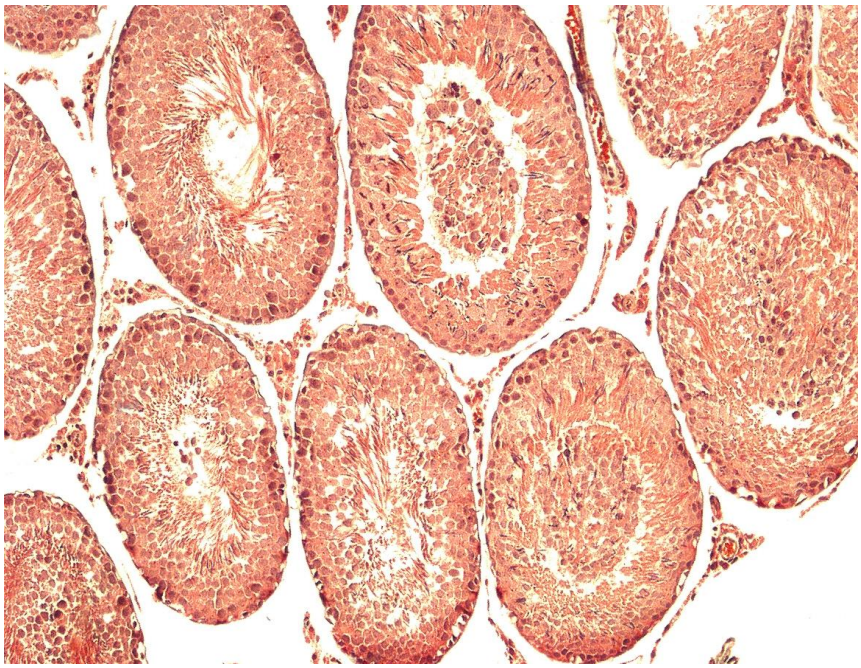
Obrázek 1 Kryptorchismus 6 dnů, varle, HE, zvětšeno 100x
Obrázek 2 Kryptorchismus 7 dnů, varle, HE, zvětšeno 40x
Obrázek 3 Kontrolní varle 7 dnů, varle, ZT, zvětšeno 100x
Obrázek 4 Kryptorchismus 7 dnů, varle, HE, zvětšeno 200x
Obrázek 5 Kryptorchismus 7 dnů, varle, PAS, zvětšeno 400x
Obrázek 6 Kryptorchismus 7 dnů, varle, HE, zvětšeno 400x
Obrázek 7 Kryptorchismus 7 dnů, varle, HE, zvětšeno 200x
Obrázek 8 Abdominální varle 12 dnů, ZT, zvětšeno 100x
Obrázek 9 Abdominální nadvarle 12 dnů, ZT, zvětšeno 100x
Obrázek 10 Abdominální varle 12 dnů, HE, zvětšeno 200x
Obrázek 11 Abdominální varle 12 dnů, HE, zvětšeno 400x
Obrázek 12 Abdominální varle 12 dnů, TM, zvětšeno 200x
Obrázek 13 Abdominální varle 12 dnů, TM, zvětšeno 400x
Obrázek 14 Abdominální varle 12 dnů, TM, zvětšeno 400x
Obrázek 15 Kontrolní varle 12 dnů, ZT, zvětšeno 100x
Obrázek 16 Abdominální varle 12 dnů, HE, zvětšeno 100x
Obrázek 17 Abdominální varle 12 dnů, TM, zvětšeno 200x
Obrázek 18 Abdominální varle 12 dnů, TM, zvětšeno 400x



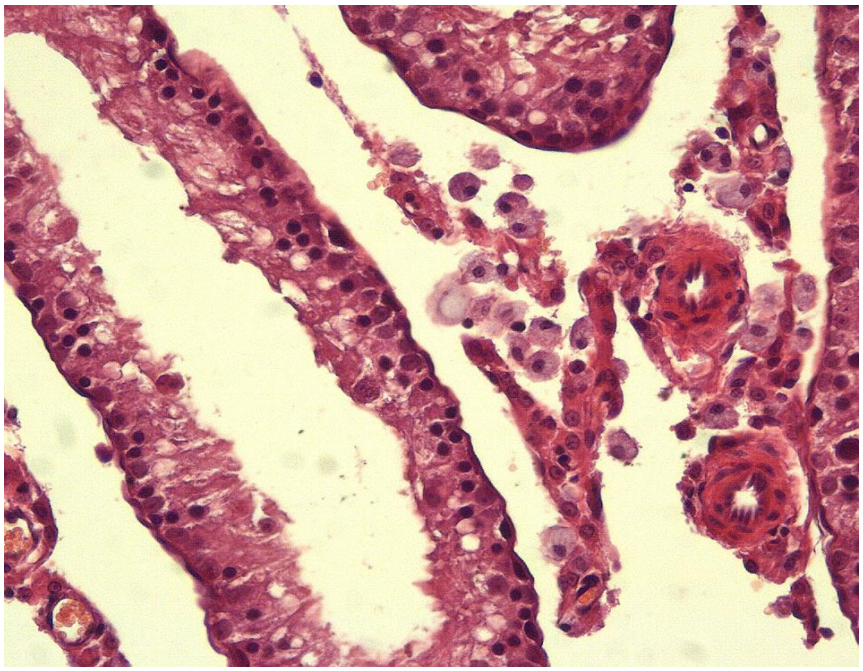
Obrázek 1 Kryptorchismus 6 dnů, varle, HE, zvětšeno 100x



