

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



DIZERTAČNÍ PRÁCE

**MORFOLOGICKÉ A FUNKČNÍ ZMĚNY
V SAMČÍM REPRODUKČNÍM SYSTÉMU**

—

**OVLIVNĚNÍ HEMATOTESTIKULÁRNÍ
BARIÉRY**

Vědní obor: Farmakologie a toxikologie

Školitel: Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.

Vedoucí katedry: Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.

Hradec Králové, březen 2006

Mgr. Martin Kopecký

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji panu doc. RNDr. Vladimíru Semeckému, CSc. za to, že mi poskytl spousty cenných rad a zkušeností, za odborné vedení a pomoc v průběhu experimentů. Děkuji paní Blance Šlechtové za trpělivost nejen během prvních pokusů při krájení a barvení histologických řezů, ale především během mnoha dalších experimentů. Děkuji paní Ing. Zuzaně Müllerové za pomoc během experimentů a za kompletní přípravu polosilných řezů. Děkuji PharmDr. Petrovi Nachtigalovi, PhD za vytvoření neopakovatelné atmosféry v laboratoři. Děkuji všem výše jmenovaným za krásné chvíle, které jsme společně prožili. Můj dík patří také všem ostatním pracovníkům Katedry biologických a lékařských věd, kteří se buď podíleli přímo na experimentu, nebo na vytváření výborné pracovní atmosféry během celého experimentu.

Děkuji svým rodičům za jejich podporu a obětavost a za to, že mi umožnili studium na vysoké škole. Děkuji své manželce Janě za trpělivost, kterou se mnou měla během sepisování práce a za to, že celou práci přečetla a zkontrolovala. Děkuji své měsíční dcerce Klárce za to, že klidně spala a umožnila mi dokončení této práce. Děkuji všem mým přátelům za vytvoření ideálních podmínek během celého studia i po něm.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK.....	6
ÚVOD	7
TEORETICKÁ ČÁST	9
MORFOLOGIE VARLAT A NADVARLAT	9
Intersticiální tkáň	10
Semenotvorné kanálky	10
Hematotestikulární bariéra	12
Spermatogeneze	13
Řízení testikulárních funkcí	15
MEZIBUNĚČNÁ SPOJENÍ	16
Těsná spojení	16
Adherentní spojení	20
Nexy	26
CYTOSKELET	30
Mikrotubuly	30
Mikrofilamenta	30
Intermediární filamenta	31
Cytoskelet ve varleti	32
PROLIFERAČNÍ AKTIVITA VE TKÁNI VARLAT A APOPTÓZA, PROHIBITIN	34
Proliferační aktivita ve varletech	34
Apoptóza	36
Prohibitin	37
KRYPTORCHISMUS	38
BUSULFAN	40
MATERIÁL A METODIKA.....	45
OPERACÍ NAVOZENÝ KRYPTORCHISMUS	45
APLIKACE BUSULFANU	46
HISTOLOGICKÉ ZPRACOVÁNÍ ORGÁNŮ	46
BARVENÍ HEMATOXYLIN – EOSIN	48
ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ PRO POLOSILNÉ ŘEZY	49

IMUNOHISTOCHEMIE.....	52
TUNEL.....	54
CHEMIKÁLIE	56
STATISTICKÉ HODNOCENÍ.....	57
VÝSLEDKY	58
KRYPTORCHISMUS.....	58
Hmotnost varlat.....	58
Výsledky histologického hodnocení	59
BUSULFAN.....	66
Hmotnost varlat.....	66
Výsledky histologického hodnocení	67
CYTOSKELET.....	75
Aktin hladkosvalových buněk.....	75
Aktin.....	75
Tubulin.....	78
Vimentin	81
MEZIBUNĚČNÁ SPOJENÍ	85
Těsná spojení.....	85
Adherentní spojení	85
Nexy.....	90
PROHIBITIN, PCNA, TUNEL	94
Kontrolní skupiny.....	94
Expresse prohibitinu a PCNA, TUNEL ve varlatech kryptorchizovaných zvířat	96
Expresse prohibitinu a PCNA, TUNEL ve varlatech po aplikaci busulfanu.....	101
DISKUSE	106
ZÁVĚR.....	120
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	123

SEZNAM ZKRATEK

ABP - androgen binding protein	HSP - heat shock protein
ADP – adenosin difosfát	IF - intermediární filamenta
AJ - adherent junction (adherentní spojení)	IP₃ – inositoltrifosfát
ALP – alkalická fosfatáza	JAM - junctional adhesion molecule
AMH - anti-mülleriánský hormon	kDa - kilodalton
AMP - adenosin monofosfát	L-CAM - liver-cell adhesion molecule
ATP – adenosin trifosfát	LH - luteinizační hormon
BSA – hovězí sérový albumin	mRNA – mitochondriální ribonukleová kyselina
BTB – blood – testis barrier (hematotestikulární bariéra)	MRP-1 -multidrug resistance-associated protein
cAMP – cyklický adenosin monofosfát	NCAM – neural cell adhesion molecule
DAB - diaminobenzidín	OSP - oligodendrocyte specific peptide
DHT - dihydrotestosteron	PBS – fosforečnanový pufr
DMSO - dimethylsulfoxid	PCNA – proliferative cell nuclear antigene
DNA – deoxyribonukleová kyselina	PHB - prohibitin
ED – směs Epon-Durkupan	SHBP - steroid hormon binding protein
EDMS - ethandimethansulfonát	SO – sham-operated zvířata (operované kontroly)
eNOS – endotelová nitric oxide (NO) syntáza	T - testosteron
ES - ektoplazmatické specializace	TeBP - testosteron binding protein
FAK - focal adhesion kinase	TJ - tight junction (těsná spojení)
FSH - folikuly stimulující hormon	TK - tubulobulbární komplexy
GJ – gap junction (nexy)	TNF-α - tumor nekrotizující faktor alfa
GnRH – gonadotropní růstový hormon (gonadoliberin)	UA – uranylacetát
hCG – lidský choriový gonadotropní hormon	ZO – zonula occludens protein

ÚVOD

Zdraví je podle definice Světové zdravotnické organizace stav úplné tělesné, duševní a sociální pohody. Poruchy reprodukce nejsou pouze otázkou poruchy fyzického zdraví, ale zasahují také psychickou a sociální stránku života člověka. Potíže s početím má v České Republice zhruba 15% párů a mužská neplodnost je na vině téměř v polovině případů (zdroj ISCARE IVF Centrum Praha). V současné populaci se stále zvyšuje počet mužů se sníženou fertilitní schopností, u nichž jsou přítomny různé degenerativní změny varlat s poruchami spermatogeneze. K těmto změnám může docházet vlivem genetických predispozic, některých patologických stavů, životního stylu (drogy, kouření, alkohol), výskytu různých polutantů v životním prostředí, apod. (Baker et al. 2000; Sharpe 2000). Patologické změny varlete jsou výsledkem dějů odehrávajících se na molekulární úrovni. Sledování parametrů, které hrají důležitou roli během patologických změn varlete, může být cenným vodítkem pro určení dalšího osudu poškozeného varlete. Operativně navozený kryptorchismus (unilaterální nebo bilaterální) u dospělých potkanů je jedním z modelů studia tohoto poškození. Jiným modelem je podání vybraného xenobiotika s toxickým účinkem na buňky zárodečné linie (např. některá cytostatika) nebo na Sertoliho buňky (např. ftaláty) (Jiang 1998; Richburg et al. 2002; Suominen et al. 2003).

Jedním z morfologických přístupů používaným ke zjištění poškození buněk a tkání je určení dynamických změn některých parametrů pomocí imunohistochemických metod. S využitím imunohistochemie je možné lokalizovat proteiny v tkáňových řezech na základě interakce antigen-protilátka. Nejnapadnějším morfologickým znakem poškození zárodečného epitelu je odtržení zárodečných buněk z epitelu do lumen kanálku. Předpokládá se, že oddělení zárodečných buněk od Sertoliho buněk je důsledkem poškození adhezivních proteinů specializovaných adherentních mezibuněčných spojení (zonula adherens) a/nebo jejich pozměněné interakce se strukturami cytoskeletu buněk (Boekelheide, 2002; Wang, 2002). Zároveň dochází k poškození i dalších typů mezibuněčných spojení – nexy (Defamie et al. 2001), a zejména zonula occludens (těsná spojení) mezi sousedními Sertoliho buňkami, které jsou součástí hematotestikulární bariéry (Cheng, 2002). Dochází také ke změnám v cytoskeletárním uspořádání jednotlivých typů buněk ve varlatech – mikrotubulů, mikrofilament i

intermediárních mikrofilament (Aumuller and Seitz 1988; Richburg and Boekelheide 1996).

Tato dizertační práce si klade za úkol posoudit vliv modelového xenobiotika - busulfanu a vliv operativně navozeného jednostranného kryptorchismu (přesun varlete ze šourku do břišní dutiny) na morfologický obraz tkáně varlete potkana (stav zárodečného epitelu i intersticiální tkáně mezi semenotvornými kanálky) a na spermatogenezi. Cílem této práce je zhodnotit pomocí histologických a imunohistochemických metod některé změny odehrávající se ve varleti na úrovni cytoskeletárních vláken, změny v expresi proteinů specializovaných mezibuněčných spojení mezi jednotlivými populacemi testikulárních buněk a pokusit se porovnat proliferální aktivitu testikulárních buněk s rozsahem jejich poškození.

TEORETICKÁ ČÁST

MORFOLOGIE VARLAT A NADVARLAT

Varle s nadvarletem jsou uloženy pod stydkou sponou v šourku (*scrotum*) hruškovitého až kulovitého tvaru, rozděleném septem (*septum scroti*) na dvě poloviny; jeho polohu na kůži udává šev (*raphe scroti*). **Varle** (*testis*) je párová mužská pohlavní žláza ovoidního tvaru. Je dlouhé 4 - 5 cm a široké 2 - 3 cm o hmotnosti asi 18 - 25 g. Jeho zadní okraj je překryt nadvarletem. Tři vrstvy membrán, viscerální *tunica vaginalis*, *tunica albuginea* a *tunica vasculosa*, představují testikulární obal. Rozšíření membrány tunica albuginea do varlete ve formě vazivových sept (*septula testis*) vede k utváření více než 250 pyramidálních lalůček (*lobuli testis*). Lalůčky jsou orientovány bází směrem k povrchu, jejich vrcholky směřují k hilu varlete a jsou v nich uloženy 2 - 3 stočené semenotvorné kanálky (*tubuli seminiferi contorti*). Ty se v hilu varlete postupně spojí do 20 - 30 přímých semenotvorných kanálků (*tubuli seminiferi recti*), které jsou navzájem propojeny, takže tvoří síťovité *rete testis*. Z této sítě vzniká dalším spojováním 10 - 20 širších vývodných kanálků (*ductuli efferentes testis*), jež vstupují do nadvarlete. Vazivo, v němž leží tubuli recti a počáteční část ductuli efferentes se nazývá *mediastinum testis*.

Krevní zásobení varlat vychází hlavně z testikulárních tepen, které jsou větvemi *arteria spermatica interna*. Po přestupu složitou kapilární sítí vstupuje krev do četných testikulárních žil, jež utvářejí anastomozující síť, *plexus pampiniformis*. Tato síť se spojuje a vzniká tak *vena spermatica interna*. Lymfatická drenáž varlete je též bohatá. Inervace varlete je zajištěna nervovou pletení přicházející podél cév (*plexus testicularis*), která obsahuje vlákna senzitivní, sympatická a parasympatická.

Nadvarle (*epididymis*) je protáhlý trubicovitý orgán na zadním obvodu varlete. Masivnější část, hlava (*caput epididymidis*), sestupuje po zadním obvodu varlete jako tělo (*corpus epididymidis*) a zužuje se v ocas (*cauda epididymidis*) dále přecházející v chámovod. Povrch nadvarlete tvoří silná vazivová membrána pevně spojená s vazivem uvnitř nadvarlete. Do jeho hlavy vstupují vývodné kanálky (*ductuli efferentes testis*), které uvnitř formují lalůčky (*lobuli epididymidis*). Kanálky lalůček se ze strany napojují do jediného vývodu nadvarlete (*ductus epididymidis*). Tento až 6 m dlouhý kanálek je zpočátku uložen na zadním obvodu hlavy, pak mnohonásobně stočen tvoří tělo a ocas nadvarlete, dále přechází v chámovod (*vas deferens*). Jeho vazivová stěna obsahuje množství cirkulárně

uspořádané hladké svaloviny, vnitřní povrch kanálku vystýlá dvouřadý cylindrický epitel (Čihák 2002; Dylevský et al. 2000; Junqueira et al. 1999).

Dvě základní funkce varlat, **spermatogeneze** a **steroidogeneze**, se odehrávají ve dvou různých kompartmentech varlat, které jsou od sebe morfologicky i funkčně odlišné, ve své činnosti však na sebe úzce navazují. Spermatogeneze probíhá v tubulárním kompartmentu – v zárodečném epitelu semenotvorných kanálků, steroidogeneze převážně v intersticiální tkáni mezi kanálky.

INTERSTICIÁLNÍ TKÁŇ

Prostor mezi semenotvornými kanálky je vyplněn shluky vazivové tkáně, nervů, krevních a lymfatických cév (představuje u člověka asi 12 – 15 % celkového objemu varlat). Testikulární kapiláry jsou fenestrované a dovolují volnou pasáž makromolekul, jako jsou krevní bílkoviny. Vazivo sestává z různých typů buněk zahrnujících fibroblasty, nediferencované vazivové elementy, jsou zde přítomny také buňky imunitního systému – lymfocyty, makrofágy, žírné buňky.

Vlastními endokrinními elementy jsou **Leydigovy buňky**. Jsou většinou zakulacené či polygonální, obsahují centrálně uložené jádro a eosinofilní cytoplazmu bohatou na malé tukové kapénky obsahující cholesterol. Syntéza steroidních hormonů je zprostředkována enzymy, které se nacházejí v hladkém endoplazmatickém retikulu a v cytoplazmě (Čihák 2002; Junqueira et al. 1999).

SEMENOTVORNÉ KANÁLKY

V tubulární části varlete (ve výstelce semenotvorných kanálků – *tubuli seminiferi*) probíhá spermatogeneze. Do zárodečného epitelu jsou vnořeny Sertoliho buňky, jež představují 35 – 40 % jeho objemu. Druhým typem buněk jsou buňky zárodečné linie v různém stádiu spermatogeneze. Kromě Sertoliho a zárodečných buněk se kolem semenotvorných kanálků nacházejí **peritubulární myoidní buňky** (myofibroblasty), které obsahují aktin a jsou schopné spontánní kontrakce. Jsou prostupné pro androgeny a metabolické složky nutné pro vývoj zárodečného epitelu.

Sertoliho buňky jsou podlouhlé elementy tvaru pyramidy s četnými postranními výběžky. Jejich báze přisedají k bazální lamině, zatímco jejich volné apikální konce vyčnívají do lumen semenotvorných kanálků. Tyto buňky obsahují velké množství hladkého endoplazmatického retikula, mitochondrií a lyzozomů, drsné

endoplazmatické retikulum a dobře vyvinutý Golgiho komplex. Jejich protáhlé jádro často nabývá trojúhelníkového tvaru. Sousední Sertoliho buňky jsou na úrovni spermatogonií k sobě poutány pomocí těsných spojení (tight junctions). Sertoliho buňky jsou odolné vůči nepříznivým podmínkám jako je infekce, malnutrice či pronikavá radiace (Junqueira et al. 1999).

Sertoliho buňky zastávají několik funkcí, které se mění v průběhu vývoje jedince. V embryonálním období jsou Sertoliho buňky prvními diferencujícími se buňkami v indiferentní gonádě a pod jejich kontrolou je zahájeno formování testikulárních provazců, z nichž se později tvoří semenotvorné kanálky. Dále díky jejich vlivu nedochází k meiotickému dělení vcestovalých zárodečných buněk a v neposlední řadě indukují diferenciaci Leydigových buněk. V tomto období produkují také anti-mülleriánský hormon (AMH) (Sharpe et al. 2003).

V průběhu puberty dochází k funkčním i morfologickým změnám Sertoliho buněk, k jejich maturaci. V rámci vyžívání ztrácí Sertoliho buňky schopnost proliferace. Počet Sertoliho buněk je tak určen již před dosažením dospělosti. U většiny živočišných druhů, včetně člověka, se Sertoliho buňky dělí ve dvou obdobích – (i) ve fetálním období a krátce po narození (u člověka cca do konce 1. roku života); (ii) v období před zahájením puberty (ve věku 10-13 let) (Franca et al. 2000; Sharpe et al. 2003). Počet Sertoliho buněk ve varleti určuje množství produkovaných spermií, neboť každá Sertoliho buňka má omezenou kapacitu pro počet zárodečných buněk, které může podporovat (tento počet se mezidruhově liší) (Orth et al. 1988; Sharpe et al. 2003). Proliferace Sertoliho buněk je pozitivně regulována FSH, negativně thyroidními hormony a vedle nich se v tomto procesu uplatňují také růstové faktory (De Franca et al. 1995; Sharpe et al. 2003).

Během maturace Sertoliho buněk dochází ke změnám exprese některých proteinů, které slouží jako markery pro určování vyzrálosti Sertoliho buněk v diagnostice různých syndromů spojených s poruchou tvorby spermií. Dospělé Sertoliho buňky se vyznačují sníženou sekrecí AMH, sníženou expresí aromatázy (a tím i tvorby estrogenů v dospělých Sertoliho buňkách) (Turner et al. 2002), sníženou expresí NCAM – neural cell adhesion molecule (NCAM je důležitý pro adhezi gonocytů během jejich migrace v indiferentní gonádě) (Laslett et al. 2000; Orth et al. 2000), cytokeratinu 18 (Bar-Shira Maymon et al. 2000; Steger et al. 1996), a naopak zvýšenou expresí lamininu α_5 v bazální membráně semenotvorných kanálků (Pelliniemi a Frojzman 2001), v průběhu první vlny spermatogeneze se v dozrálých Sertoliho buňkách objevuje

transkripční faktor GATA-1 (Yomogida et al. 1994) a ve zralých Sertoliho buňkách se nachází také inhibitor cyklin-dependentních kináz - p27^{Kip1}, blokující proliferaci (Beumer et al. 1999; Cipriano et al. 2001).