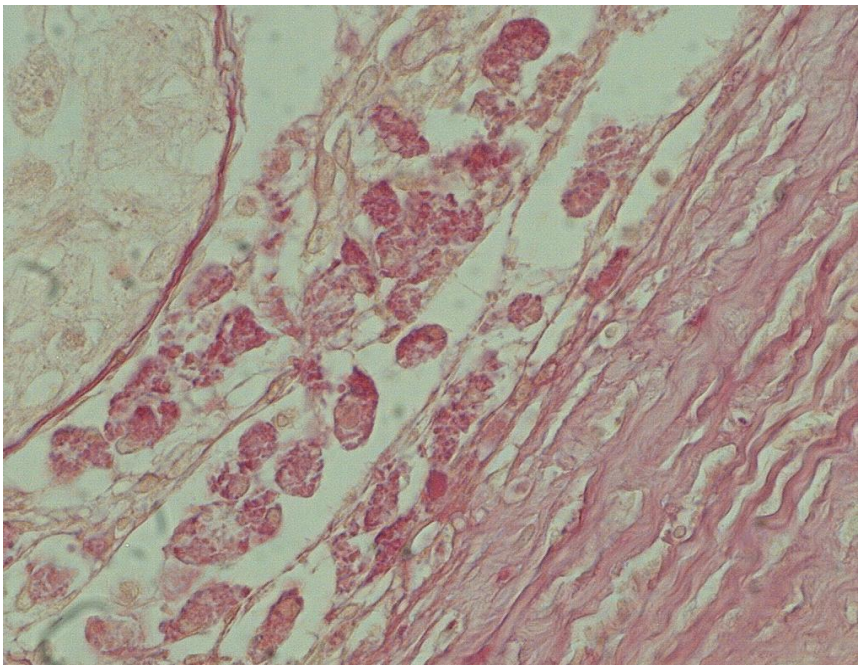
Obrázek 2 Kryptorchismus 7 dnů, varle, HE, zvětšeno 40x



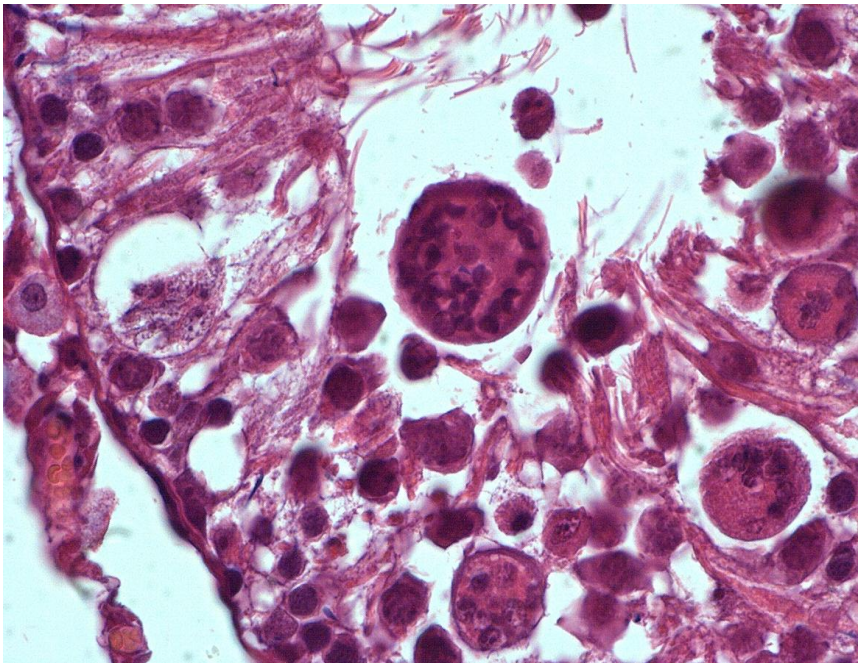
Obrázek 3 Kontrolní varle 7 dnů, varle, ZT, zvětšeno 100x



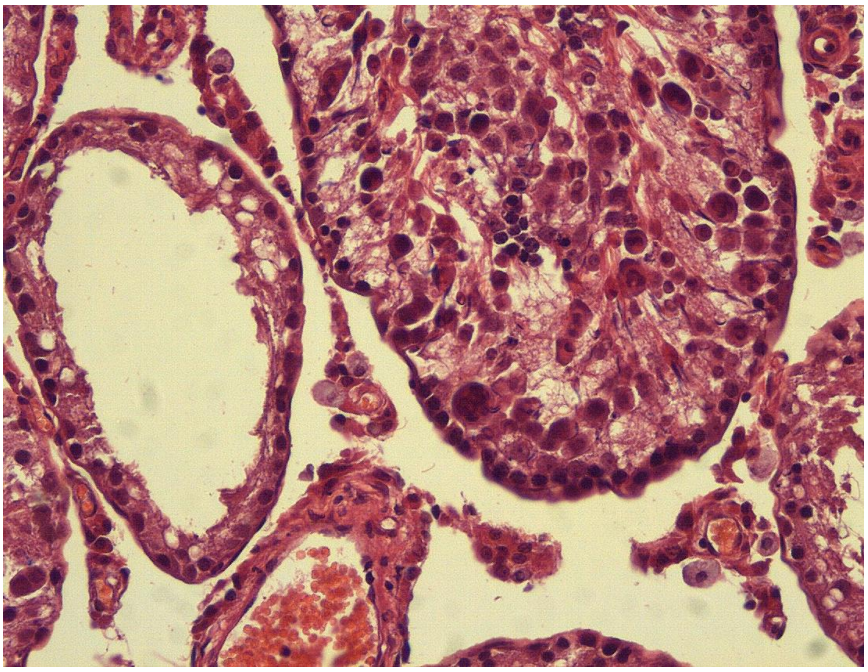
Obrázek 4 Kryptorchismus 7 dnů, varle, HE, zvětšeno 200x



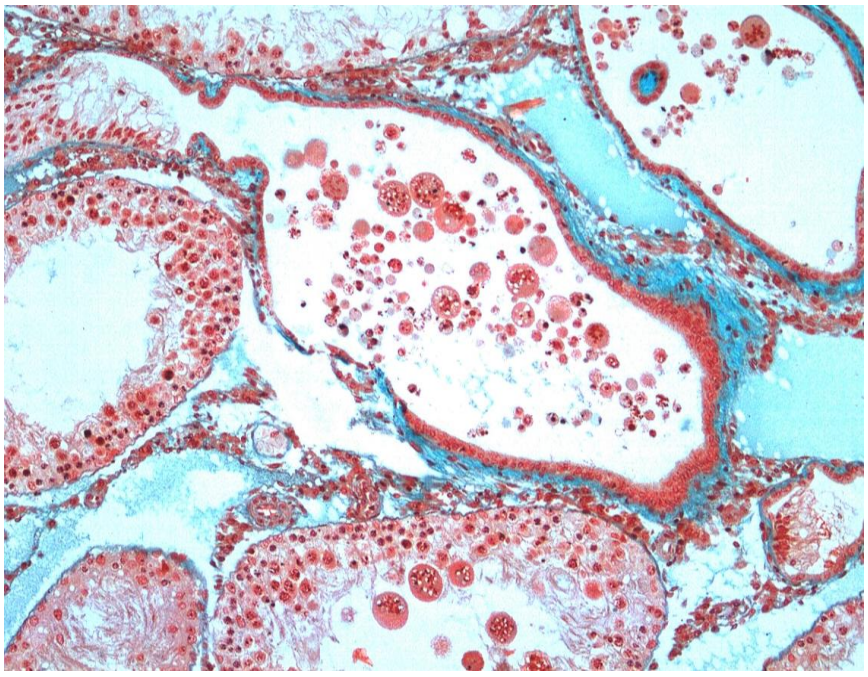
Obrázek 5 Kryptorchismus 7 dnů, varle, PAS, zvětšeno 400x



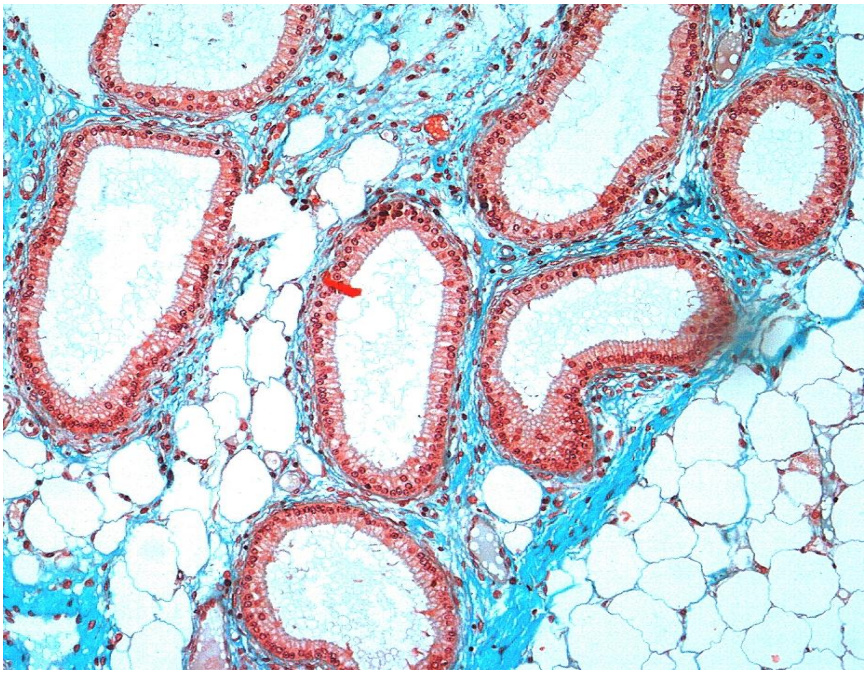
Obrázek 6 Kryptorchismus 7 dnů, varle, HE, zvětšeno 400x