Výskyt nezralých Sertoliho buněk v dospělém varleti resultuje v poškození spermatogeneze, neboť tyto nezralé buňky jsou schopné vyživovat a podporovat pouze nezralá nebo časná stadia zárodečných buněk (od gonocytů po nediferencované spermatogonie). Obráceně, snížení počtu meiotických a postmeiotických stádií zárodečných buněk v zárodečném epitelu může vést k sekundárním změnám v Sertoliho buňkách, u nichž se mohou druhotně objevit znaky nezralých Sertoliho buněk (Sharpe et al. 2003; Sharpe et al. 1993)

V dospělosti vykonávají Sertoliho buňky několik rozličných funkcí. Tvoří ochranné a výživu zajišťující prostředí pro zárodečné buňky. Fagocytují a vstřebávají buněčný materiál z procesu spermatogeneze, secernují do lumen semenotvorných kanálků tekutinu, která odtéká směrem k vývodným cestám pohlavním a je využívána k transportu spermií. Dále je v nich pod vlivem FSH a testosteronu produkován androgeny vázící protein (Androgen binding protein, ABP) a peptid inhibin, který omezuje syntézu a uvolňování FSH v předním laloku hypofýzy. Tyto funkce Sertoliho buněk jsou nezbytné pro zdárný průběh spermatogeneze (Čihák 2002; Junqueira et al. 1999).

HEMATOTESTIKULÁRNÍ BARIÉRA

V pubertě dochází mezi sousedními Sertoliho buňkami k vytvoření mezibuněčných spojení zonula occludens (tight junctions, TJ) a tím k formování hematotestikulární bariéry (blood – testis barrier, BTB) (Sharpe et al. 2003). Vytvoření BTB je závislé na přítomnosti zárodečných buněk v semenotvorných kanálcích a tvorba TJ začíná v okamžiku, kdy se v kanálcích objevují první zygotenní a/nebo pachytenní spermatocyty. Pokud nejsou přítomny, BTB se nevytváří (Cavicchia et al. 1991).

Hematotestikulární bariéra je složitá morfologická i funkční jednotka, na jejíž stavbě a funkci se podílejí také endotelové buňky kapilár a jejich bazální membrány, peritubulární myoidní buňky nacházející se kolem semenotvorných kanálků, vlastní bazální membrána kanálků a cytoplazmatická membrána Sertoliho buněk. Zatímco cévní struktury a peritubulární myoidní buňky vytvářejí pouze jakýsi hrubý předfiltr (ačkoliv i v nich lze nalézt TJ), ostatní komponenty zodpovídají za vlastní bariérovou funkci (Ganong 1997; Junqueira et al. 1999). Fyzikálně-chemické vlastnosti BTB brání

prostupu velkých a hydrofilních molekul do adluminálního kompartmentu zárodečného kanálu. Na funkci BTB se také podílejí efluxní transportéry jako např. P-glykoprotein, MRP-1 (multidrug resistance associated protein) ad. (Bart et al. 2002), jejichž funkcí je odstraňovat z buněk cizorodé molekuly, které se do buněk dostávají prostou difúzí (Schinkel 2001).

Bazálně od TJ, mezi Sertoliho buňkami, se nacházejí spermatogonie, které leží při bazální membráně a jsou tedy umístěny před vlastní BTB. Po několikerém mitotickém dělení se diferencují ve spermatocyty, které prostupují skrz BTB do adluminálního kompartmentu zárodečného kanálu. BTB tedy chrání až meioticky se dělicí spermatocyty a vyzrávající spermatidy před působením toxických látek obsažených v krvi. Zároveň vytváří i bariéru imunologickou. Diferencující se spermie by mohly být organismem rozpoznávány jako cizorodé a provokovat imunitní odpověď vedoucí k jejich zničení. BTB zamezuje prostupu leukocytů (na čemž se podílí také systém Fas receptor - Fas ligand, který spouští apoptózu T-lymfocytů (Ashkenazi a Dixit 1999; Riccioli et al. 2003)) a imunoglobulinů do lumen semenotvorných kanálků (Ashkenazi a Dixit 1999; Bart et al. 2002; Cheng a Mruk 2002; Junqueira et al. 1999).

Vzhledem k existenci této bariéry jsou zárodečné buňky závislé na Sertoliho buňkách v dodávce živin a metabolitů. Do luminálního oddílu epitelu semenotvorných kanálků mohou látky obsažené v krvi pronikat pouze přes cytoplazmu Sertoliho buněk. Touto bariérou např. snadno procházejí androgeny, méně snadno progesteron a estrogeny, ale BTB zabraňuje přechodu cholesterolu nebo kortikoidů z intersticiálního prostoru do lumen semenotvorných kanálků (Čihák 2002; Junqueira et al. 1999).

Důsledkem funkce jednotlivých komponent BTB je, mimo jiné, také rozdílné složení extracelulárních tekutin na obou stranách bariéry - mezi krví v testikulárních kapilárách a tekutinou v lumen semenotvorných kanálků varlete. Tekutina obsažená v lumen semenotvorných kanálků obsahuje malé množství glukózy a bílkovin, je bohatá na androgeny, estrogeny, draslík, inositol a na kyselinu glutamovou a asparagovou (Bart et al. 2002; Ganong 1997).

SPERMATOGENEZE

Spermatogeneze se dělí na dvě fáze, spermatocytogenezi a spermatohistogenezi. V průběhu spermatogeneze vznikají ze spermatogonií přes stádium primárních a sekundárních spermatocytů spermatidy, které po proběhlé meióze obsahují haploidní počet chromozómů a poloviční množství DNA ve srovnání

s výchozími spermatogoniemi. V průběhu spermatohistogeneze se spermatidy procesem cytodiferenciace přeměňují ve spermatozoa.

Spermatogonie se nacházejí u bazální membrány zárodečného epitelu. Jsou to relativně malé buňky, v cytoplazmě bohaté na ribozomy, obsahují velké sférické jádro s velkým jadérkem. Spermatogonie typu A zůstávají u bazální laminy zárodečného epitelu, mitoticky se dělí a dávají vzniknout dalším generacím spermatogonií typu A a spermatogoniím typu B. Spermatogonie typu B se přeměňují ve spermatocyty I. řádu (primární spermatocyty).

Spermatocyty I. řádu jsou největší zárodečné buňky v zárodečném epitelu. Krátce před zahájením meiózy v nich dochází ke zdvojení množství DNA obdobným způsobem jako při mitóze. Záhy vstupují do profáze prvního redukčního dělení, čímž je zahájena meióza. Profáze I. zracího dělení trvá okolo 22 dnů, během nichž lze rozlišit leptotenní, zygotenní, pachytenní a diplotenní stádium profáze. Prvním meiotickým dělením vznikají spermatocyty II. řádu (sekundární spermatocyty). Spermatocyty II. řádu nenacházíme v zárodečném epitelu často, protože rychle zahajují druhé meiotické dělení. Při II. zracím dělení se každý sekundární spermatocyt rozdělí ve dvě spermatidy, aniž by proběhla S-fáze, proto spermatidy obsahují pouze poloviční množství DNA ve srovnání se spermatocyty II. řádu.

Spermatidy jsou uloženy ve vrstvě poblíž lumen semenotvorných kanálků. V blízkosti jádra se vyskytuje mohutně vyvinutý Golgiho aparát, v cytoplazmě četné volné ribozomy, nepříliš vyvinuté endoplazmatické retikulum a velký počet mitochondrií. Tyto kulatobuněčné elementy vstupují do složitého procesu spermatohistogeneze, v jehož průběhu se spermatidy, kulovité či polyedrické buňky s velkým kulatým jádrem postupně elongují, vytváří se akrosom, bičík a další struktury nezbytné pro funkci zralých spermií. Tento proces se odehrává částečně v kanálcích varlete a po uvolnění spermatid ze zárodečného epitelu pokračuje v nadvarletí. Zde spermie plně dozrávají během 12 – 14 dnů a teprve pak mohou být součástí ejakulační tekutiny. Od začátku vývoje spermatogonie se tedy může zralá spermie uplatnit přibližně za 72 dnů (Čihák 2002; Dylevský et al. 2000; Klika 1986).

U potkana kmene Wistar trvá proces spermatogeneze přibližně 42 dní. Leblond et al. rozlišili 19 stupňů spermatohistogeneze (vývojových stupňů spermatidy) a 14 stádií (charakteristických konfigurací jednotlivých generací zárodečných buněk - u člověka se těchto stádií rozlišuje šest) semenotvorného epitelu, přičemž se několik generací vyvíjí

současně – čím je buňka zralejší, tím se vyskytuje blíže k lumen semenotvorného kanálku (Leblond a Clermont 1952).

ŘÍZENÍ TESTIKULÁRNÍCH FUNKCÍ

Vedle spermatogeneze je nejvýznamnějším procesem probíhajícím ve tkáni varlat tvorba steroidních androgenních hormonů - **steroidogeneze**. Hlavním androgenem u člověka, stejně jako u většiny ostatních živočichů, je **testosteron**; kromě něj se do krve z varlat dostávají i některé další androgeny, zejména dehydroepiandrosteron. Podobně jako ostatní steroidní hormony se testosteron váže v krvi na transportní proteiny - steroid hormon binding protein (SHBP), testosteron binding protein (TeBP) nebo androgen binding protein (ABP). Testosteron má povahu prohormonu, který je v tkáních metabolizován enzymem 5 α -reduktázou na účinnější metabolit - **dihydrotestosteron** (DHT). Testosteron, popř. dihydrotestosteron, ovlivňuje celou řadu procesů probíhajících v různých tkáních (Bart et al. 2002; Čihák 2002; Silbernagl a Lang 2001). Jejich účinky jsou zprostředkovány androgenními receptory. Ty se nacházejí v Sertoliho buňkách – v různém množství podle jejich vývoje (Sharpe et al. 2003). Existují i doklady o přítomnosti androgenních receptorů v populaci zárodečných buněk (Winters 1987) a také v peritubulárních myoidních buňkách kolem semenotvorných kanálků (Suarez-Quian et al. 1999).

Uvolňování testosteronu a činnost varlat jsou řízeny gonadotropními hormony adenohipofýzy. Pulzní sekrece gonadoliberinu (GnRH) vyvolává v předním laloku hypofýzy výdej folikuly stimulujícího hormonu (FSH) a luteinizačního hormonu (LH), tato sekrece je inhibována prolaktinem. LH podporuje růst Leydigových buněk a sekreci testosteronu, což zpětnovazebně inhibuje uvolňování GnRH a LH. FSH podporuje v Sertoliho buňkách tvorbu inhibinu, který zpětně tlumí uvolňování FSH i ABP.

Snížená sekrece androgenů může být způsobena nedostatkem GnRH, např. při poškození hypotalamu (tumory, ozařování, genetické defekty) či při fyzické a psychické zátěži. Další příčinou může být inhibice pulzního uvolňování gonadotropinu prolaktinem a rovněž poškození hypofýzy (tumory, hyperplazie, traumata) nebo varlete (geneticky, celková těžká onemocnění). Účinek androgenů může být ovlivněn enzymatickými defekty v hormonální syntéze nebo defektem receptorovým. Možnými příčinami nadbytku androgenů mohou být enzymatické defekty v syntéze steroidních hormonů, tumory produkující testosteron nebo iatrogenní podávání androgenů. Nadměrná produkce androgenů nebo umělá aplikace testosteronu může vést k omezené

fertilitě u mužů i žen a k maskulinizaci (virilizaci) ženského organismu (Silbernagl a Lang 2001). Pro řízení normální testikulární funkce jsou kromě androgenů nezbytné některé lokální faktory s parakrinním, autokrinním a intrakrinním působením jako růstové faktory, interleukiny a inhibin s aktivinem.

MEZIBUNĚČNÁ SPOJENÍ

Soudržnost epitelových buněk je velká a k jejich oddělení je třeba poměrně značné mechanické síly. Je tomu tak zčásti díky vazebné schopnosti glykoproteinů, jež jsou integrálními proteiny buněčných membrán, a díky přítomnosti malého množství proteoglykanů v mezibuněčném prostoru. Kromě toho se v membránách vyskytují specializované struktury (mezibuněčná spojení), která přispívají k udržování vzájemného styku sousedních buněk. Slouží jako impermeabilní utěsnění mezibuněčného prostoru, která brání volnému prostupu látek (těsná spojení), jako místa zvýšené soudržnosti buněk (především adherentní spojení a desmosomy) a mezibuněčné komunikace (nexy)*. U většiny epitelů jsou všechny tyto typy spojení přítomny současně (Alberts et al. 1997; Junqueira et al. 1999).

Centrum všech těchto mezibuněčných spojení tvoří různé transmembránové proteiny, které se shlukují do řad, vláken nebo jiných formací (claudiny v těsných spojeních, cadheriny v adherentních spojeních, desmogleiny a desmocolliny v desmosomech, integriny ve fokálních adhezích a hemi-desmosomech, connexiny v nexech). Stavební proteiny (např. ZO-1), kotevní (připojující) proteiny (např. cateniny, vinculin, α -actinin, plakoglobin, desmoplakin nebo talin) a signální proteiny (např. FAK - focal adhesion kinase, různé fosfatázy) tvoří přídatné struktury transmembránovým proteinům a často je spojují s cytoskeletem – mikrofilamenty, mikrotubuly nebo intermediárními filamenty (Segretain a Falk 2004).

TĚSNÁ SPOJENÍ

Těsná spojení (zonula occludens, tight junction - TJ), se nacházejí v epitelech většinou nejbližší apexu buňky. Vytvářejí souvislý pás obkružující obvod buňky, v místě tohoto pásu zevní vrstvy přiléhajících buněčných membrán splývají ve formě

* V širším slova smyslu se mezi mezibuněčná spojení řadí i některé další typy spojení – chemické synapse mezi neurony nebo imunologická spojení pomocí MHC molekul třídy I (Segretain a Falk, 2004)

anastomozujících linií. Počet vytvořených linií kontaktu závisí na typu a funkci epitelu - čím více je nad sebou vytvořených linií, tím dokonalejší je utěsnění. Tato více či méně pevná utěsnění zabraňují pronikání molekul paracelulární cestou od apikální části epitelu k bázi a naopak. TJ také hrají klíčovou úlohu v udržování polaritu jednotlivých epiteliálních buněk. Komplex TJ okolo apikálního okraje epiteliální buňky zabraňuje difúzi membránových proteinů, a tak zůstává složení apikální plasmatické membrány odlišné od membrány bazální.

TJ jsou tvořeny různými typy proteinů. Existují minimálně 3 typy transmembránových proteinů – occludin, claudiny, junctional adhesion molecules (JAM). Nad to se na funkci a stavbě TJ podílejí další asociované proteiny (ZO-rodina proteinů, cingulin, symplekin...). Díky velké variabilitě těchto proteinů a jejich vzájemným interakcím existují různé typy TJ v různých tkáních, které se liší schopností „utěsnění“ (Harhaj a Antonetti 2004).

OCCLUDIN

Occludin (55kDa) byl prvním proteinem identifikovaným v TJ epitelových a endotelových buněk (Furuse et al. 1993). V různých bariérových systémech (např. mozek-krev, retina-krev) bylo prokázáno, že occludin je klíčovým proteinem TJ, jehož exprese je nutná pro bariérové funkce TJ v tkáních (Antonetti et al. 2002; Bolton et al. 1998; DeMaio et al. 2001; Wan et al. 1999). Naproti tomu, occludin není nutný pro zachování strukturální integrity TJ, které se mohou vytvořit i bez jeho přítomnosti – pak ovšem nejsou plně funkční (Saitou et al. 1998; Saitou et al. 2000). Occludin interaguje s několika strukturálními např. ZO-1 (Fanning et al. 1998) i regulačními např. E3-ubiquitin-protein ligáza (Traweger et al. 2002) proteiny TJ.

Occludin byl detekován ve varlatech myši a potkana, ale ne u morčat a lidí (Moroi et al. 1998). V myších varlatech byl pomocí imunohistochemie lokalizován v místech, kde se nachází TJ (Cyr et al. 1999). U transgenních occludin^{-/-} deficientních myší nebyly postnatálně nalezeny výrazné změny ve struktuře semenotvorných kanálků, ale v dospělosti došlo k atrofii tubulů a k vymizení zárodečných buněk z epitelu (Saitou et al. 1998; Saitou et al. 2000). K poškození TJ a occludinu došlo také po intratestikulární aplikaci glycerolu (Wiebe et al. 2000). Menší část occludinu se nachází v bazolaterální membráně Sertoliho buněk, kde pravděpodobně slouží jako depo (Lynch et al. 1995). Přesná role occludinu v testikulárních TJ není plně vysvětlena.

CLAUDINY

Jsou velkou rodinou transmembránových proteinů, které se podílejí na utváření TJ. V současné době je popsáno minimálně 24 zástupců této rodiny proteinů (Harhaj a Antonetti 2004), které jsou různou měrou zastoupeny v různých tkáních, resp. typech buněk, a díky této rozmanitosti existují specifické typy TJ vytvořené v různých tkáních. Claudiny regulují permeabilitu a bariérovou funkci TJ. Nepřítomnost claudinu resultuje v desintegraci struktury TJ, proto se pokládají za základní kameny struktury TJ (Cheng a Mruk 2002). Byly prokázány odlišné funkce různých zástupců rodiny claudinů pomocí studií na transgenních myších. Např. claudin-1^{-/-} deficientní myši umírají během prvního dne po narození v důsledku transepidermálních ztrát tekutin (Furuse et al. 2002), claudin-11^{-/-} deficientní myši vykazují abnormality v nervovém a reprodukčním systému (Gow et al. 1999). Některé mutace v genech pro claudiny byly popsány v souvislosti s nádorovým bujením u lidí, konkrétně claudin-1 je upregulován u kolorektálního karcinomu, claudin-3 a -4 u karcinomu ovaria (Hough et al. 2000; Miwa et al. 2000). Někteří zástupci rodiny claudinů jsou také stavebními jednotkami iontových paracelulárních kanálů, claudin-4 (Colegio et al. 2002) a claudin-16 (Simon et al. 1999). Occludin a claudiny mohou tvořit oligomery i heterooligomery. O claudinech je známo, že pouze některé dvojice claudinů mohou spolu oligomerovat (claudin-1 s -3, claudin-2 s -3), kdežto jiné nikoliv (claudin-1 s -2) (Tsukita a Furuse 2000). Přesné molekulární uspořádání jednotlivých proteinů ve struktuře TJ však není dosud uspokojivě popsáno.

Ve varleti bylo identifikováno 7 typů claudinů – claudin-1, -3, -4, -5, -7, -8, -11. Claudin-11/OSP (oligodendrocyte specific peptide) byl detekován v Sertoliho buňkách, jeho exprese byla indukována v myším varleti ve stejné době, kdy se tvoří hematotestikulární bariéra (10. - 16. den postnatálně) (Hellani et al. 2000; Morita et al. 1999). Jeho exprese je ovlivňována FSH a TNF- α a u transgenních claudin-11^{-/-} deficientních myší byla pozorována sterilita a TJ nebyly přítomny mezi Sertoliho buňkami (Hellani et al. 2000).