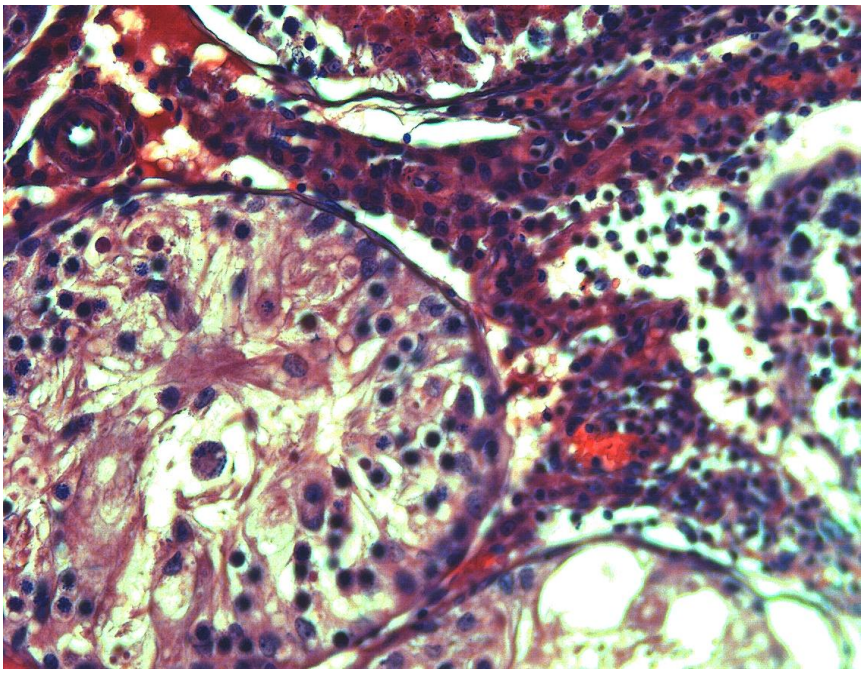
Obrázek 7 Kryptorchismus 7 dnů, varle, HE, zvětšeno 200x



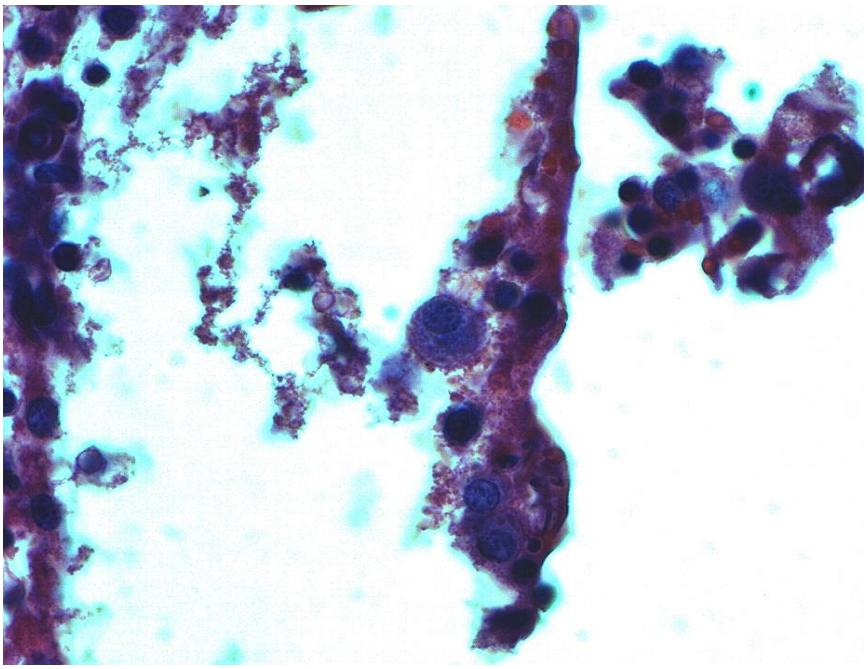
Obrázek 8 Abdominální varle, 12 dnů, ZT, zvětšeno 100x



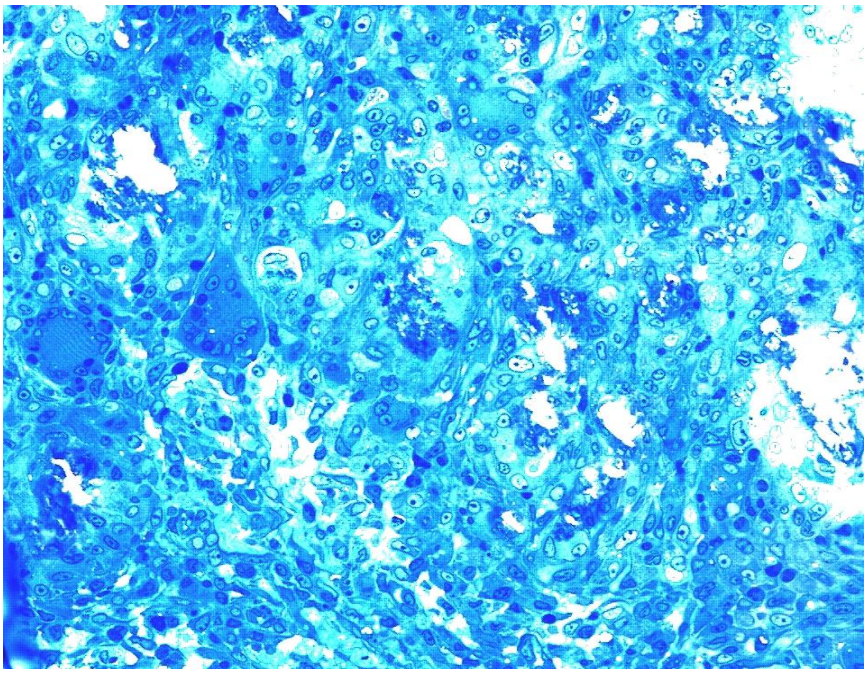
Obrázek 9 Abdominální nadvarle, 12 dnů, ZT, zvětšeno 100x



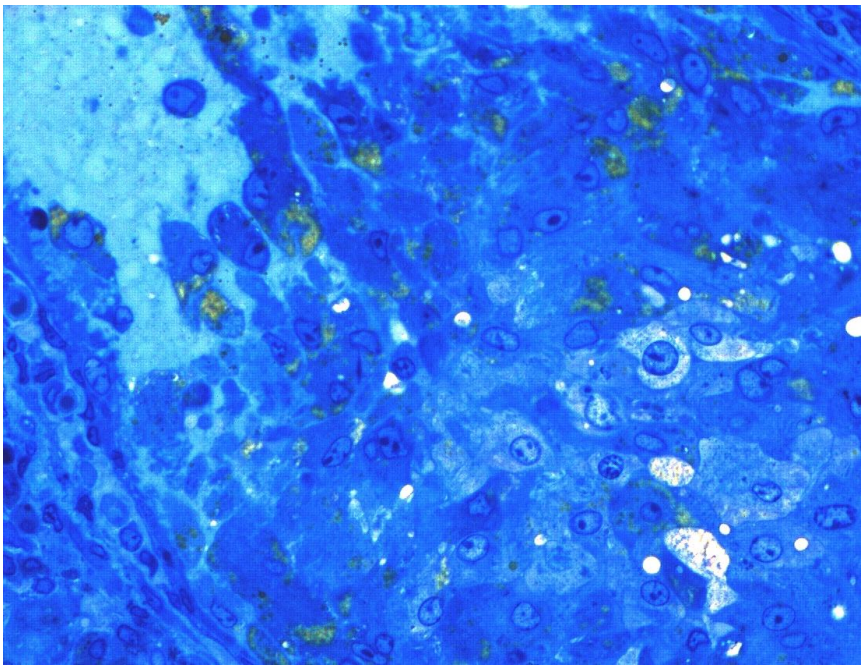
Obrázek 10 Abdominální varle, 12 dnů, HE, zvětšeno 200x



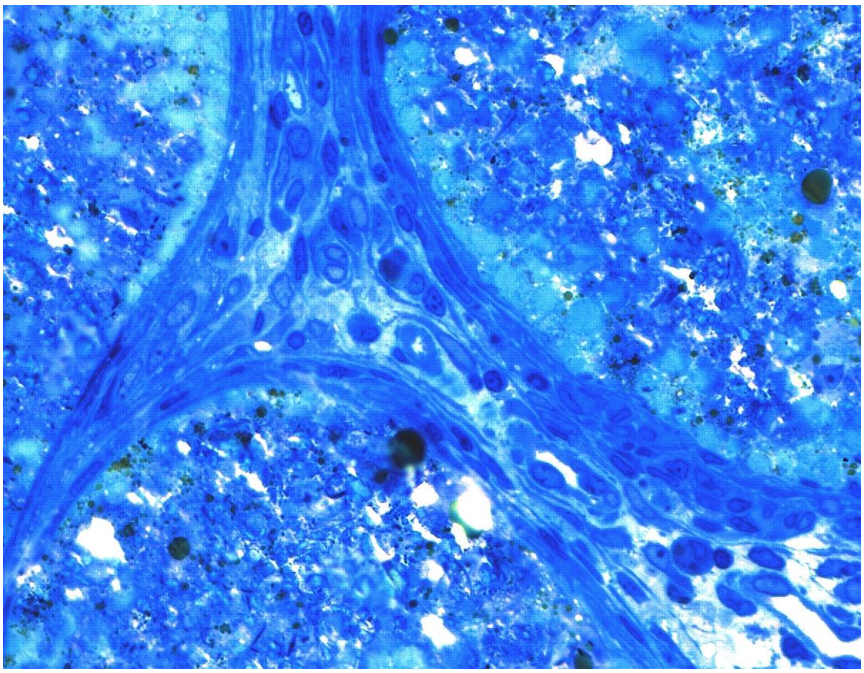
Obrázek 11 Abdominální varle, 12 dnů, HE, zvětšeno 400x