JUNCTIONAL ADHESION MOLECULES

JAM-1 je transmembránový protein nacházející se v epitelálních a endotelových TJ, JAM-2 v endotelu a výstelce lymfatických cév. Identifikován byl i JAM-3 (Aurrand-Lions et al. 2001b). Na rozdíl od occludinu a claudinů procházejí JAM pouze jedenkrát membránou (Martin-Padura et al. 1998). Reagují s dalšími proteiny TJ, podílejí se na regulaci permeability TJ, ale přesná úloha těchto molekul není dosud známa (Cheng a

Mruk 2002). Bylo ovšem prokázáno, že JAM se podílí na transendoteliální migraci leukocytů do místa zánětu jako odpověď na prozánětlivé cytokiny (Ozaki et al. 1999). Pomocí Northern blotu byly ve varlatech identifikovány JAM-1 a -2 (Aurrand-Lions et al. 2001a). Z tohoto důvodu jsou JAM-1 a -2 zkoumány jako proteiny potenciálně regulující vstup preleptotenních a leptotenních spermatocytů z bazálního do adluminalního kompartmentu zárodečného epitelu.

ZO-PROTEINY

ZO-proteiny jsou periferní membránové proteiny, které jsou součástí cytoplasmatické destičky TJ. Nacházejí se ve všech typech TJ epiteliálních i endotelových buněk. ZO-1 a ZO-2 se nacházejí také v adherentních spojeních v buňkách, které netvoří TJ (např. fibroblasty) (Itoh et al. 1999b). ZO-proteiny patří do rodiny proteinů MAGuK (membrane-associated guanylate kinases), interagují s mnoha různými proteiny (claudiny, occludin, F-aktin, JAM, G-proteiny, α -catenin, connexiny,...) (Ebnet et al. 2000; Fanning et al. 1998; Furuse et al. 1994; Giepmans a Moolenaar 1998; Itoh et al. 1999a; Itoh et al. 1999b; Meyer et al. 2002) i vzájemně mezi sebou. ZO-1 a ZO-2 se nacházejí také v buněčném jádře – podílejí se např. na regulaci buněčného cyklu (Balda a Matter 2000; Gottardi et al. 1996).

Ve varleti potkana a myši byly zatím prokázány ZO-1 a ZO-2, které jsou zde exprimovány od okamžiku zahájení tvorby TJ (Byers et al. 1991).

Mezi další proteiny podílející se na struktuře a funkci TJ, a které byly detekovány ve varleti, patří např. cingulin (v blízkosti ZO-1 v hematotestikulární bariéře a v místech kontaktu Sertoliho buněk se spermatidami – ektooplasmatické specializace) (Citi a Denisenko 1995), symplekin (vedle TJ se nachází také v buněčném jádře epitelových i endotelových buněk) (Keon et al. 1996) a další proteiny (více viz. review (Cheng a Mruk 2002)).

Mezibuněčná spojení typu TJ jsou dynamickou strukturou, jejíž stavba a funkce je regulována celou řadou mechanismů – fosforylace proteinů, role malých GTPáz a GTP-vázajících proteinů (Ras, Rho,...), regulace pomocí cAMP, Ca^{2+} . Mimoto je funkce TJ ovlivňována širokým spektrem růstových faktorů, hormonů, xenobiotik, cytokinů, proteáz, inhibitorů proteáz, ale u varlat vzhledem k umístění při bázi semenotvorného kanálku také proteiny extracelulární matrix (kolagen, laminin, heparan sulfát,...) nebo peritubulárními myoidními buňkami, resp. jejich sekrečními produkty (Harhaj a

Antonetti 2004; Cheng a Mruk 2002). Např. hydrokortizon, prolaktin nebo nenasycené mastné kyseliny zvyšují expresi occludinu v endotelových i epiteliálních buňkách (Antonetti et al. 2002; Stelwagen et al. 1999). Naproti tomu TNF- α , interferon- γ a interleukin-1 β zvyšují permeabilitu TJ (Bolton et al. 1998; Harhaj a Antonetti 2004). Permeabilita TJ může být regulována buď přímo – modifikací proteinů TJ, nebo nepřímo – účinkem na proteiny cytoskeletu. Ve varleti byl prokázán pozitivní vliv testosteronu na těsnost spojení, který dokonce ochránil TJ před toxickým vlivem CdCl₂ a stimuloval expresi occludinu (Chung a Cheng 2001).

TJ nacházející se v semenotvorném kanálu mají určité rozdílné a specifické vlastnosti, kterými se liší od TJ existujících v jiných tkáních.

1) Nejsou vytvořeny při narození, ale tvoří se až v pubertě (u potkana cca od 15. dne).

2) Mají unikátní stavbu a lokalizaci - v semenotvorném kanálu varlete se TJ nacházejí mezi Sertolihovými buňkami při bázi kanálu, tím se podílejí na vytvoření hematotestikulární bariéry.

3) Jedná se o dynamickou strukturu, která se musí otevřít a opět zavřít při průchodu preleptotenních/leptotenních spermatocytů do adluminalního kompartmentu zárodečného kanálu, kde pokračuje spermatogeneze meiózou. K tomuto ději dochází ve stádiu VIII-IX zárodečného epitelu. Během prostupu spermatocytů skrz bariéru musí dojít k restrukturalizaci nejen TJ, ale také dalších mezibuněčných spojení – adherentních spojení i desmosomů (Cheng a Mruk 2002; Lui et al. 2003). Mechanismy vedoucí k dočasnému rozrušení těchto spojů nejsou známy, ale předpokládá se, že zdrojem stimulů, které regulují tento děj, jsou procházející spermatocyty. V průběhu tohoto děje dochází např. k fosforylacím a defosforylacím molekul proteinů v TJ, a také k jejich oligomerizacím (Chen et al. 2000; Chen et al. 1997).

ADHERENTNÍ SPOJENÍ

Mezi spoje, které drží epitel pohromadě vytvářením mechanických vazeb, patří adherentní spoje (zonula adherens, adherent junction - AJ), desmosomy, hemidesmosomy a někdy se sem řadí ještě tzv. fokální spoje (focal contact). AJ a desmosomy vytvářejí spojení dvou sousedních buněk, zatímco hemidesmosomy a fokální spoje spojují epiteliální buňky s bazální membránou nebo extracelulární matrix. Všechny tyto spoje vytvářejí mechanickou sílu stejným způsobem. Molekula, která vně buňky vytváří spojení, prochází membránou a uvnitř buňky je připojena na cytoskeletární filamenta. Tímto způsobem jsou cytoskeletární filamenta provázána do

sítě, která prochází z buňky do buňky a protkává celou epitelální tkáň (Alberts et al. 1997; Konrádová et al. 2000).

V semenotvorném kanálu varlete lze nalézt všechny 4 typy adherentních spojení, z nichž některá jsou specializovaně uzpůsobena pro funkci v semenotvorném epitelu a jsou pro tento epitel zcela unikátní (Cheng a Mruk 2002).

1) S NAPOJENÍM NA AKTINOVÁ VLÁKNA

A. ZONULA ADHERENS (AJ)

nacházejí se v adluminálním kompartmentu zárodečného kanálu. V zárodečném epitelu existují navíc dva typy specializovaných AJ - ektoplazmatické specializace a tubulobulbární komplexy.

EKTOPLAZMATICKÉ SPECIALIZACE (ES)

V zárodečném epitelu se vyskytují dva typy ES – apikální (mezi Sertoliho buňkami a hlavičkami spermatid) a bazální (mezi Sertoliho buňkami navzájem a mezi Sertoliho buňkami a spermatocyty při bázi epitelu). Apikální ES jsou tvořeny přilehlými membránami Sertoliho buňky a hlavové části spermatidy, submembránovou vrstvou s těsně nahloučenými aktinovými vlákny a cisternami endoplazmatického retikula připojenými na mikrotubuly (pouze ze strany Sertoliho buněk) – jde o heterotypický (nesouměrný) typ spojení (Takai a Nakanishi 2003). V průběhu spermatogeneze se u potkana apikální ES vytvářejí v okamžiku, kdy spermatidy dozrají do stádia 8. Degradovány a odstraněny jsou ve stádiu 19 (Beach a Vogl 1999; O'Donnell et al. 2000; Russell 1977). Bazální ES mezi Sertoliho buňkami existují v komplexu s TJ, klasickými AJ a nexy a podílejí se na vytváření hematotestikulární bariéry. ES jsou dynamické struktury, které podléhají neustále přestavbě, což umožňuje ukotvení, a zároveň i pohyb, zárodečných buněk epitelem. Tato přestavba je částečně regulována fosforylačními reakcemi (Siu et al. 2003). Na stavbě ES se podílejí tyto proteiny – aktin, α -actinin, fimbrin, espin, vinculin, nectin, afadin, β 1-integrin, paxillin, gelsolin, myosin VIIa, INK (integrin-linked kinase) (Cheng a Mruk 2002; O'Donnell et al. 2000; Takai a Nakanishi 2003). Zajímavá je přítomnost integrinů v těchto spojeních (v Sertoliho buňkách), neboť jejich partnerem ve vazbě v mezibuněčných spojích bývá laminin – protein bazální membrány. Nedávno však byl lokalizován laminin χ_3 v adluminálním prostoru kanálku varlete, tedy mimo bazální membránu, který by mohl být v zárodečných buňkách protějškem integrinů (Koch et al. 1999).

TUBULOBULBÁRNÍ KOMPLEXY (TK)

TK se v zárodečném epitelu vyskytují v místech, kde se nachází nebo nacházely apikální ES, které postupně nahrazují. V místě, kde je Sertoliho buňka připojena k hlavě spermatidy, se vytvářejí prstovité výběžky v membráně spermatidy, které korespondují s invaginacemi membrány Sertoliho buněk. Adhezní molekuly nectin-2 a nectin-3 jsou koncentrovány v membránách Sertoliho buněk i spermatid, kde se navíc nacházejí i vezikuly připojené k membráně. TK jsou zainteresovány v procesu rozložení ES a internalizace extracelulárních domén adhezních molekul v průběhu uvolňování spermatid ze zárodečného epitelu (Guttman et al. 2004).

B. FOKÁLNÍ SPOJE (FOCAL CONTACT, FOCAL ADHESION)

- jednoduché spoje, které připojují testikulární buňky k bazální membráně. V těchto spojích nalézáme integriny, vinkulin, padolin, podílejí se na něm také proteiny bazální membrány jako laminin, fibronektin ad. (Segretain a Falk 2004).

2) S NAPOJENÍM NA INTERMEDIÁRNÍ FILAMENTA

desmosomy – mezi Sertoliho a zárodečnými buňkami

hemidesmosomy – připojení k bazální membráně

Na stavbě těchto spojení se podílí např. plakoglobin, desmocoliny, desmogleiny, paxillin a další proteiny. Desmosomy jsou složité diskoidní struktury vytvořené na povrchu buňky, která je přiřazena obdobné struktuře buňky sousední. Na vnitřní straně membrány každé z buněk je tzv. úponová ploténka, do níž se upínají svazky intermediárních filament většinou cytokeratinového typu. Jejich funkcí je zajišťovat bodové, obzvláště pevné mechanické spojení (Alberts et al. 1997; Junqueira et al. 1999).

PROTEINY ADHERENTNÍCH SPOJŮ VE VARLETI

Mezi proteiny, které tvoří adherentní spoje, patří adhezní molekuly a další asociované proteiny. Adhezní molekuly se dělí do 4 hlavních skupin: imunoglobuliny, cadheriny, selectiny a integriny (Nachtigal et al. 2001). Dále v textu se budeme věnovat především adhezním molekulám ze skupiny cadherinů a proteinům s nimi asociovanými.

CADHERINY A CATENINY

Cadheriny jsou rodina transmembránových glykoproteinů, které zprostředkovávají adhezi buněk a jejichž funkce je závislá na přítomnosti Ca^{2+} iontů. Tvoří rodinu proteinů, která je tvořena nejméně 6 skupinami, které mohou být rozlišeny na základě složení proteinové domény, genomové struktury a fylogenetické analýzy sekvence proteinu – celkem je známo více než 30 různých cadherinů. Patří sem klasické cadheriny neboli cadheriny typu-I (E-, N-, P-cadherin, L-CAM), atypické neboli cadheriny typu-II (např. cadherin-6, -7, -8, -10, -11), desmosomální cadheriny (desmocolliny, desmogleiny), protocadheriny (protocadherin-1, -2, OL-protocadherin, CNR-protocadheriny) a Flamingo cadheriny (cadherin-related receptor-like proteiny) (Alberts et al. 2002; Cheng a Mruk 2002; Johnson et al. 2000; Nachtigal et al. 2001).

KLASICKÉ CADHERINY

Molekuly klasických cadherinů (E-cadherin – epithelial; N-cadherin – neural; P-cadherin – placental; L-CAM - liver-cell adhesion molecule) se skládají z extracelulární adhezivní domény, transmembránové části a cytoplazmatické domény. Extracelulární doména je zodpovědná za mezibuněčnou adhezi mezi cadheriny. Je složena ze čtyř až pěti opakujících se částí, které se skládají asi ze 110 aminokyselin. Tato struktura je určena k vázání Ca^{2+} iontů. Přítomnost Ca^{2+} iontů je nezbytná pro adhezi cadherinových molekul mezi sousedními buňkami. Cytoplazmatická doména (-COOH konec) interaguje s cytoplazmatickými proteiny z “armadillo“ rodiny nazývanými cateniny, konkrétně s β -cateninem a χ -cateninem. Tento komplex se váže s α -cateninem, který zprostředkovává vazbu s aktinovými vlákny. I tento proces vyžaduje přítomnost Ca^{2+} a je regulován GTPázami. V nepřítomnosti Ca^{2+} je cadherin inaktivován a snadněji podléhá proteolýze (Cheng a Mruk 2002; Nachtigal et al. 2001).

N-cadherin je exprimován Sertoliho i zárodečnými buňkami (spermatocyty a spermatidy) a vytváří zde komplex s β -cateninem u potkanů i u lidí (Andersson et al. 1994; Chung et al. 1998). Podílí se na ukotvení zárodečných buněk v epitelu a na jejich transportu epitelem (Chung et al. 1998; Newton et al. 1993). N-cadherin nebyl prokázán v Leydigových ani v peritubulárních myoidních buňkách (pouze v endotelu testikulárních kapilár) na rozdíl od E-cadherinu, který se naopak nevyskytuje v zárodečném epitelu (v průběhu vývoje varlete ani v dospělosti). V intersticiální tkáni se ovšem E-cadherin u potkana vyskytuje jak ve fetálních Leydigových buňkách, tak i v dospělosti (Byers et al. 1994; Chung et al. 1998). Nebyl ale detekován v lidském varleti

(Andersson et al. 1994). P-cadherin byl detekován pouze v Sertoliho buňkách do 8. dne postnatálně a v dospělosti se vyskytuje pouze v peritubulárních myoidních buňkách u myši (Lin a DePhilip 1996). P- a N-cadheriny jsou ve varleti potkana různě exprimovány v průběhu postnatálního vývoje. Zatímco mRNA P-cadherinu je nejvyšší v době tvorby BTB a poté dochází k poklesu hladin na méně než poloviční úroveň, hladina mRNA N-cadherinu stoupá až do 42. dne po narození (uvolnění prvních spermatid z epitelu do lumen kanálu), poté dochází k mírnému poklesu a hladina se již drží na konstantní úrovni (Cyr et al. 1992).

CATENINY

β -catenin a χ -catenin interagují s cytoplazmatickou doménou cadherinů. α -catenin zajišťuje spojení s aktinovým cytoskeletem buď přímo, nebo přes aktin-vázací proteiny (např. α -actinin, vinculin, ZO-1) (Cheng a Mruk 2002; Watabe-Uchida et al. 1998). Jednotlivé typy cateninů existují v různých dalších subtypech charakteristicky se vyskytujících v různých tkáních (např. α_T -catenin, α_N -catenin, α_E -catenin) (Janssens et al. 2003). Cadheriny, cateniny a komplex cadherin/catenin mají dvě hlavní funkce. Jsou zodpovědné za mezibuněčnou adhezi a podílejí se na přenosu signálu v buňce. Adhezní a signalizační vlastnosti těchto molekul nemohou být odděleny. Jakákoliv změna v expresi nebo funkci cadherinů by mohla vést k zahájení nebo progresi patologického procesu. Variabilita interakcí cadherinů a cateninů umožňuje vytvoření různých signalizačních systémů v odlišných tkáních (Cheng a Mruk 2002; Nachtigal et al. 2001). Ve varlatech jsou cateniny exprimovány v Sertoliho i v zárodečných buňkách v komplexu s cadheriny např. jako součást ektoplazmatických specializací (Lee et al. 2003). Dále např. α_T -catenin je hojný v peritubulárních myoidních buňkách (Janssens et al. 2003) a catenin označovaný jako p120^{cas} je součástí spojů desmosomálního typu mezi různými typy buněk v zárodečném epitelu (Johnson a Boekelheide 2002).

DESMOSOMÁLNÍ CADHERINY - DESMOGLEINY A

DESMOCOLLINY

Jsou známy 3 zástupci obou typů desmosomálních cadherinů. Na rozdíl od klasických cadherinů interagují s vlákny intermediárních filament (Buxton a Magee 1992). Byly prokázány i v zárodečném epitelu varlete kolem spermatid (Wine a Chapin 1999).

NECTINY A AFADIN

Vedle komplexu cadherin/catenin se ve většině adhezních spojů nachází také nectiny a afadin. Jsou známy 4 různé nectiny označované jako nectin-1, -2, -3 a -4. Ve varleti byly detekovány nectin-2 a -3 (nectin-2 v Sertoliho buňkách a nectin-3 v elongovaných spermatidách) (Ozaki-Kuroda et al. 2002). Intracelulární doména molekuly nectinu interaguje s afadinem (označovaný také jako AF-6). Afadin je aktin vázajícím proteinem (který interaguje také se ZO-1 nebo α -cateninem). Dohromady vytvářejí nectin/afadin komplex. Nectin i afadin patří do rodiny immunoglobulin-like adhezních molekul. Afadin byl detekován také v TJ (Cheng a Mruk 2002; Ikeda et al. 1999b) a na základě několika pozorování se předpokládá, že nectin/afadin komplex se podílí na organizaci nově vznikajících TJ (Gumbiner 1996; Takai a Nakanishi 2003; Vleminckx K 1999). U fibroblastů v buněčné kultuře byla sledována dynamika tvorby AJ a ukázalo se, že vytvoření nectin/afadinového spojení dvou sousedních buněk předchází tvorbě E-cadherin/cateninového propojení (Takai a Nakanishi 2003). V AJ spolu komplexy cadherin/catenin a nectin/afadin neinteragují přímo, ale přes některé proteiny jako např. ZO-1 (Yokoyama et al. 2001). Způsob, jakým se komplex nectin/afadin podílí na pevnosti adherentních spojů, není přesně vysvětlen, ale u afadin^{-/-} transgenních myši byla pozorována porušená struktura i funkce nejen adherentních spojení, ale také TJ (Ikeda et al. 1999b).

Nectin-2/afadin a nectin-3/afadin komplexy jsou součástí ektooplazmatických specializací společně s $\alpha_6\beta_1$ -integrin/laminin a cadherin/catenin komplexy (Mulholland et al. 2001). Role cadherin/cateninových komplexů v apikálních ES je nejasná, spíš se zdá, že se na tvorbě těchto spojení podílejí pouze minoritně a apikální ES jsou tvořeny převážně systémem nectin/afadin (Takai a Nakanishi 2003).

TESTIN

Testin je AJ-asociovaný protein existující ve dvou variantách (testin I a testin II), který se vyskytuje v Sertoliho buňkách. Jedná se o produkt Sertoliho buněk, který se vyskytuje v AJ (ektooplazmatické specializace i tubulobulbární komplexy) především mezi Sertoliho buňkami a pozdními spermatidami (Grima et al. 1998; Cheng a Mruk 2002). Poškození AJ mezi Sertoliho a zárodečnými buňkami vede ke zvýšení exprese testinu. Zdá se, že testin „monitoruje“ funkci AJ (Grima et al. 1998).

Množství zárodečných buněk v různém stupni vývoje dává vzniknout obrovské variaci různých typů adherentních spojení mezi zárodečnými a Sertoliho buňkami. Na těchto spojeních se podílejí různé proteiny a není proto divu, že ve varleti potkana bylo detekováno minimálně 24 různých proteinů z rodiny cadherinů - 3 z klasických (N-, E-, P-cadherin) (Andersson et al. 1994; Byers et al. 1994; Wu et al. 1993) a 4 z atypických cadherinů (cadherin-6, -8, -10, -11), dále 14 protocadherinů (ze 3 skupin – PCDH- α , - β , χ), 2 protocadherin-related cadheriny (FAT, VE-cadherin-2) a 1 cadherin-related receptor-like protein – flamingo cadherin) prokázaných na úrovni mRNA, příp. i proteinu (Johnson et al. 2000; Munro a Blaschuk 1996). Navíc tyto cadheriny jsou různě exprimovány v zárodečném epitelu v průběhu vývoje varlete.

Adherentní spojení ve varleti jsou specifická pro svou nesymetričnost. Zatímco spoje mezi Sertoliho buňkami navzájem jsou většinou symetrické, spojení mezi Sertoliho a zárodečnými buňkami jsou většinou nesymetrická. Takovým příkladem jsou například desmosomální spoje mezi Sertoliho buňkami a kulatými spermatidami (pouze Sertoliho buňky obsahují intermediární filamenta) nebo ES mezi Sertoliho a elongovanými spermatidami, z jejichž strany v těchto spojeních neexistují žádné submembránové struktury podílející se na stavbě ES (Johnson et al. 2000).

Na tomto místě je nutné zmínit fakt, že exprese a funkce adherentních spojení ve varleti podléhá neustálé hormonální kontrole, na které se podílejí testosteron a FSH. Je známo, že v situacích, kdy je redukována hladina testosteronu ve varleti, dochází k odloučení kulatých spermatid ze zárodečného epitelu (ve stádiu epitelu VII-VIII). Bylo např. prokázáno, že exprese N-cadherinu je *in vitro* stimulována testosteronem v přítomnosti FSH (Perryman et al. 1996).

NEXY

Nexus, neboli volné spojení (gap junctions - GJ), se vyskytuje prakticky kdekoli podél bočních membrán epitelových buněk. Je charakterizován těsným přimknutím sousedních buněčných membrán až na 2 nm. Zajišťuje metabolické a elektrické propojení buněk, jejich kooperaci a předávání informací během vývoje i během funkce jednotlivých orgánů. Bylo prokázáno, že nexy dovolují výměnu iontů i molekul do hmotnosti cca 1 kDa - ionty, aminokyseliny, malé peptidy, druzí poslové (cAMP, IP₃, Ca²⁺) a další metabolity (Lampe a Lau 2004; Shibata et al. 2001).

Jednotku nexu, nazývanou connexon, tvoří proteiny zvané connexiny. Molekuly connexinu vytvářejí hexamer – connexon. Při tvorbě GJ každá z přilehlých buněk

vytváří jednu část kanálku, propojením protilehlých connexonů vzniká mezi oběma buňkami jeden souvislý kanál. Tvorba a zánik těchto kanálů je dynamický proces, poločas životnosti GJ je cca 2 hodiny. Tento proces je regulován změnami membránového potenciálu, pH a fosforylací connexinů (Lampe a Lau 2004). GJ mohou být tvořeny 2 stejnými (homotypické GJ) i různými (heterotypické GJ) connexony. Existují i connexony tvořené více typy connexinů (heteromerické GJ). *In vitro* studie ovšem prokázaly, že ne všechny kombinace connexinů vytvářejí aktivní kanály (Goldberg et al. 2004). Ačkoliv se zdá, že struktura GJ není složitá jako u jiných typů mezibuněčných spojení, spíše to odráží fakt, že o přesnější strukturu těchto spojení jsou naše znalosti limitované.

CONNEXINY

Connexiny patří do skupiny integrálních membránových proteinů, které oligomerizací vytvářejí GJ. Connexinová rodina proteinů zahrnuje u člověka minimálně 20 connexinů, které jsou označovány čísly podle molekulární hmotnosti (např. connexin 31 = 31kDa, connexin 43 = 43 kDa,...) (Goodenough et al. 1996; Lampe a Lau 2004; Plum et al. 2000). Molekula connexinu prochází čtyřikrát membránou a vytváří 3 cytoplazmatické a 2 extracelulární domény. Connexiny jsou různou měrou exprimovány v tkáních – některé jsou ubikvitní (např. connexin43), jiné jsou exprimovány pouze v omezeném počtu tkání, např. connexin 37 se nachází v endotelu, v plicích, v endokardu a vaječníku; connexin 26 v placentě a ve vnitřním uchu; connexiny 46 a 50 se nacházejí v oční čočce (Shibata et al. 2001). Různost connexinů umožňuje vytvoření GJ s různou transportní specifitou a kapacitou. Např. buňky exprimující GJ tvořené connexinem 43 mají schopnost transportovat 300x více ATP a 8x více ADP a AMP než-li GJ tvořené connexinem 32 (Goldberg et al. 2002).

Tvorba GJ je komplikovaný, regulovaný proces zahrnující biosyntézu connexinů na membránách endoplazmatického retikula, oligomerizaci do connexonu, transport connexonu k plazmatické membráně, zabudování do membrány a vytvoření vlastního kanálu (Herve et al. 2004; Segretain a Falk 2004). Během všech těchto dějů dochází k interakcím molekul connexinů mezi sebou, ale i k interakcím s dalšími proteiny – proteiny podílejícími se na stavbě jiných typů mezibuněčných spojení – claudiny, ZO-1, N-cadherin, β -catenin; s cytoskeletem; s enzymy - proteinkináza C; s intracelulárními transportními proteiny – caveolin; a s mnoha dalšími (Herve et al. 2004). ZO-1 a cateniny jsou např. důležité pro transport connexinu 43 k membráně v kardiomyocytech

(Wu et al. 2003), E-cadherin a α -catenin ko-lokalizují s connexiny 26 a 32 v době utváření GJ a dokonce se zdá, že cadherin-cateninový komplex i TJ mohou fungovat jako startovací místa pro vytvoření GJ (Fujimoto et al. 1997; Herve et al. 2004).

GJ se u obratlovců podílejí na různých biologických funkcích. Například v srdci dovolují rychlý mezibuněčný transfer akčních potenciálů, zajišťují koordinovanou kontrakci kardiomyocytů. Jsou také odpovědné za neurotransmisí ve specializovaných „elektrických“ synapsích. Jejich funkce v nevzrušivých tkáních, jako jsou např. játra nebo cévní stěna, je méně probádána. Předpokládá se, že přechodem druhých poslů přes GJ v těchto tkáních dochází ke koordinaci funkce buněk v těchto tkáních. Jejich role je důležitá i v průběhu embryonálního vývoje různých tkání. Poškozená funkce GJ se podílí (nebo je dokonce jednou z příčin) na vzniku patologických procesů – některé formy neuropatie, určitý typ hereditární hluchoty, katarakta, některá onemocnění kůže, srdeční choroby, nádorová onemocnění (Lampe a Lau 2004; Willecke et al. 2002).

CONNEXINY VE VARLETI

V zárodečném kanálu varlete byly identifikovány transkripty (mRNA) minimálně 12 různých connexinů (Batias et al. 2000; Risley 2000). Nejvíce rozšířený je connexin 43, který se v myším varleti objevuje již v časných stádiích embryonální gonády (Pelletier 1995) a jeho exprese roste kontinuálně až do dospělosti, kdy se jeho exprese v zárodečném epitelu mění v závislosti na stádiu epitelu. Je přítomen také v Leydigových buňkách (Batias et al. 2000; Bravo-Moreno et al. 2001; Perez-Armendariz et al. 1994; Risley et al. 1992). Dále byly ve varleti detekovány a lokalizovány connexin 26 a connexin 32 - apikální region epitelu (Brehm et al. 2002; Risley et al. 1992), connexin 31 v bazálním kompartmentu epitelu (Mok et al. 1999), connexin 37 v endotelu testikulárních cév (Tan et al. 1996) a connexin 33 v Sertoliho buňkách ve stádiu epitelu II-VII (Tan et al. 1996).

Connexin 43 je nejhojnějším proteinem GJ testikulárních buněk a je exprimován v několika typech buněk varlat. Vyskytuje se v GJ mezi Sertoliho buňkami a spermatogoniemi i spermatocyty a mezi sousedními Sertoliho buňkami v bazálním kompartmentu zárodečného epitelu, kde ko-lokalizuje se ZO-1 proteinem (Batias et al. 1999; Byers et al. 1991). Dále je hojně přítomen v Leydigových buňkách. Jeho exprese je nezbytná pro postnatální rozvoj buněk samčí zárodečné linie; nedostatečná exprese connexinu 43 má za následek samčí neplodnost (Bravo-Moreno et al. 2001). Výzkum prováděný na myších, kterým chyběl gen pro connexin 43, prokázal nedostatek

zárodečných buněk během fetálního vývoje přetrvávající postnatálně a dávající vznik syndromu „Sertoli cells only testis“ v dospělosti (Roscoe et al. 2001). Za fyziologických podmínek je exprese connexinu 43 závislá na stádiu semenotvorného epitelu a jeho exprese je redukována v semenotvorném epitelu s poškozenou spermatogenezí. U transgenních *jun d^{-/-}* myši, u nichž se v zárodečném epitelu vyskytují pouze Sertoliho buňky, nebyl v zárodečném epitelu connexin 43 detekován a u *ebo/ebo* mutovaných myši, kterým chybí pouze elongované spermatidy, také dochází poklesu exprese connexinu 43, ačkoliv je exprimován především v bazálním kompartmentu semenotvorného kanálu (Batias et al. 1999; Lalouette et al. 1996).

Perez-Armendariz et al. (1994) zkoumali expresi connexinu 43 v průběhu vývoje myších varlat. Connexin 43 detekovali již v nediferencovaných gonádách a v buňkách mezonefrických tubulů 11,5. den po oplození. 12,5. den po oplození, kdy dochází k sexuálnímu odlišování gonád, byl connexin 43 lokalizován v intersticiu v Leydigových buňkách a v semenných provazcích mezi sousedními Sertoliho buňkami, kde jeho exprese rostla 14,5., 16,5. a 18,5. den po oplození. Od 12,5. do 18,5. dne po oplození byl connexin 43 také zjištěn v místech spojení zárodečných a Sertoliho buněk (Bravo-Moreno et al. 2001). Také v nadvarletí byl imunocytochemicky prokázán výskyt connexinu 43, a to na bázi epitelu mezi bazálními a hlavními buňkami a mezi svalovými buňkami, které obklopují ductus epididymidis (Tan et al. 1996).

CYTOSKELET

Základní hmota cytoplazmy eukaryotických buněk obsahuje složitou síť mikrotubulů, mikrofilament a intermediárních filament - cytoskelet. Jsou to vysoce dynamické struktury, kde interakce mezi jednotlivými molekulami jsou nekovalentní, proto mohou snadno polymerizovat nebo depolymerizovat. Funkcemi cytoskeletu jsou především přeměna chemické energie v mechanickou, tj. zajištění funkce pohybové, dále funkce strukturní - určování tvaru buňky a všech jejích součástí, udržování rozložení organel v buňce a snad i funkce informační, tj. uchovávání a přenos informace. K základním strukturám cytoskeletu se připojují další specifické bílkoviny, tzv. asociované proteiny, které zastávají různé funkce. Některé asociované proteiny ovlivňují morfogenezi vláken, jiné stabilizují strukturu, podílejí se na jejich funkci, spojují vlákna do vyšších struktur nebo je spojují s jinými buněčnými strukturami.

MIKROTUBULY

Mikrotubuly jsou trubicovitá vlákna se zevním průměrem 24 nm. Délka mikrotubulů je velmi různá (až několik μm). Základní stavební jednotkou mikrotubulů je tubulin. Je to heterodimer složený z podjednotek α - a β -tubulinu, které mají velice blízké složení aminokyselin. V posledních letech byl popsán další tubulin - γ -tubulin. Tento tubulin nepolymerizuje do vláken, ale je součástí mikrotubuly organizujících center. Polymerizace či depolymerizace mikrotubulů může být specificky ovlivněna řadou látek, např. mikrotubulárními toxiny (kolchicin, vinblastin, vinkristin...). Kolchicin vazbou na tubulin brání jeho polymerizaci, vinblastin vyvolává depolymerizaci mikrotubulů.

Hlavní funkcí mikrotubulů je funkce pohybová a strukturní. Zpravidla jsou oba procesy spojeny. Mikrotubuly jsou strukturálním základem kinocílií a současně mechanickými elementy jejich pohybu. Úloha mikrotubulů se předpokládá i při nitrobuněčném transportu jiných součástí buňky - pohyb chromozómů podél dělicího vřeténka, pohyby organel nebo vezikul v buňce (Junqueira et al. 1999).

MIKROFILAMENTA

Mikrofilamenta vytvářejí v buňce souvislou síť nebo jsou soustředěny do specializovanějších struktur. Základní bílkovinou mikrofilament je aktin. Aktinové mikrofilamentum je tvořeno dvěma navzájem obtočenými řetízky polymerizovaného aktinu. Průměr mikrofilament je 5 – 7 nm a délka je velmi různá (až několik μm).

Mikrofilamenta jsou u svalových buněk základem svalového pohybu, který je výsledkem interakce mezi dvěma proteiny: aktinem a myosinem. Vedle kinetických funkcí mají mikrofilamenta i funkci strukturní. Mikrofilamenta, navzájem příčně svázaná určitými asociovanými proteiny, jsou strukturálním základem některých výběžků buněk, např. svazky mikrofilament vyztužují mikrokilky buněk střevní sliznice. Mikrofilamenta se patrně podílejí také na procesech jako je endocytóza, exocytóza a buněčná migrace. Předpokládá se, že filamenta hrají roli při pohybu a posunech cytoplazmatických komponent. Podílejí se na zaškrcování buněk v průběhu buněčného dělení (Junqueira et al. 1999).

INTERMEDIÁRNÍ FILAMENTA

Tloušťkou (10 – 12 nm) stojí intermediární filamenta (IF) mezi mikrofilamenty a mikrotubuly. IF se nacházejí v cytoplazmě a také v jádře (laminy – IF typu V). Na rozdíl od mikrofilament a mikrotubulů jsou IF tvořena z různých typů vláken specifických pro daný typ buněk. Podle struktury se IF dělí do šesti skupin : IF typu I a II zahrnují cytokeratiny, kterých je známo více než 20 typů. Mezi IF typu III jsou řazeny – vimentin, desmin, GFAP (glial fibrilar acidic protein) a peripherin; typu IV - IF nacházející se v neuronech – neurofilamentový protein, α -internexin. Další, nově popsaná IF se většinou označují jako IF typu VI – nestin, synemin, paranemin, tanabin (Evans 1998; Paramio a Jorcano 2002). Různě diferencované buňky (epiteliální, mezenchymové, gliové atd.) mají intermediární filamenta tvořena různými proteiny. Cytokeratiny se vyskytují v epiteliálních buňkách. Vimentin je typický pro buňky mezenchymového původu, desmin pro buňky svalové, GFAP pro buňky gliové a neurofilamentový protein je charakteristický pro buňky nervové (Junqueira et al. 1999). Důvod, proč tomu tak je, zůstává stále obestřen tajemstvím.

Hlavní funkcí IF je funkce strukturní. V současné době se ovšem názory na funkci IF v buňkách revidují a často lze v literatuře najít protichůdné nálezy. IF se podílí na udržování tvaru buněk, rozmístění některých organel, na propojení buněk ve tkáních a tvoří základní zpevňovací síť a organizační základ celého cytoskeletu. Bylo ovšem zjištěno, že fibroblasty získané z vimentin^{-/-} transgenních myši, nevykazují žádné změny v uspořádání organel, mikrotubulů ani mikrofilament (Evans 1998), proto se zdá, že pro správnou organizaci cytoskeletu nejsou nezbytné. Na rozdíl od dřívějších názorů, že se IF nepodílejí na pohybových funkcích buňky, se ukazuje, že i některé IF jsou dynamickou strukturou, podílejí se na transportních funkcích uvnitř buňky, interagují

s různými molekulami – kinázy, fosfatázy a mají tudíž také schopnost modulovat jejich funkce (např. vimentin ovlivňuje funkci fosfolipázy A₂, keratiny interagují s různými kinázami, fosfatázami nebo se zástupci z rodiny 14-3-3 proteinů) (Helfand et al. 2004; Junqueira et al. 1999; Paramio a Jorcano 2002).