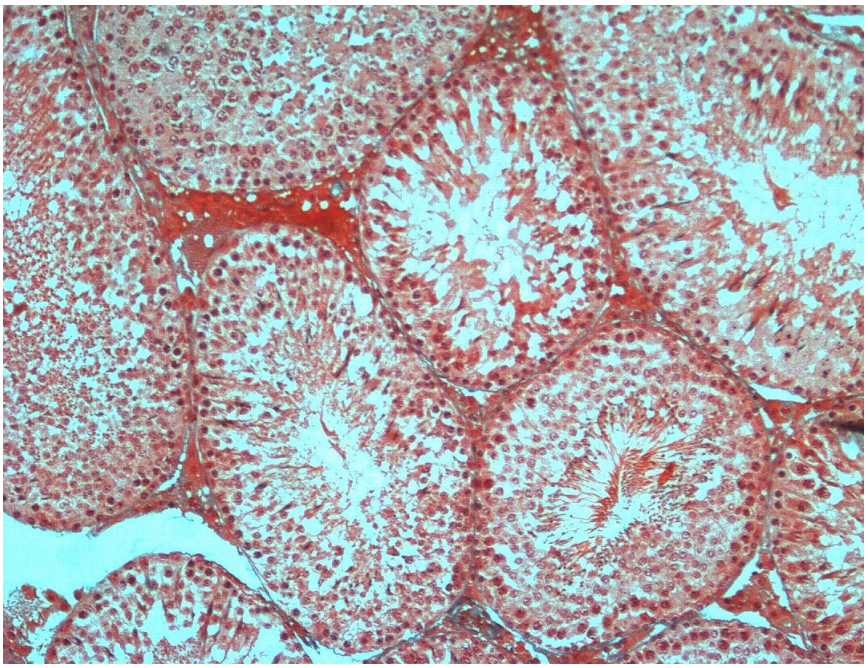
Obrázek 12 Abdominální varle, 12 dnů, TM, zvětšeno 200x



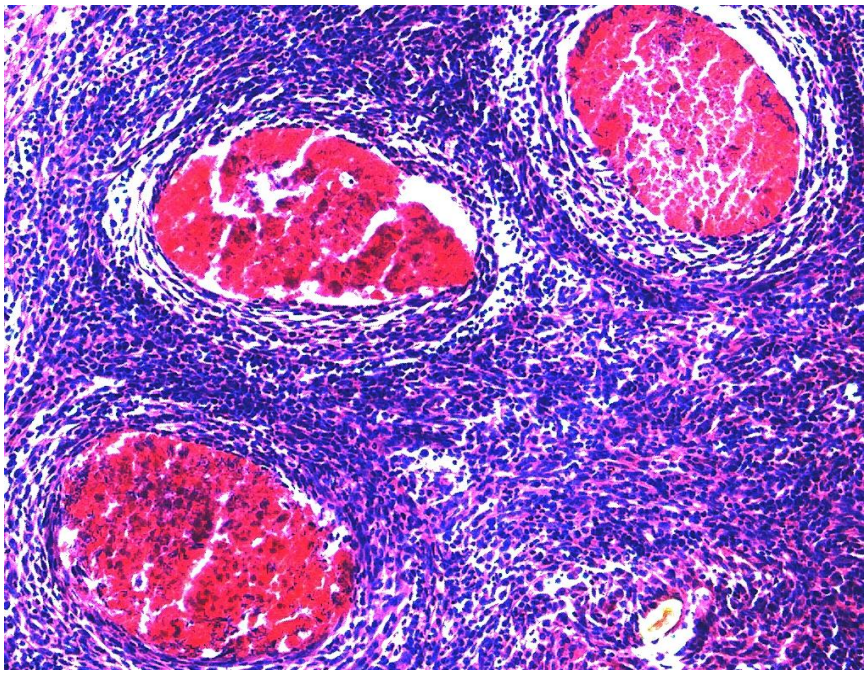
Obrázek 13 Abdominální varle, 12 dnů, TM, zvětšeno 400x



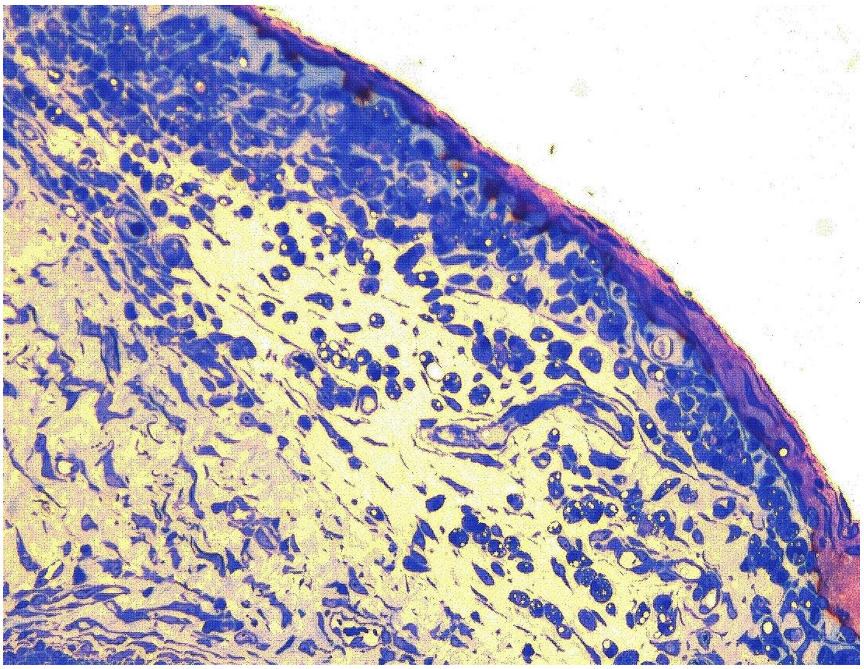
Obrázek 14 Abdominální varle, 12 dnů, TM, zvětšeno 400x