CYTOSKELET VE VARLETI

Tubulin se nachází v Sertoliho buňkách, v dělicím vřetenku spermatogonií a spermatocytů, v manžetě vyvíjejících se spermatid a v jejich bičíku. Distribuce tubulinu v semenotvorném kanálku varlete je závislá na stádiu epitelu a mění se v průběhu vývoje zárodečných buněk (Aumuller a Seitz 1988). **Aktin** se hojně nachází v hladkosvalových buňkách testikulárních arteriol, v intersticiálních makrofázích a v peritubulárních myoidních buňkách (u potkana se v nich objevují aktinová vlákna cirkulárně uspořádaná mezi 15.-20. dnem života, poté kolem 30. dne se objevují i longitudinální vlákna podél zárodečného kanálu a 40. den jsou již vlákna uspořádána mřížkovitě (Maekawa et al. 1995)). V zárodečném epitelu se aktin vyskytuje v bazálním kompartmentu u spojení Sertoliho buněk a v blízkosti hlav zanořených spermatid (u adherentních spojení typu ektoplazmatických specializací) (Aumuller a Seitz 1988). Aktin byl také detekován v intercelulárních můstcích a tubulobulbárních komplexech (Mulholland et al. 2001). V bazálním kompartmentu Sertoliho buněk jsou aktinová vlákna uspořádána do hexagonálních struktur, které se tvoří u potkana po 30. dni života (Maekawa et al. 1995).

IF VE VARLETI

Vzhledem k přítomnosti různých typů buněk se ve varleti nacházejí různé typy IF. Vimentin, desmin a cytokeratiny jsou zastoupeny nejhojněji.

Vimentin se nachází ve vaskulárním endotelu, v Leydigových buňkách, lymfocytech, peritubulárních myoidních buňkách, fibrocytech a v Sertoliho buňkách, desmin v peritubulárních myoidních buňkách a cytokeratiny v epitelu rete testis. Cytokeratiny byly detekovány také ve vyvíjejících se Sertoliho buňkách u potkana do 14. dne po narození a mizí v okamžiku, kdy začíná spermatogeneze (Paranko et al. 1986). Podobná exprese byla popsána u králíků (Aumuller et al. 1992). U člověka v průběhu intrauterinního vývoje Sertoliho buňky exprimují také desmin (do 11. – 14. týdne) a cytokeratiny (do 20. týdne). Všechny 3 typy IF byly popsány také v dospělém kryptorchickém varleti a v tubulech, které se nacházely v blízkosti testikulárního nádoru (Rogatsch et al. 1996).

VIMENTIN

Vimentin vytváří filamenta, která jsou typická pro buňky mezenchymového původu (např. fibroblasty, chondroblasty, makrofágy, endotelové buňky, hladká svalovina cév) a embryonální nebo nediferencované buňky. Molekulová hmotnost vimentinu je 56 – 58 kDa (Junqueira et al. 1999). Vzhledem k tomu, že v savcích Sertoliho buňkách jsou IF tvořena vimentinem, kdežto zárodečné buňky jej neobsahují (nejsou mezodermálního původu), je vimentin někdy používán jako marker Sertoliho buněk v zárodečném epitelu, případně v buněčných kulturách Sertoli buněk (Suter et al. 1997; Zhu et al. 1997).

Vimentinová vlákna tvoří v bazální části epitelu hustou síť, z níž vyběhají apikálním směrem vlákna ke strukturám adherentních spojení v cytoplazmatické membráně Sertoliho buněk (hemidesmosomální spojení mezi Sertoliho buňkami a extracelulární matrix a desmosomální spojení mezi Sertoliho buňkami a sousedními zárodečnými buňkami). Předpokládá se, že vimentinová filamenta mají význam pro ukotvení zárodečných buněk v semenotvorném epitelu (Amlani a Vogl 1988). Připojení IF vláken k adherentním spojení zprostředkovávají tzv. IF asociované proteiny např. plektin (Guttman et al. 1999).

Distribuce vimentinu v Sertoliho buňkách se mění podle cyklu semenotvorného epitelu a zdá se, že souvisí s umístěním a pohybem hlavičky elongující se spermatidy uvnitř zárodečného epitelu (Allard et al. 1993; Amlani a Vogl 1988; Hall et al. 1991; Zhu et al. 1997). Cyklické změny v distribuci vimentinových vláken v Sertoliho buňkách byly popsány u potkanů i u lidí (Aumuller et al. 1992). Jedná se o dynamicky se měnící vlákna, kde fosforylace a defosforylace vimentinových jednotek je závislá na FSH, který tak ovlivňuje uspořádání vimentinových vláken v Sertoliho buňkách (Spruill et al. 1983).

Poškození vimentinových filament v Sertoliho buňkách působením některých xenobiotik má souvislost s porušením struktury semenotvorného epitelu. Kolaps vimentinových vláken byl pozorován např. po podání toluenu (Dalgaard et al. 2001), mono(2-ethylhexyl)ftalátu (Richburg a Boekelheide 1996), 2,5-hexandionu (Hall et al. 1991) nebo kolchicinu (Allard et al. 1993). Podobně experimentální snížení intratestikulární hladiny testosteronu rezultovalo v odlučování spermatid od Sertoliho buněk a v jejich uvolnění do lumen kanálku, které bylo doprovázeno kolapsem vimentinových vláken (Show et al. 2003). Ke kolapsu vimentinových vláken dochází také vlivem nefyziologických podmínek např. při operabilně navozeném kryptorchismu (Wang et al. 2002b).

PROLIFERAČNÍ AKTIVITA VE TKÁNI VARLAT A **APOPTÓZA, PROHIBITIN**

PROLIFERAČNÍ AKTIVITA VE VARLATECH

Spermatogeneze není náhodný jev, ale probíhá ve vlnách mitotické aktivity různých populací zárodečných buněk v definovaných stádiích spermatogeneze (Leblond a Clermont 1952). K hodnocení proliferační aktivity zárodečných buněk v průběhu spermatogeneze se používalo morfometrické hodnocení histologických řezů nebo hodnocení počtu zárodečných buněk po jejich zničení ozářením rentgenovým zářením. Jednou z metod, která se stále využívá, je autoradiografická detekce ¹³C-thymidinu nebo ³H-thymidinu, častěji se však využívá imunohistochemický průkaz bromodeoxyuridinu (BrdU), zabudovávaného v průběhu S-fáze buněčného cyklu do DNA.

Detekce antigenů selektivně exprimovaných během různých fází buněčného cyklu byla zpočátku využívána hlavně ve výzkumu maligních nádorů, dnes je používána k určování buněčné proliferace v různých experimentech. Takovýto marker proliferace by měl splňovat 2 základní podmínky – (i) antigen musí být nepřetržitě přítomen v buňkách během buněčného cyklu všech typů buněk; (ii) přechod buňky do klidového stádia musí být rychle následován vymizením exprese tohoto antigenu (Scholzen a Gerdes 2000). V současné době jsou jako markery proliferační aktivity buněk využívány např. tyto proteiny:

Ki-67

Jedná se o dva proteiny 345kDa a 390kDa (Liu a Klein-Szanto 2000) (resp. 320 a 359kDa (Scholzen a Gerdes 2000)) přítomné pouze v jádrech proliferujících buněk. Ki-67 se akumuluje od pozdní G₁-fáze až do M-fáze, kdy je ho v jádrech přítomno nejvíce (Kausch a Bohle 2002; Liu a Klein-Szanto 2000). V G₁-fázi je přítomen v nukleolech, jeho lokalizace v průběhu S- a G₂-fáze se liší podle pozorování různých autorů – pouze nukleoly (Kill 1996), nukleoly + nukleoplazma (du Manoir et al. 1991). V průběhu mitózy je lokalizován na povrchu chromosomů, po porušení nukleární membrány je část i v cytoplasmě (Scholzen a Gerdes 2000). Není přítomen v buňkách nacházejících se v G₀-fázi. Ačkoliv se jako marker proliferační aktivity buněk používá již více než dvě desetiletí, není jeho fyziologická funkce dosud známa.

PCNA (PROLIFERATION CELL NUCLEAR ANTIGEN)

PCNA je nehistonový, fylogeneticky konzervovaný protein o velikosti 36 kDa lokalizovaný v jádře buňky (u člověka a potkana se liší pouze ve čtyřech aminokyselinách). Hraje zásadní roli v metabolismu nukleových kyselin jako součást replikačních a opravných mechanismů (funguje např. jako kofaktor pro DNA polymerázu γ) (Kausch a Bohle 2002). PCNA prstencovitě obklopuje DNA a může se pohybovat po dvoušroubovici oběma směry (Chieffi et al. 2000). Největší exprese PCNA byla zjištěna v přechodu G₁/S-fáze buněčného cyklu, těsně před začátkem replikace DNA, naopak nejnižší v M-fázi (Schlatt a Weinbauer 1994). V praxi se často pro určení proliferací aktivity v tkáních používá PCNA-PI (PCNA- proliferací index), vyjádřený jako poměr počtu PCNA pozitivních jader buněk k celkovému počtu jader buněk sledovaného typu (Santamaria et al. 1995; Tanaka et al. 1996; Zeng et al. 2001).

Schlatt a Weinbauer (1994) studovali výskyt PCNA ve varlatech různých živočišných druhů – potkana, křečka, opice (rod *Macacus*) a člověka. PCNA pozitivní buňky byly nalezeny u všech zkoumaných druhů. Barvení bylo lokalizováno v jádře buněk. V dospělosti byly pozitivní hlavně spermatogonie a spermatocyty a také několik peritubulárních a intersticiálních buněk.

U potkana byly PCNA pozitivní buňky nalezeny v bazální části semenotvorného epitelu. V jednotlivých kanálcích byl obarven jeden (spermatogonie) nebo dva typy (spermatogonie a spermatocyty) zárodečných buněk. Všechny zárodečné buňky ve fázi mezi diferencující se spermatogonií až po pachytenní spermatocyty ve stádiu VI byly PCNA pozitivní. Nejnižší intenzita barvení oproti ostatním stádiím byla pozorována ve stádiu VII.

Člověk: Všechna stadia diferencujících se spermatogonií až po pachytenní spermatocyty ve stádiu III byla silně pozitivní. Žádná tmavá spermatogonie A nebyla obarvena. Světlé spermatogonie typu A byly PCNA pozitivní ve stádiu V (Schlatt a Weinbauer 1994).

Při porovnání Ki-67 a PCNA se zdá být výhodnějším užití Ki-67, neboť vykazuje nižší background (PCNA značí obvykle více buněk než Ki-67). PCNA existuje ve dvou formách – s replikací asociovaná a neasociovaná forma, která je přítomna téměř ve všech cyklujících buňkách. Navíc PCNA má dlouhý poločas - 20h (Ki-67 - ~1hod (Scholzen a Gerdes 2000)), a proto může být stále přítomen i v buňkách, které se ocitly

teprve krátce mimo buněčný cyklus – např. v klidové G_0 - fázi (Liu a Klein-Szanto 2000). V lidských varlatech bylo pozitivních $26,6 \pm 12,4\%$ Ki-67 a $46,3 \pm 9,5\%$ PCNA spermatogonií (Steger et al. 1998).

DALŠÍ, MÉNĚ ČASTO POUŽÍVANÉ PROLIFERAČNÍ MARKERY

G_1/S cykliny

Cykliny jsou peptidy, které regulují cyklin dependentní kinázy – kinázy zodpovědné za fosforylace/defosforylace proteinů intracelulárních proteinů, které regulují nebo iniciují důležité procesy v průběhu buněčného cyklu. G_1/S cykliny kontrolují postup G_1 fáze a jsou exprimovány v G_1 a S fázi. Jejich hlavní kontrolou je přechod G_1 a S fáze – umožňují zahájení replikace DNA (Alberts et al. 2002; Liu a Klein-Szanto 2000).

CENP-F (Centromere protein F)

Lidský kinetochorový protein byl detekován pouze v době přechodu G_2/M fází – nový marker těchto fází (Liao et al. 1995; Liu a Klein-Szanto 2000).

APOPTÓZA

Apoptóza je programovaná buněčná smrt, která je morfologicky charakterizována sraštěním buňky, kondenzací jaderného chromatinu a jeho fragmentací, vznikem puchýřů na cytoplazmatické membráně a rozpadem buněk do apoptotických tělísek. Při apoptóze chybí zánětlivá reakce. Může probíhat spontánně, nebo jako odpověď na specifické fyziologické nebo patologické podněty.

V průběhu spermatogeneze se apoptóza vyskytuje jako normální jev, kterým je redukována produkce spermií. Tímto způsobem je odstraněna více než polovina zárodečných buněk. Apoptoticky zanikají zejména spermatocyty, příležitostně byl zaznamenán také zánik spermatogonií. Pomocí histochemických metod je ovšem obtížné buňky podléhající apoptóze zachytit, neboť jsou rychle fagocytovány Sertoliho buňkami (Callard et al. 1995; Miething 1992; Nakanishi a Shiratsuchi 2004; Savill a Fadok 2000).

U kryptorchických varlat bylo experimentálně prokázáno, že počet apoptotických buněk v semenotvorných kanálcích se s časem signifikantně zvyšuje oproti kontrole i kontralaterálnímu skrotálnímu varleti (u jednostranného

kryptorchismu). To se po určité době může projevit snížením hmotnosti kryptorchického varlete. U operativně navozeného bilaterálního kryptorchismu u potkanů bylo největší množství TUNEL (Gavrieli et al. 1992) pozitivních buněk pozorováno mezi 4. – 7. dnem kryptorchismu (Barqawi et al. 2004). U unilaterálního kryptorchismu dochází k poškození zárodečných buněk v abdominálně umístěném varleti od 2. až 3. dne (Kocak et al. 2002; Li et al. 2003; Watts et al. 2000). Někteří autoři uvádějí zvýšený počet apoptotických buněk proti kontrole nejen v kryptorchickém varleti, ale i v kontralaterálním skrotálním varleti (Wang et al. 1998).

Příčina rozsáhlé apoptózy v kryptorchickém varleti není plně objasněna a pravděpodobně se na ní podílí více mechanismů. Byla popsána p53 - dependentní (Ogi et al. 1998; Ohta et al. 2003), Fas - dependentní a p53 - independentní (Yin et al. 2002) cesta apoptózy, dále byla prokázána role Bcl-2 rodiny proteinů, konkrétně Bcl-2 a Bax (Zhang et al. 2003) a také zvýšená funkce NO syntázy a tvorba peroxynitritového radikálu (De et al. 2004).

PROHIBITIN

Prohibitin je všudypřítomný, evolučně konzervovaný protein, který hraje roli během mnoha procesů v buňkách od bakterií (Kihara et al. 1996) až po člověka (Sato et al. 1992). U člověka existuje prohibitin ve dvou formách – PHB1 (32 kDa) a PHB 2 (37 kDa), které spolu interagují a vytvářejí komplex (~1MDa) tvořený přibližně 12-16 kopiemi každého z proteinů (Nijtmans et al. 2000). Ačkoliv je PHB přítomný ve většině buněk, jeho přesná role není dosud plně objasněna a je mu připisováno více funkcí – protinádorová aktivita (Nuell et al. 1991; Sato et al. 1992), role v přenosu intracelulárních signálů díky možnému spojení s IgM receptory (Terashima et al. 1994) nebo estrogenovými receptory (Montano et al. 1999), indukce apoptózy (Welburn a Murphy 1998), účast v regulaci transkripce díky interakci s proteiny E2F a Rb (retinoblastoma protein), které se podílejí na řízení buněčného cyklu (Wang et al. 1999a; Wang et al. 1999b; Wang et al. 2002a; Wang et al. 2002b). Role PHB v těchto procesech však zůstává stále nejasná a mlhavá (diskutováno v (Nijtmans et al. 2002).

V poslední době se zdá, že PHB by mohl mít „chaperonovou“ funkci v průběhu tvorby proteinů dýchacího řetězce v mitochondriích a být tak novým typem na membránu vázaných chaperonových proteinů (Nijtmans et al. 2002; Nijtmans et al.

2000). PHB byl skutečně lokalizován na vnitřní membráně mitochondrií, což dále koresponduje s touto hypotézou (Coates et al. 1997; Ikonen et al. 1995).

Ve varleti je PHB exprimován v Sertolihových buňkách v průběhu celého spermatogenního cyklu a také v Leydigových buňkách v intersticiu. Exprese PHB v zárodečných buňkách je závislá na cyklu zárodečného epitelu – nejvyšší exprese byla pozorována v leptotenních a pachytenních spermatocytech ve stádiu epitelu VII-IX, nižší ve spermatogoniích, preleptotenních a zygotenních spermatocytech, pachytenních spermatocytech od stádia XI a diplotenních spermatocytech. Z těchto pozorování autoři studie odvodili, že exprese ve varleti koreluje s antiproliferační aktivitou PHB (Choongkittaworn et al. 1993).

KRYPTORCHISMUS

Kryptorchismus je stav, kdy varle jednostranně nebo oboustranně chybí ve skrotu následkem poruchy sestupu z břišní dutiny. Sestup varlete do šourku v průběhu nitroděložního vývoje plodu je vícestupňový děj, na němž se podílejí některé anatomické struktury (gubernaculum, ...), mechanické vlivy (tlak v dutině břišní) a podléhá i látkové regulaci (INSL-3 – insulin-like peptide hormone, peptid tvořený fetálními Leydigovými buňkami, který stimuluje růst gubernakula; dále androgeny, AMH – anti-mülleriánský hormon, CGRP – calcitonin gene-related peptide) (Hutson et al. 1997; Klonisch et al. 2004).

Jedním z hlavních etiologických faktorů kryptorchismu je přechodný hypogonadotropní stav v době sestupu varlat, kdy funkci mateřského hCG má přebírat vlastní LH. K zadržení varlete dochází nejčastěji v retroperitoneu nebo v inguinálním kanálu, vzácně dochází k ektopickému kryptorchismu. V 85% se jedná o jednostranný kryptorchismus postihující asi 3% donošených novorozenech chlapců, u nedonošených je prevalence kolem 30%. U velké části postižených chlapců dojde během prvního roku života k samovolnému sestupu varlat do šourku (Hadziselimovic 2002; Hutson et al. 1997; Leissner et al. 1999; Wang et al. 1998). V případě přetrvávajícího kryptorchismu se provádí hormonální léčba (GnRH nebo hCG - pokud se po čtyřtydenní léčbě GnRH ve formě nasálního spreje nedostaví efekt - asi v 50%, je nutno navázat bezprostředně hCG, který má výrazný aditivní efekt, jeho nevýhodou je biologický charakter preparátu a nutnost bolestivého intramuskulárního podání – úspěšnost až kolem 70%) nebo

chirurgická léčba (orchiopexie, v méně příznivém případě s laparoskopickou orchiektomií, která chrání před možnou malignizací intraabdominálního testis). S léčbou je lépe začít co nejdříve, optimální se jeví kolem 10. měsíce života hormonální léčba, chirurgický zákrok do konce 2. roku dítěte (Hadziselimovic 2002; Kubíček 1997).