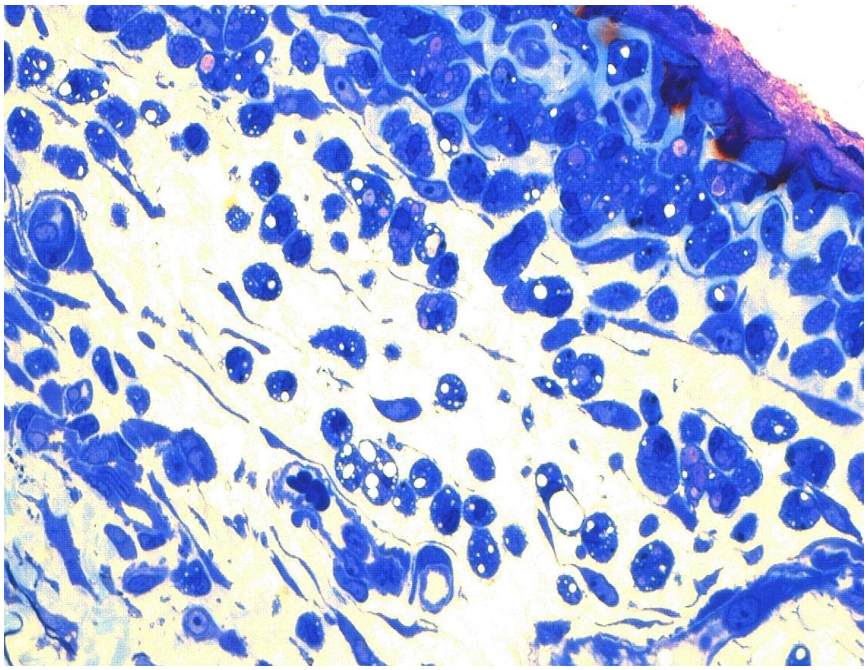
Obrázek 15 Kontrolní varle, 12 dnů, ZT, zvětšeno 100x



Obrázek 16 Abdominální varle, 12 dnů, HE, zvětšeno 100x



Obrázek 17 Abdominální varle, 12 dnů, TM, zvětšeno 200x



Obrázek 18 Abdominální varle, 12 dnů, TM, zvětšeno 400x

9 Seznam literatury

1. Čihák, R. : Anatomie 2, 2. upravené a doplněné vydání, Grada Publishing Praha, 2002, s. 297-393

2. Monsees, T. K., Franz, M., Gebhart, S., Winterstein, U., Schill, W. B., Hayatpour, J. : Sertoli cells as a target for reproductive hazards, Andrologia, 2000, 32, s. 239-246

3. Mruk, D. D., Cheng, C. Y. : Sertoli – Sertoli and Sertoli – germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis, Endocrine Reviews, 2004, 25, s. 747-806

4. Parvinen, M. : Regulation of the seminiferous epithelium, 1982, Endocr. Rev., s. 404-417

5. Franke, F. E., Pauls K., Rey R., Marks A., Bergmann M., Steger K. : Differentiation markers of Sertoli cells and germ cells in fetal and early postnatal human testis, Anat. Embryol., 2004, 209, s. 169-177

6. Yan, H. H. N., Cheng, C. Y. : Blood – testis barrier dynamics are regulated by an engagement/disengagement mechanism between tight and adherens junctions via peripheral adaptors, Proceedigs of the National Academy of Sciences, 2005, 33, s. 11722-11727

7. Mruk, D., Zhu, L. J., Silvestrini, B., Lee, W. M., Cheng, C. Y. : Interactions of proteases and protease inhibitors in Sertoli-germ cell cocultures preceding the formation of specialized Sertoli-germ cell junctions *in vitro,* 1997, J. Androl., 18, s. 612-622

8. Xia, W., Mruk, D. D., Lee, W. M., Cheng, C. Y. : Differential interactions between transforming growth factor β3/TβR1, TAB1, and CD2AP disrupt blood-testis barrier and Sertoli-germ cell adhesion, J. Biol. Chem., 2006, 24, s. 16799-16813

9. Suzuki, T., Onogawa, T., Asano, N., Mizutamari, H., Mikkaichi, T., Tanemoto, M. a kol. : Identification and characterization of novel rat and Human gonad-specific organic anion transporters, Molecular Endocrinology, 2003, 17, s. 1203-1215

10. Chaki, S. P., Misro, M. M., Ghosh, D., Gautam, D. K., Srinivas, M. : Apoptosis and cell removal in the cryptorchid rat testis, 2005, Apoptosis, 10, s. 395-405