Při neléčeném kryptorchismu se první degenerace zárodečných buněk objevují již 6-12 měsíců po narození (Huff et al. 1993), morfologické změny na úrovni elektronové mikroskopie v 1-2 letech (Hadziselimovic 1977), na úrovni světelné mikroskopie ve 3-4 letech (Saito a Kumamoto 1989) a klinicky manifestovaná atrofie varlete je detekována v 5-7 letech (Hutson et al. 1997). Závažnými komplikacemi kryptorchismu jsou vznik nádorů (nejč. seminom a maligní teratom) a infertilita (v kryptorchickém varletu je zpomalena až zastavena maturace gonocytů ve spermatogonie A, gonocyty po čase degenerují) (Huff et al. 1993; Leissner et al. 1999).

Operativně navozený kryptorchismus u experimentálních zvířat způsobuje rychlou degeneraci zárodečných buněk a infertilitu, proto je používán jako model pro sledování mechanismů vedoucích k poškození spermatogeneze. Příčinou poškození zárodečného epitelu kryptorchického varlete je vliv různých faktorů v kombinaci s vyšší teplotou v břišní dutině. Mechanismy vedoucí k tomuto poškození nejsou dosud plně osvětleny, byť z několika prací publikovaných v posledních 10 letech vyplývá, že jejich výsledkem je apoptóza zárodečných buněk (Barqawi et al. 2004; Heiskanen et al. 1996; Henriksen et al. 1995; Ikeda et al. 1999a; Kumagai et al. 2002).

V důsledku vlivu vyšší teploty na varle dochází k řadě morfologických a funkčních změn nejen v semenotvorném kanálu a v intersticiální tkáni varlete, ale také k systémovým změnám hladin některých hormonů. U bilaterálního kryptorchismu myši stoupá sérová hladina FSH; LH a testosteron (T) v séru se nemění. U unilaterálního kryptorchismu myši dochází také pouze ke zvýšení FSH, jehož hladiny dosahují po 28 dnech stejné úrovně jako u hemikastrovaných jedinců (Mendis-Handagama et al. 1990). U potkanů (unilaterální kryptorchismus – 28 dnů) dochází ke zvýšení sérových hladin FSH a (na rozdíl od myši) k mírnému poklesu hladiny T v séru a v homogenátu kryptorchického varlete (Aumuller et al. 1980). Dochází také ke změnám v expresi receptorů – zvýšení mRNA receptorů pro LH i FSH v kryptorchickém varletu (Iizuka et al. 1996) a k poklesu androgenních receptorů (Winters 1987).

Sertoliho buňky v kryptorchickém varletu jeví známky regrese, ale TJ stále brání průniku lanthanu (marker funkce TJ) do adluminálního prostoru semenotvorného kanálu, ačkoliv je počet linií TJ v kryptorchickém varletu snížen. Dochází také

k vymizení endoplazmatického retikula a aktinových vláken v okolí membrány – poškození AJ (Aumuller et al. 1980). Kryptorchismus (7 dní) vede k poškození struktury aktinových vláken nejen v Sertoliho buňkách ale i v peritubulárních myoidních buňkách (Maekawa et al. 1995). Dochází také ke změnám v uspořádání intermediárních filament v Sertoliho buňkách – vimentin (Wang et al. 2002b).

Expresí nebo funkce mnoha signálních, transportních, receptorových a dalších proteinů, enzymů apod. se v kryptorchickém varletí zvyšuje i snižuje. Snížená koncentrace ABP (androgen binding protein) v abdominálním nadvarletí ukazuje na poškození Sertoliho buněk (Aumuller et al. 1980). Mění se aktivity enzymů podílejících se na syntéze DNA – klesá aktivita DNA polymerázy β a γ (nemění se aktivita DNA polymerázy α a topoizomerázy I) (Fujisawa et al. 1988), poly(ADPR)polymerázy (PARP) – enzym podílející se na reparaci poškozené DNA (Tramontano et al. 2000). Aktivita cholesterylester hydrolázy klesá již 24 hodin po navození kryptorchismu (Hoffmann et al. 1989), dochází k poklesu exprese fosfodiesterázy 4 (Farooqui et al. 2001), k poklesu exprese glukózového transportéru GLUT-3 se současným zvýšením GLUT-2 (Farooqui et al. 1997) a k poklesu HSP-70 (heat shock protein) (Guo et al. 2001). V kryptorchickém varletí dochází ke zvýšené peroxidaci lipidů (Ahotupa a Huhtaniemi 1992), k produkci volných kyslíkových radikálů (Kumagai et al. 2002), v degenerujících zárodečných buňkách se objevuje ve zvýšeném množství eNOS – zdroj kyslíkových radikálů (Zini et al. 1999).

Otázka ovlivnění spermatogeneze v kontralaterálním skrotálním varletí kryptorchismem je stále diskutována a dosud nebyl nalezen jednoznačný závěr (Lee a Coughlin 2001; Wang et al. 1998; Wang et al. 2002b; Watts et al. 2000).

BUSULFAN

Busulfan je bifunkční alkylační látka, chemickou strukturou alkylsulfon - 1,4 - butandiol dimethansulfonát (Hartl et al., 1992).

Jde o chemicky labilní sloučeninu, která přenáší alkylové radikály na tělu vlastní struktury (navázáním na nukleové kyseliny dochází k interferenci s replikací DNA i s transkripcí RNA). Následkem je inhibice procesů buněčného dělení, což je terapeuticky požadovaný účinek na maligní buňky. Z hlediska buněčného cyklu má výjimečné postavení svým účinkem i na buňky klidové. Tím je vysvětlena jeho vysoká hematologická toxicita, ničí pluripotentní hemopoetické buňky, které jsou z 90%

v klidové fázi. Rezistence nádorových buněk závisí na reparační kapacitě poškození nukleových kyselin a na inaktivaci alkylačních látek konjugací s glutathionem (Marek a kol. 1998).

Busulfan není ve vodě dobře rozpustný, proto se musí nejprve rozpustit v nepolárním prostředí – ve směsi dimethylacetamidu a polyethylenglykolu (Bhagwatwar et al. 1996) nebo v dimethylsulfoxidu (Schuler et al. 2001) a poté aplikovat ve vodném roztoku. Zkoumána je možnost přípravy busulfanu ve formě liposomálních „kapslí“ v intravenózní formě (Hassan et al. 2001).

Po perorálním podání dochází v trávicím ústrojí rychle k hydrolyze, k resorpci a k okamžitému vytvoření karboniového iontu působícího alkylací. Po i.v. aplikaci byly nejvyšší koncentrace dosaženy v játrech, mozku, plicích a ledvinách a to 15 minut po podání (20% z dávky se dostává do mozku) (Hassan et al. 1992). Busulfan ve vysokých dávkách prochází placentou. Uvádí se, že ireverzibilní vazba busulfanu na erythrocyty a plazmatické proteiny dosahuje hodnot 47%, resp. 32% (AISLP 2004). Podléhá rozsáhlému metabolismu v játrech a vylučuje se močí v podobě neúčinných metabolitů. Průměrný poločas vylučování je 2,9 - 3,1 hodiny, u malých dětí do 5 let věku je nižší - 2 hodiny (Hassan et al. 1991).

Ve farmakokinetických vlastnostech busulfanu je možné pozorovat velké inter- i intraindividuální rozdíly. Podobně je můžeme sledovat u pacientů s přidruženými nemocemi, u jednotlivých interakcí mezi busulfanem a dalšími léky (např. fenytoin zrychluje, itraconazol a metoklopramid zpomalují jeho farmakokinetiku) a také v závislosti na cirkadiálním rytmu (Hassan 1999; Hassan et al. 1993; Hassan et al. 2001).

Indikací busulfanu jsou chronická myeloidní leukémie (byl dlouho lékem volby), polycythemia vera a primární trombocytóza. Při indukční léčbě se používá dávka 4-8 mg denně. K udržovací léčbě stačí 2 mg denně nebo obden. Při léčbě je nutné bedlivé sledování krevního obrazu. Dnes je v těchto indikacích používán omezeně.

Další oblastí, kde se busulfan (v kombinaci s cyklofosfamidem) používá, je vysokodávková chemoterapie před transplantací kostní dřeně (Andersson et al. 2002; Hassan et al. 2002; Schuler et al. 2001). Podávají se dávky 0,8 mg / kg busulfanu ve dvouhodinové infuzi každých 6 hodin po 4 po sobě následující dny. Celkem tedy 16 dávek. Po busulfanu následuje podání cyklofosfamidu. Vstřebávání busulfanu z gastrointestinálního traktu a jeho metabolické přeměny v játrech podléhají natolik výrazné variabilitě, že se u jednotlivých pacientů mohou plazmatické hladiny busulfanu lišit až desetinásobně po aplikaci téže dávky (Klener 1996).

Busulfan je považován za teratogenní, mutagenní a kancerogenní látku, což je hlavní důvod odklonu od jeho používání při léčbě chronické myeloidní leukémie. U lidí bylo popsáno několik případů vrozených abnormalit, které však nemusely nutně vzniknout v důsledku užití busulfanu (AISLP 2004).

Reprotoxicita busulfanu se projevuje o obou pohlaví. U žen před menopauzou se běžně vyskytuje suprese funkce vaječníků a amenorea se symptomy menopauzy. Busulfan může způsobit opožděný nástup puberty či sníženou funkci gonád. U mužů byla popsána sterilita, azoospermie a testikulární atrofie (AISLP 2004).

NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY BUSULFANU

1) akutní nežádoucí účinky

gastrointestinální:	mukozitida, nauzea, zvracení, průjem
jaterní:	zvýšený bilirubin, venookluzivní nemoc jater
neurologické:	celkové i lokální křeče
plicní:	intersticiální plicní fibróza
urogenitální:	hemoragická cystitida

2) pozdní nežádoucí účinky

infertilita a poškození zárodečného epitelu u mužů
poškození růstu
šedý zákal
alopecie, hyperpigmentace kůže

U experimentálních zvířat brání busulfan spermatogenezi. Busulfan působí toxicky především na spermatogonie - více na kmenové než na diferencované spermatogonie. I když letální mutace ani chromosomální aberace nebyly v zachovalých kmenových spermatogoniích pozorovány, ještě po 44 týdnech od aplikace busulfanu se objevují abnormality v morfologii hlav spermií. V dávce nad 30 mg/kg vede k azoospermii a sterilitě myši (Bucci a Meistrich 1987). Dávkově závislý vliv busulfanu na spermatogenezi byl pozorován u myši. Po 1 dávce 15, 30 nebo 45 mg/kg byla spermatogeneze pozorována po 30 dnech v 63%, 8%, resp. 0,8% a po 70 dnech v 98%, 47%, resp. 3% semenotvorných kanálků (Kanatsu-Shinohara et al. 2003).

Haddad a kol. (1997) zkoumali vliv busulfanu na zárodečnou tkáň varlat u potkanů kmene Wistar (10 mg/kg v jedné intraperitoneální dávce) v časových intervalech 8, 10, 11, 17 týdnů od aplikace. Maximum poškození zárodečného epitelu pozorovali v 8. týdnu. V 55% semenotvorných kanálků obsahoval zárodečný epitel

zárodečné buňky pouze po stádium primárních spermatocytů. Ve 23% kanálků byly pouze Sertoliho buňky a spermatogonie. Od 10. týdne autoři zaznamenali progresivní změny v zárodečném epitelu, avšak spermatogeneze se ani do intervalu 17. týdnů nenavrátila na úroveň kontrolní skupiny (Haddad et al. 1997).

Aich a Manna (2001) zkoumali na samcích potkana (Indian house rat - *Rattus Rattus*) také vliv jedné dávky busulfanu (10 mg/kg), ovšem po perorální aplikaci, a sice v časových intervalech 10, 40, 70 a 100 dní od aplikace. V intervalu 40 dní obsahovaly semenotvorné kanálky pouze spermatogonie, Sertoliho buňky a zygotenní spermatocyty. Po 70 dnech pozorovali také pouze spermatogonie a zygotenní spermatocyty bez přítomnosti pachytenních spermatocytů, spermatid a spermatozoí. V posledním časovém intervalu, 100 dní od aplikace cytostatika, byla spermatogeneze obnovena ve většině semenotvorných kanálků (Aich a Manna 2001).

Jiang (1998) zkoumal vliv busulfanu na spermatogenezi u potkanů kmene Long Evans, kterým byly podány 2 dávky busulfanu (10 mg/kg) v rozmezí 21 dnů intraperitoneálně. 20. den po druhé dávce varlata ztratila většinu zárodečných buněk a zachováno zůstalo pouze několik jednotlivých spermatogonií v bazálním kompartmentu semenotvorného kanálu. 48. den pozoroval symetricky i asymetricky se dělicí spermatogonie A a diferencující se spermatogonie B. V některých kanálcích se objevily již preleptotenní a pachytenní spermatocyty, Sertoliho buňky byly stále hodně vakuolizovány. 74. den byla obnovena spermatogeneze ve většině kanálků. Byly přítomny diferencující se spermatidy, při bazální membráně více spermatogonií typu B, Sertoliho buňky obsahovaly mnohem méně vakuol. Pokud zvíře po aplikaci busulfanu zůstalo sterilní, tak v tomto intervalu bylo nalezeno v semenotvorném kanálku pouze málo spermatogonií a spermatocytů mezi masivně vakuolizovanými Sertoliho buňkami. 96. den 80% kanálků nabylo znovu normální funkce, ve zbytku zůstaly pouze Sertoliho buňky (Jiang 1998).

Busulfan se experimentálně používá také při transplantacích kmenových zárodečných buněk (kmenové spermatogonie) (Ogawa et al., 1999). Ve varletí zvířete, které slouží jako příjemce zárodečných buněk, je nutné před transplantací zničit všechny zárodečné buňky. K tomuto účelu se dospělým zvířatům podává busulfan (u potkana v dávce 20-45 mg/kg) (Moisan et al. 2003). Druhou možností je podávání busulfanu březím samicím (10,5.- 12,5. den březosti, 15 mg/kg), a tím zničení zárodečných buněk

u samčích plodů již *in utero*. Transplantace se poté provádí mezi 5. až 12. dnem po narození (Brinster et al. 2003; Moisan et al. 2003).

Pokud busulfan eliminuje zárodečné buňky jen částečně, zbývající složky kmenových buněk přeživší léčbu mohou kompetovat s transplantovanými buňkami donora. Z tohoto důvodu Vecino et al. (2001) testovali spolu s busulfanem ještě jiné látky a došli k závěru, že kombinací estradiolu, busulfanu a leuprolidu (agonista choriogonadotropin - uvolňujícího hormonu) dojde ke zničení endogenních zárodečných buněk beze změny Sertoliho buněk a zůstane zachováno optimální prostředí potřebné k rozvoji transplantovaných buněk (Vecino et al., 2001).

MATERIÁL A METODIKA

Experimentální část této práce jsme prováděli na dospělých samcích laboratorního potkana kmene Wistar (chovná stanice Velaz s. r. o., Únětice). V průběhu experimentu byla zvířata chována za standardních podmínek ve viváriu FaF UK s volným přístupem k vodě a byla krmena standardní potravou (Velas a.s., Lysá nad Labem). V pravidelných týdenních intervalech jsme kontrolovali jejich hmotnost (na laboratorních vahách Transporta), zdravotní stav a chování. Chov a zacházení s pokusnými zvířaty byly v souladu s pravidly schválenými Odbornou komisí pro ochranu zvířat proti týrání FaF UK.

OPERACÍ NAVOZENÝ KRYPTORCHISMUS

Při experimentech byla používána zvířata vážící v době operace 200-250g. U zvířat jsme provedli chirurgické navození unilaterálního kryptorchismu na dobu 1 hodiny, 2 hodin, 6 hodin, 12 hodin, 24 hodin, 48 hodin, 3 dnů, 5 dnů, 11 dnů, 22 dnů, 44 dnů, 85 dnů a 121 dnů. V každé skupině (s výjimkou krátkých intervalů – 1, 2, 6 a 12 hodin) jsme operovali minimálně 5 zvířat, 1 další zvíře v každé skupině bylo operováno pouze provedením řezu do kůže a svaloviny a jejich opětovným sešitím bez přemístění varlete do břišní dutiny - operovaná kontrola (sham-operated jedinci - SO). Skupina dalších 5 zvířat sloužila jako kontrolní skupina. Za kryptorchické zvíře jsme považovali pouze takové zvíře, u něhož nedošlo po operaci k sestupu varlete zpět do šourku.

Všechna zvířata jsme operovali v celkové anestézii za podmínek relativní asepsy. K anestézii jsme používali pentobarbital (30-50 mg na zvíře) intraperitoneálně. Řez o velikosti asi 2 cm jsme vedli kůží a svalovinou na břichu. Lehkým tlakem na skrotum jsme vytlačili levé varle a nadvarle do otevřené břišní dutiny. Po přestřížení m. cremaster a gubernakula jsme varle vyjmuli z břišní dutiny a změřili. Poté jsme jej opatrně uložili zpět do břišní dutiny a za tukové těleso přišli ke svalovině stěny břišní (pro zabránění sestupu varlete zpět do inguinálního kanálu a skrota). Sešitím svaloviny a kůže jsme operační ránu uzavřeli. Po operaci jsme zvířata umístili zpět do klecí. SO zvířata jsme operovali za použití stejných materiálů i technik jako zvířata pokusná.

APLIKACE BUSULFANU

Pro experiment jsme používali dospělé samce potkana kmene Wistar (chovná stanice Velaz, s. r. o., Únětice) o hmotnosti 200 - 230 g. V experimentu bylo použito celkem 65 laboratorních potkanů. 15 potkanům jsme aplikovali 1 dávku busulfanu 40 mg/kg hmotnosti zvířete, 15 potkanům 1 dávku busulfanu 10 mg/kg hmotnosti a 30 potkanům byly intraperitoneálně aplikovány dvě dávky busulfanu 10 mg/kg hmotnosti v odstupu 21 dnů (1. a 21. den) (Jiang 1998). Busulfan (Acros, Giel, Belgie) jsme pro aplikaci rozpouštěli v dimethylsulfoxidu (DMSO) a aplikovali jako 2% roztok. Zbylým 5 potkanům byl aplikován pouze DMSO 1. a 21. den (kontrolní skupina) – tato zvířata jsme usmrtili 3 týdny po aplikaci druhé dávky DMSO.

Potkany jsme rozdělili do experimentálních skupin po 5 jedincích dle následujícího schématu:

Týden odběru po dávce	1	3	4	5	6	7	9	13
40 mg/kg	x	x			x			
10 mg/kg	x	x			x			
Týden odběru po 1. dávce	1	3	4	5	6	7	9	13
10+10 mg/kg			x	x	x	x	x	x
Kontrola					x			

HISTOLOGICKÉ ZPRACOVÁNÍ ORGÁNŮ

ODBĚR VZORKŮ

Na konci daného intervalu jsme provedli euthanasií zvířat předávkováním celkového inhalačního anestetika (Aether pro narcosi, Synthesia, Pardubice-Semtín) s následným přerušením míchy. Po usmrcení potkanů jsme ihned provedli otevření dutiny břišní a vyjmuli varlata a nadvarlata. Po jejich očištění jsme zaznamenali délku varlat s přesností na milimetry a hmotnost (váhy Scaltec, Sartorius AG, Goettingen, Německo) s přesností na setiny gramu. Varlata i nadvarlata jsme ihned dále histologicky zpracovávali.

Každý odebraný orgán jsme rozdělili na několik částí z důvodu různých vyšetření tkání. Pro histologické i imunohistochemické hodnocení jsme orgány fixovali v Bouinově roztoku nebo ve 4% paraformaldehydu (4°C) po dobu 48 - 72 hodin; poté

odvodnili acetonem, projasnili xylenem a po prosycení parafínem jsme vzorky zalévali do bločků. Histologické řezy (tloušťka 5-6 μm) jsme krájeli na diskovém mikrotomu Leica DSC1 (Leica Microsystems GmbH, Nussloch, Německo).

FIXACE, ZALITÍ DO PARAFÍNU

<u>4% paraformaldehyd</u>	48 - 72 hodin	<u>Bouinův roztok</u>	48 - 72 hodin
Fyziologický roztok	1 hodina	Ethanol 80%	1 hodina
	3x Aceton		během 16 hodin
	Xylen		2x15 minut
	Parafín (56°C)		2x2 hodiny
	Zalítí do parafínu		

4% paraformaldehyd

Roztok se připraví rozpuštěním 4 g paraformaldehydu v 96 ml PBS při zahřívání na maximálně 60°C, poté se nechá zchladnout a zfiltruje se. Uchovává se v lednici.

Bouinův fixační roztok

Nasyčený roztok kyseliny pikrové 300 ml

Formol neutrální 100 ml

Před použitím se přidají 3 ml kyseliny octové ledové na 100 ml roztoku.

Formol neutrální

10 % formol (odpovídá 4 % formaldehydu)

Na dno nádoby se nasype 2 cm vysoká vrstva práškového uhličitanu vápenatého, který neutralizuje vznikající kyselinu mravenčí.

Zalévací parafín

Tuhý parafín zkvalitněný 3-5 % bílého včelího vosku.

BARVENÍ HEMATOXYLIN – EOSIN

Xylen	3 x 5 minut
Ethanol 96%	5 minut
Ethanol 70%	5 minut
Destilovaná voda	5 minut
Hematoxylin	10 sekund nebo 5 minut
Pramennitá voda	5 minut
Destilovaná voda	3 minuty
Eosin	5 sekund nebo 1 minuta
Destilovaná voda	opláchnutí
Ethanol 96%	2 x opláchnutí
Ethanol : Xylen (2:1)	3 minuty
Xylen : Ethanol (2:1)	3 minuty
Xylen	3 x 3 minuty
Zamontování do kanadského balzámu nebo Eukitu.	

V průběhu experimentu se nám osvědčilo zkrácení barvicích časů hematoxylinem i eosinem na několik sekund a naředění obou barvicích roztoků 1 : 5 destilovanou vodou

ROZTOKY A CHEMIKÁLIE**Hematoxylin Hill**

Hematoxylin	4,0 g
Jodičnan sodný	0,4 g
Síran hlinitý	35,2 g
Destilovaná voda	710,0 ml
Ethylenglykol	250,0 ml
Kyselina octová (ledová)	40,0 ml

Roztok se připraví za občasného míchání rozpuštěním hematoxylinu, jodičnanu sodného a síranu hlinitého v destilované vodě, přilije se ethylenglykol. Nakonec se přidá kyselina octová. Plní se do lahví, nechá se uzrát a před použitím se zfiltruje.

Roztok eosinu

1% roztok eosinu v destilované vodě

Roztok se připraví rozpuštěním eosinu v destilované vodě za občasného míchání. Poté se zfiltruje do lahví.

ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ PRO POLOSILNÉ ŘEZY

U vzorků jsme prováděli dva typy fixace:

1) Fixace v OsO₄

OsO₄ 2 hod (lednice)
 proplach v kakodylátovém pufru 3 x 15 min (lednice)
 4. pufr v lednici do doby, než se zpracují další vzorky k odvodňování

2) Fixace v glutaraldehydu a postfixace v OsO₄

fixace v glutaraldehydu do rána 2. dne (16-20 hodin)
 proplach v Millonigově pufru 4 x 15 min (lednice)
 fixace v OsO₄ 2 hod (lednice)
 proplach v kakodylátovém pufru 3 x 15 min (lednice)
 4. pufr v lednici do doby, než se zpracují další vzorky k odvodňování

2% OsO₄

4% OsO₄ (v orig. ampulích) 1,5 ml
 Kakodylátový pufr 1,5 ml

Kakodylátový pufr (200 mmol / l) pH = 6,9-7,1 (zásobní roztok)

Kakodylan sodný (85,6 g / l) 50,0 ml
 HCl (0,2 mmol / l) 5,0 ml
 Redestilovaná voda ad 100,0 ml

Výsledný roztok pH = 7,3; 100 mmol / l

Kakodylátový pufr (200 mmol / l) 50,0 ml
 Redestilovaná voda 50,0 ml

3 % glutaraldehyd

8% glutaraldehyd 1,5 ml
 Millonigův pufr 2,5 ml

Millonigův pufr

Roztok A - pH = 7,336

NaH₂PO₄ · 2H₂O (22,6 g / l) 415,0 ml
 NaOH (25,2 g / l) 85,0 ml
 Redestilovaná voda 70,0 ml

Roztok B

glukóza 5,4 g
 redestilovaná voda ad 100,0 ml

Výsledný roztok (pH = 7,68) Roztok A - 90 ml + Roztok B - 10 ml

ODVODNĚNÍ

25 % ethanol	15 min (lednice)
50 % ethanol	15 min (lednice)
75 % ethanol + 1% UA	15 min (lednice)
96 % ethanol + 1 % UA	15 min
100 % ethanol + 1 % UA	15 min
100 % ethanol	15 min
100 % ethanol	15 min

(UA = uranylacetát)

PROSYCOVÁNÍ

ihned po posledním 100 % ethanolu

prosyovací směs č. 1 1 hod (míchání)

prosyovací směs č. 2 1 hod (míchání)

odsaje se směs č. 2 a do 1/3 lahvičky se naplní čistá směs pryskyřic Epon-Durkupan, lahvičky se nechají bez špuntíků v boxu do dalšího dne, kdy se zalévají

PŘÍPRAVA EPON – DURKUPANU, PROSYCOVACÍCH SMĚSÍ

Děje se současně s odvodňováním, v boxu při vlhkosti do 40 %, míchání v kádince vždy po 15 min s přidavkem další součásti

na 30 vzorků 80,0 ml (pros. směsi – 30 ml, prosycování – 10 ml, zalití – 36 ml)

Epon	20,0 ml
Durkupan modrý	44,0 ml
Durkupan červený	12,0 ml
Durkupan žlutý	1,6 ml (směs ztmavne)
Durkupan zelený	2,4 ml

Prosyovací směsi:

č. 1 20 ml aceton 100 % + 10 ml Epon-Durkupan

č. 2 10 ml aceton 100 % + 20 ml Epon –Durkupan

ihned po rozmíchání se nabere do uzavřených stříkaček (aceton se odpařuje)

KRÁJENÍ POLOSILNÝCH ŘEZŮ

Polosilné řezy jsme krájeli na ultramikrotomu - ULTRATOME[®], V2088, LKB Bromme.

TOLUIDINOVÁ MODŘ S PYRONINEM**Postup barvení polosilných řezů**

Podložní sklíčko jsme odmastili acetonem a polosilný řez přenesli do kapky redestilované vody na podložním sklíčku. Voda se nad kahanem odpaří (řezy se napnou a přischnou). Na řezy jsme potom kápnuli barvicí roztok, žihali nad plamenem 10 sekund a opláchli redestilovanou vodou. Řez na klíčku jsme krátce opláchli 50 % ethanolem (dokud se tvoří obláčky barvy) a poté redestilovanou vodou. Vysušili jsme sklíčko nad plamenem a montovali do Entalanu nebo pryskyřice.

Roztoky:**1 % toluidinová modř**

toluidinová modř	1,0 g
tetraboritan sodný	1,0 g
redestilovaná voda	ad 100,0 ml

1 % pyronin

pyronin	0,5 g
tetraboritan sodný	0,5 g
redestilovaná voda	ad 50,0 ml

Barvicí roztok:

1 % toluidinová modř	40,0 ml
1 % pyronin	10,0 ml
redestilovaná voda	30,0 ml

Barvicí roztok postupně zraje, skladuje se při 5°C. Před každým použitím je nutné ho zfiltrvat.

IMUNOHISTOCHEMIE

Základním cílem imunohistochemických a imunocytochemických metod je detekce specifických antigenních determinant (molekul či jejich částí) s využitím imunologické vazby, tedy na principu vazby antigen - protilátka. Tuto vazbu lze definovat jako vztah specifické protilátky, jež je zpravidla volná, ke tkáňovému antigenu, který je zpravidla pevně fixován na určitou strukturu v tkáni. Při experimentu jsme využívali metody tzv. nepřímé imunohistochemie. Na tkáňové řezy se nejprve aplikuje primární protilátka, která specificky rozeznává prokazovaný antigen. Sekundární protilátka, značená fluorochromem nebo enzymem (v našich podmínkách), se imunologickou vazbou váže na protilátku primární. Specifické barvení je zviditelněno po přidání enzym-specifického substrátu.

Pracovní postup

Xylen	3 x 5 min
Ethanol 96%	5 min
Ethanol 70%	5 min
Destilovaná voda	5 min
3% H ₂ O ₂ v PBS (nebo 3% H ₂ O ₂ v 50% methanolu)	10-15 min
Destilovaná voda	2 x 5 min
Odkrytí antigenu	10-20 minut (viz níže)
PBS	2 x 5 min
10% kozí sérum v PBS	nebo 10% sušené mléko (hovězí albumin) v PBS
	30 min
Primární protilátka	inkubace přes noc při 4°C
PBS	2 x 5 min
Sekundární protilátka	30 min
PBS	2 x 5 min
DAB	5 sekund – 5 minut
Destilovaná voda	5 min
Hematoxylin	1-2 s
Pramenitá voda	1-2 min
Destilovaná voda	opláchnutí
Aceton	opláchnutí
Aceton- Xylen (1: 1)	3 min
Aceton- Xylen (1: 10)	3 min
Xylen	3 x 3 min

PRIMÁRNÍ PROTILÁTKY (ředění v 5% roztoku BSA v PBS)

Antigen	Typ protilátky	Klon	Ředění	Výrobce	Odkrytí antigenu
Connexin 43	Rb-p		1:500	Zymed	Citr. Pufu – pH6
PCNA	Mo-m	PC10	1:500	LabVision	Citr. Pufu – pH6
Tubulin $\alpha+\beta$	Mo-m	DM1A+DM1B	1:300	LabVision	Citr. Pufu – pH6
Prohibitin	Mo-m	II-14-10	1:75	LabVision	Citr. pufu – pH6
Aktin	Rb-p		1:200	Sigma	Citr. pufu – pH6
Aktin hl. sval	Mo-m	HHF-35	1:40	Serotec	Citr. pufu – pH6
Occludin	Rb-p		1:200	Zymed	protK-1mg/ml
P-cadherin	Rb-p		1:150	SantaCruz	Citr. pufu – pH6
E-cadherin	Mo-m	G-10	1:30	SantaCruz	Citr. pufu – pH6
α -catenin	Mo-m	α CAT-7A4	1:100	Zymed	
β -catenin	Rb-p		1:200	LabVision	Citr. pufu – pH6
Claudin 11/OSP	Rb-p		1:100	Abcam	Citr. pufu – pH6
Ki-67	Rb-p		1:50	LabVision	Citr. pufu – pH6
Ki-67	Mo-m	MIB-5	1:50	DAKO	Citr. pufu – pH6

Rb-p : Králičí polyklonální
protilátka

Mo-m : Myší monoklonální
protilátka

Zymed - Zymed Laboratories Inc., San Francisco, USA

LabVision - LabVision-NeoMarkers, Fremont, USA

SantaCruz - SantaCruz Biotechnology, USA

Abcam - Abcam, Cambridge, Velká Británie

DAKO – DAKOCytomation, Carpinteria, USA

Sigma - Sigma -Aldrich Co., Steinheim, Německo

Serotec – Serotec, Oxford, Velká Británie

Odkrytí antigenu

Imunohistochemické vyšetření jsme prováděli na parafinových řezech, kdy je nutné provést před inkubací řezů s primární protilátkou tzv. odkrytí antigenu. Zpřístupnění antigenu lze dosáhnout

- 1) povařením v mikrovlnné troubě v 0,01 mmol / l citrátovém pufru pH = 6
- 2) inkubací s proteázou (Proteináza K – 20 μ g/ml – 1 mg/ ml).

Séra

Potkaní sérum - Rat serum (Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Německo)

Kozí sérum – Goat serum (Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Německo)

Hovězí sérový albumin - BSA – Bovine serum albumin (Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Německo)

Proteináza K

20 µg / ml – 1 mg / ml PBS dle protilátky;
 Proteinase K (Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Německo)

Citrátový pufr pH = 6,0

Kyselina citronová - monohydrát	0,99 g
Citronan sodný	6,43 g
Destilovaná voda	ad 500,0 ml

Sekundární protilátky

Goat anti-rabbit protilátka + 2% potkaní sérum
 Goat anti-mouse protilátka + 2% potkaní sérum
 Dako EnVision™ – ready to use (DAKOCytomation, Carpenteria, USA)

DAB (diaminobenzidin - substrát pro peroxidázu)

DAB v poměru 20 µl / ml pufru (pufr je součástí kitu)
 Dako Liquid – DAB+ substrate-chromogen system (DAKOCytomation, Carpenteria, USA)

PBS (fosforečnanový pufr)

Chlorid sodný	80,0 g
Chlorid draselný	2,0 g
Hydrogenfosforečnan draselný	2,0 g
Dihydrogenfosforečnan sodný	11,5 g
Destilovaná voda	ad 1000,0 ml pH = 6,8

Tento roztok se dále ředí 1 : 10 redestilovanou vodou – pH výsledného roztoku je $7,43 \pm 0,01$

TUNEL

K provedení metody TUNEL (Gavrieli et al. 1992) (TdT-mediated dUTP Nick End Labelling) jsme použili **In Situ Cell Death Detection Kit (Alkaline Phosphatase)** - Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo.

Součásti kitu

- 1) roztok s TdT – terminální deoxynukleotidyltransferáza (EC 2.7.7.31)
- 2) roztok nukleotidů značených fluoresceinem
- 3) anti-fluorescein protilátka značená alkalickou fosfatázou (Converter AP)

Postup

- 1) deparafinizace jako u Hematoxylin & eosin barvení po destilovanou vodu (str.48)
- 2) PBS 5 min
- 3) 0,1% Triton-X v PBS 10 min
- 4) Proteináza-K (20 µg/ml v PBS) 15 min
- 5) PBS 3 x 5 min
- 6) 5% sušené mléko v PBS 30 min
- 7) PBS 2x5 min
- 8) TUNEL reakční směs 60 min (37°C)
- 9) PBS 3x5 min
- 10) Converter AP (40µl) 30 min (37°C)
- 11) PBS 3x5 min
- 12) ALP substrát pod kontrolou v mikroskopu
- 13) PBS 2 x 5 min
- 14) destilovaná voda opláchnutí
- 15) ředěný hematoxylin max. 3 sekundy
- 16) pramenitá voda → destilovaná voda → okyselení 1% kys. Octovou pouze krátké opláchnutí
- 17) destilovaná voda
- 17) zamontování do glycerol – želatiny nebo Eukitu

TUNEL reakční směs

roztok TdT - 4µl + roztok nukleotidů - 36µl

ALP substrát – substrát pro alkalickou fosfatázu

TRIS/HCl pufr 1,0 ml

Roztok A 10,0 µl

Roztok B 10,0 µl

0,1M Tris/HCl pufr pH 9

TRIS 0,605g

HCl 0,018g

Destilovaná voda 100ml

Roztok A: 20 mg Naftol-AS-fosfát v 1 ml dimethylformamidu

Roztok B: 80 mg Fast Red v 2 ml TRIS/HCl pufru

CHEMIKÁLIE

aceton (Lachema Brno)
busulfan (Acros, Giel, Belgie)
citronan sodný (RNDr. Jan Kulich Hradec Králové/ Říčany)
dihydrogenfosforečnan sodný (Lachema Brno)
dimethylformamid (Lachema Brno)
Durkupan[®] (Fluka - Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Německo)
eosin (Lachema Brno – 818199)
Epon[®] (Fluka - Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Německo)
ethanol (Lachema Brno)
ethylenglykol (Lachema Brno)
Eukit[®] (Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Německo)
Fast Red (Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Německo)
formaldehyd (Lachema Brno)
glukóza (TAMDA Olomouc)
glutaraldehyd (SPI-Chem, West Chester, USA)
hematoxylin (The Coleman & Bell Co. – 12JS3)
hydrogenfosforečnan draselný (Lachema Brno)
hydroxid sodný (RNDr. Jan Kulich, Hradec Králové/Říčany)
chlorid draselný (Lachema Brno)
chlorid sodný (Lachema Brno)
jodičnan sodný (Lachema Brno)
kakodylan sodný (Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Německo)
kanadský balzám (Lachema Brno)
kyselina citronová - monohdrát (TAMDA Olomouc)
kyselina chlorovodíková (TAMDA Olomouc)
kyselina octová (Lachema Brno)
kyselina pikrová (Polskie Odczynniki Chemiczne)
methanol (Lachema Brno)
monohdrát kyseliny citronové (RNDr. Jan Kulich Hradec Králové/ Říčany)
naftol-AS-fosfát (Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Německo)
oxid osmičelý (SPI-Chem, West Chester, USA)
parafín (Lachema Brno)
pentobarbital (Léčiva – Zentiva, Praha)
peroxid vodíku 30 % (Chemické závody Sokolov)
pyronin (Lachema Brno)
síran hlinitý (Lachema Brno)

tetraboritan sodný (RNDr. Jan Kulich, Hradec Králové/Říčany)
toluidinová modř (SPI-Chem, West Chester, USA)
TRIS (Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Německo)
Triton-X (Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Německo)
uranyl acetát (Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Německo)
xylen (Lachema Brno)

STATISTICKÉ HODNOCENÍ

Hmotnost varlat během experimentů byla vyjadřována v gramech jako průměrná hmotnost varlat ve skupině \pm standardní chyba průměru (SEM).