11. Hedger, M. P. : Testicular leukocytes: what are they doing?, 1997, Reviews of Reproduction, 2, 38-47

12. Nečas E. a kol. : Obecná patologická fyziologie, Univerzita Karlova v Praze, 2000, Nakladatelství Karolinum, s. 140, 173-177

13. Mitic, L. L., Itallie, C. M., Anderson, J. M. : Molecular physiology and patophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function : lessons

from mutant animals and proteins, 2000, Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 279, s. G250-G254

14. Saitou, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J. D., Fromm, M. a kol. : Complex phenotype of mice lacking ocludin, a component of tight junction strands, 2000, Mol. Cell. Biol., 11, s. 4131-4142

15. Bouchard, M. J., Dong, Y., Dermott, B. M. jr., Lam, D. H., Brown, K. R. a kol. : Defects in nuclear and cytoskeletal morphology and mitochondrial localization in spermatozoa of mice lacking nectin-2, a component of cell-cell adherens junctions, 2000, Mol. Cell. Biol., 20, s. 2865-2873

16. Takai, Y., Nakanishi, H. : Nectin and afadin : novel organizers of intercellular junctions, 2003, J. Cell. Sci., 116, s. 17-27

17. Mercucio, A. M. : Laminin : multiple forms, multiple receptors, 1990, Curr. Opin. Cell. Biol., 2, s. 845-849

18. Mecham, R. P. : Laminin receptors, 1991, Annu. Rev. Cell. Biol., 7, s. 71-91

19. Lui, W. Y., Mruk, D., Lee, W. M., Cheng, C. Y. : Sertoli cell tight junction dynamics : their regulation during spermatogenesis, 2003, Biol. Reprod., 68, s. 1087-1097

20. Okanlawon, A., Dym, M. : Effect of chloroquine on the formation of tight junctions in cultured immature rat Sertoli cells, 1996, J. Androl., 17, s. 249-255

21. Chung, N. P. Y., Cheng, C. Y. : Is cadmium chloride-induced inter-Sertoli tight junction permeability barrier disruption a suitable *in vitro* model to study the events of junction disassembly during spermatogenesis in the rat testis? 2001, Endocrinology, 142, s. 1878-1888

22. Wiebe, J. P., Kowalik, A., Gallardi, R. L., Egeler, O., Clubb, B. H. : Glycerol disrupts tight juction-associated acetin microfilaments, occludin, and microtubules in Sertoli cells, 2000, J. Androl., 21, s. 625-635

23. Vihko, K. K., Penttila, T. L., Parvinen, M., Belin, D. : Regulation of urokinase-and tissue-type plasminogen activator gene expression in the rat seminiferous epithelium, 1989, Mol. Endocrinol., 3, s. 52-59

24. Tryggvason, K., Hoyhtya, M., Salo, T. : Proteolytic degradation of extracellular matrix in tumor invasion, 1987, Biochim. Biophys. Acta., 907, s. 191-217

25. Siu, M. K. Y., Lee, W. M., Cheng, C. Y. : The interplay of collagen IV, tumor necrosis factor-α, gelatinase B, and tissue inhibitor of metalloprotease-1 in the basal lamina regulates Sertoli cell-tight junction dynamics in the rat testis, 2003, Endocrinology, 144, s. 371-387

26. Janecki, A., Jakubowiak, A., Steinberger, A. : Effects of cyclic AMP and phorbol ester on transepithelial electrical resistance of Sertoli cell monolayers in two-compartment culture, 1991, Mol. Cell. Endocrinol., 82, s. 61-69

27. Lee, N. P. Y., Cheng, C. Y. : Regulation of Sertoli cell tight junction dynamics in the rat testis via the nitric oxide synthase/soluble guanylate cyclase /3‘,5‘-cyclic guanosine monophosphate /protein kinase G signaling pathway: a *in vitro* study, 2003, Endocrinology, 144, s. 3114-3129

28. Material safety data sheet, MDOC (Microdisperged oxidised cellulose), MSDS number : APL 02/99 –Effective date 02/01/99, s. 1-6, Alltracel Pharma Ltd, Ireland

29. Havlová, M. : Změny histomorfologie varlete potkana navozené unilaterálním kryptorchismem, Hradec Králové, 2007, Diplomová práce na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy, Katedra biologických a lékařských věd, vedoucí diplomové práce Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc., s. 2-78

30. Yin, Y., Hawkins, K. I., Dewolf, W. C., Morgentaler, A. : Heat stress cause testicular germ cell apoptosis in adult mice, Journal of Andrology, 1997, 18, s. 159-165

31. Shikone, T., Billig, H., Hsueh, A. J. W. : Experimentally induced cryptorchidism increases apoptosis in rat testis, 1994, Biology of Reproduction, 51, s. 865-872

32. Meng, J., Holdcraft, R. W., Shima, J. E., Griswold, M. D., Braun, R. E. : Androgens regulate the permeability of the blood-testis barrier, 2005, Proceedings of the National Academy of Sciences, 102, s. 16696-16700

33. Nouza, K. : Zánět, Medicína: Odborné fórum lékařů a farmaceutů, 2002, ročník 9, č.3, s. 23