Pro zjištění statistické významnosti rozdílů hmotnosti mezi skupinami zvířat byl užit Student-Newman-Keulsův test a za statisticky významný byl považován rozdíl na hladině významnosti $p < 0,05$.

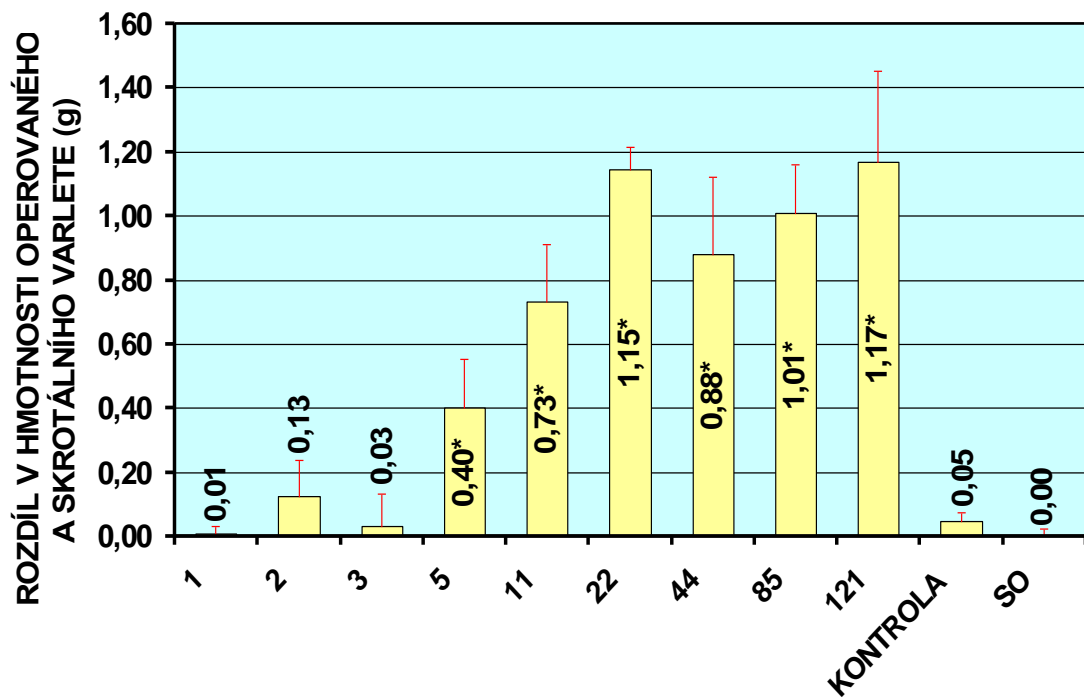
Ke statistickému hodnocení byly užívány programy Microsoft® Excel 2002 a SigmaStat® verze 2.0.

VÝSLEDKY

KRYPTORCHISMUS

HMOTNOST VARLAT

Rozdíly v hmotnostech mezi operovanými a neoperovanými (skrotálními) varlaty jsou uvedeny v **Grafu č. 1**.



GRAF č. 1. Rozdíl v hmotnosti mezi operovanými a neoperovanými (skrotálními) varlaty po různě dlouhém intervalu kryptorchismu

($p > 0,05$ v porovnání s kontrolní skupinou)

Hmotnost varlat kontrolních a SO (operované kontroly – sham-operated) jedinců, stejně jako hmotnost kontralaterálních skrotálních varlat se v průběhu pokusu výrazně nezměnila.

Snížení průměrné hmotnosti kryptorchických varlat u operovaných zvířat jsme zaznamenali již pátý den po operaci. V intervalech 22 až 121 dnů dosahovala hmotnost operovaného varlete cca 40-50% hmotnosti neoperovaného varlete. Rozdíl v hmotnosti operovaného a neoperovaného varlete byl v těchto intervalech kolem 1 gramu. Hmotnost operovaného varlete, současně i rozdíl hmotností obou varlat, se v těchto intervalech s narůstající délkou kryptorchismu již výrazně neměnily.

Poškozená kryptorchická varlata byla také menší než-li varlata skrotální. Nápadným znakem byla změna konzistence abdominálně umístěných varlat – poškozená varlata byla měkká a silně prosáklá tekutinou, která tvořila většinu hmotnosti kryptorchického varlete. Také z tohoto důvodu byla poškozená varlata obtížně fixovatelná pro histologická vyšetření.

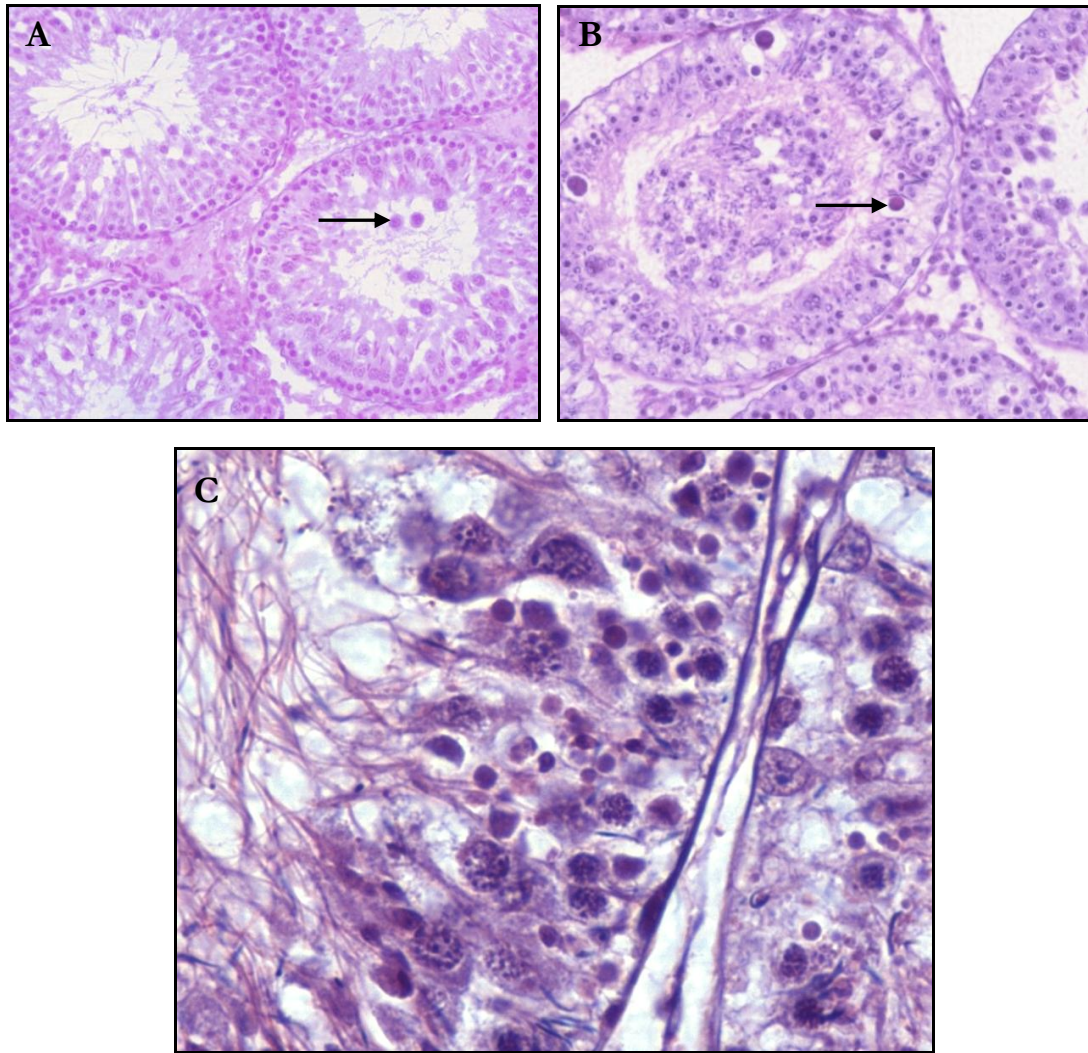
VÝSLEDKY HISTOLOGICKÉHO HODNOCENÍ

KRÁTKÉ INTERVALY DO 24 HODIN (1 HODINA, 2 HODINY, 6 HODIN, 12 HODIN, 24 HODIN)

Nález ve varlatech, které byly voperovány do břišní dutiny na dobu kratší než 24 hodin, byl srovnatelný s nálezem u kontrolních jedinců. Všechny semenotvorné kanálky byly vystlány neporušeným zárodečným epitelem s přítomností všech stádií zárodečných buněk. Dvouřadý epitel kanálků nadvarlat byl neporušený a v lumen kanálků se nacházelo hojné množství spermatozoí stejně jako u kontrolních zvířat.

INTERVALY 2 DNY A 3 DNY KRYPTORCHISMU

V operovaných varlatech zvířat z těchto dvou intervalů jsme zaznamenali první změny v uspořádání komponent zárodečného epitelu (ve větším rozsahu v intervalu 3 dnů). Tyto změny se projevovaly především na úrovni spontánního odlučování různě zralých stádií zárodečných buněk (především spermatid a spermatocytů) do lumen kanálků, kde velmi často tvořily shluky. Jako první se odlučovaly spermatidy (již v intervalu 2 dny – **Obr. 1A - šipka**), poté spermatidy společně se spermatocyty (od 3. dne – **Obr. 1B, 1C, 3A**). V kanálcích, kde nastalo odlučování zárodečných buněk z epitelu, se začaly rovněž objevovat vícejaderné formy buněk. V zárodečném epitelu jsme pozorovali buňky s výrazně eosinofilní cytoplazmou a denzním obsahem jádra (tyto buňky byly sice součástí epitelu, ale byly zřetelně odděleny od ostatních buněk – **Obr. 1B – šipka, detail Obr. 1C**). Dalším nálezem byla tvorba vakuol v Sertoliho buňkách při bazální membráně, která vedla k výrazné desintegraci uspořádání zárodečného epitelu (**Obr. 1B**).



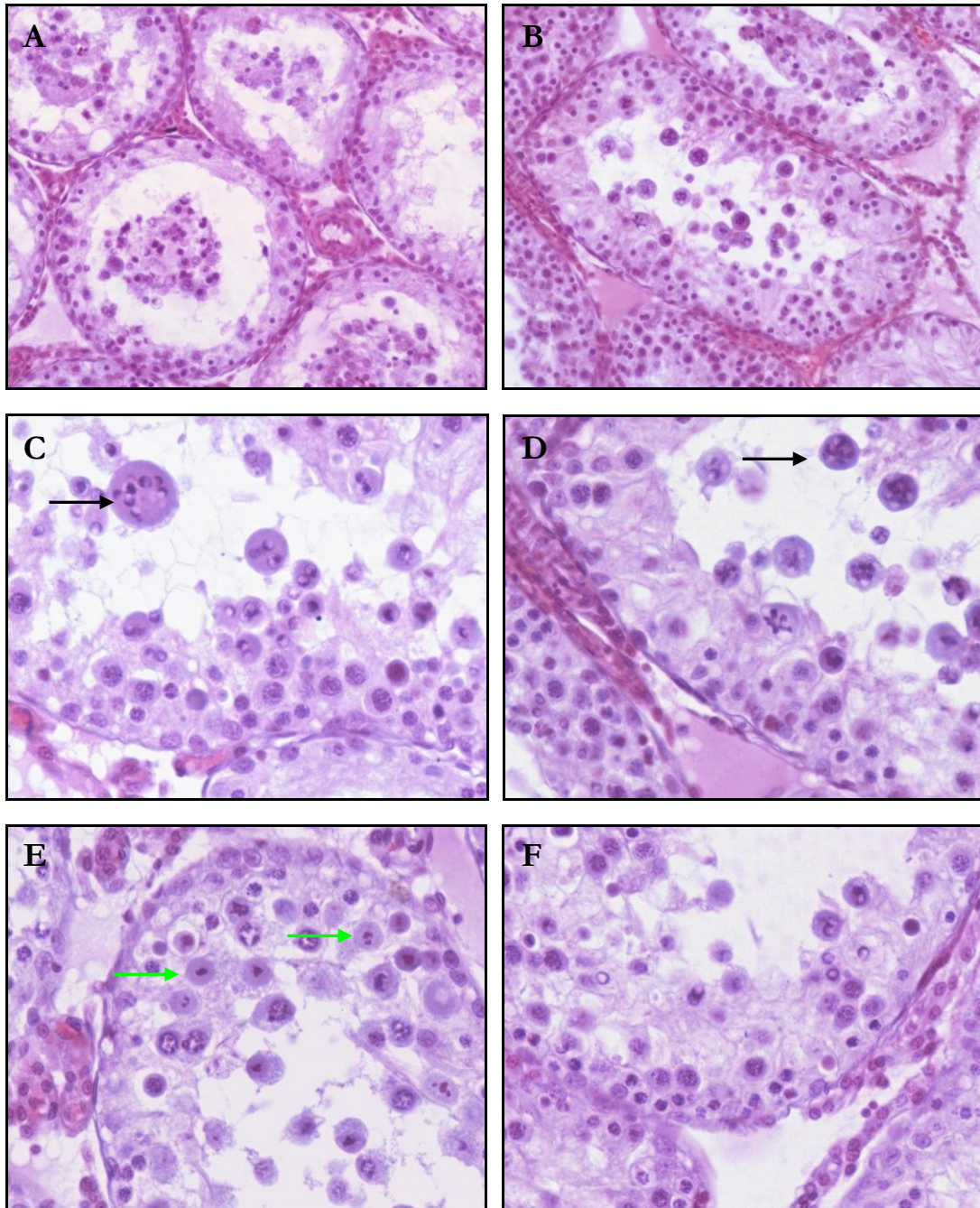
Obrázek č. 1. Tkáň varlete po 2 dnech (A) a 3 dnech (B, C) kryptorchismu.

Hematoxylin & eosin (krátké barvení), originální zvětšení (A, B) - 200×, (C) - 400×

V některých kanálcích došlo k oddělení spermatogonií od bazální membrány. Funkční stav varlete potvrdily i nálezy v kanálcích nadvarlete, kde se vedle zralých, diferencovaných spermií vyskytovaly i nezralé kulatobuněčné formy zárodečných buněk. V ductuli efferentes již u některých zvířat došlo ke zřetelnému poklesu množství zralých spermatozoid.

INTERVAL 5 DNŮ KRYPTORCHISMU

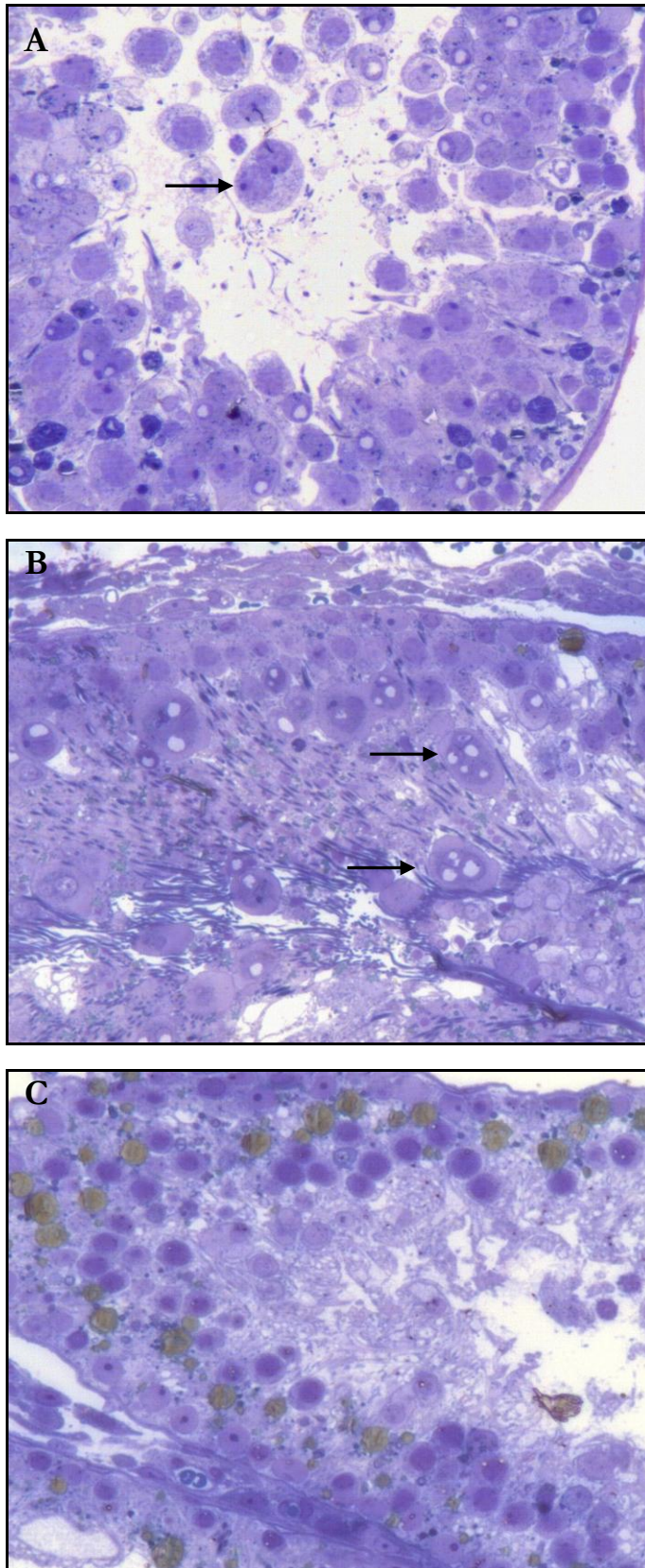
V intervalu 5 dnů kryptorchismu jsme ve varlatech pozorovali semenotvorné kanálky (jak u různých jedinců, tak i v rámci jednoho varlete) ve velmi rozdílném stupni poškození – od nepoškozených kanálků s kompletními stádii spermatogeneze až po ka-



Obrázek č. 2. Tkáň varlete po 5 dnech kryptorchismu.

černé šipky – vícejaderné útvary v semenotvorných kanálcích, zelené šipky - poškozené spermatocyty s pyknotickými jádry. Hematoxylin & eosin (krátké barvení), originální zvětšení (A, B) - 200×, (C, D, E, F) - 400×

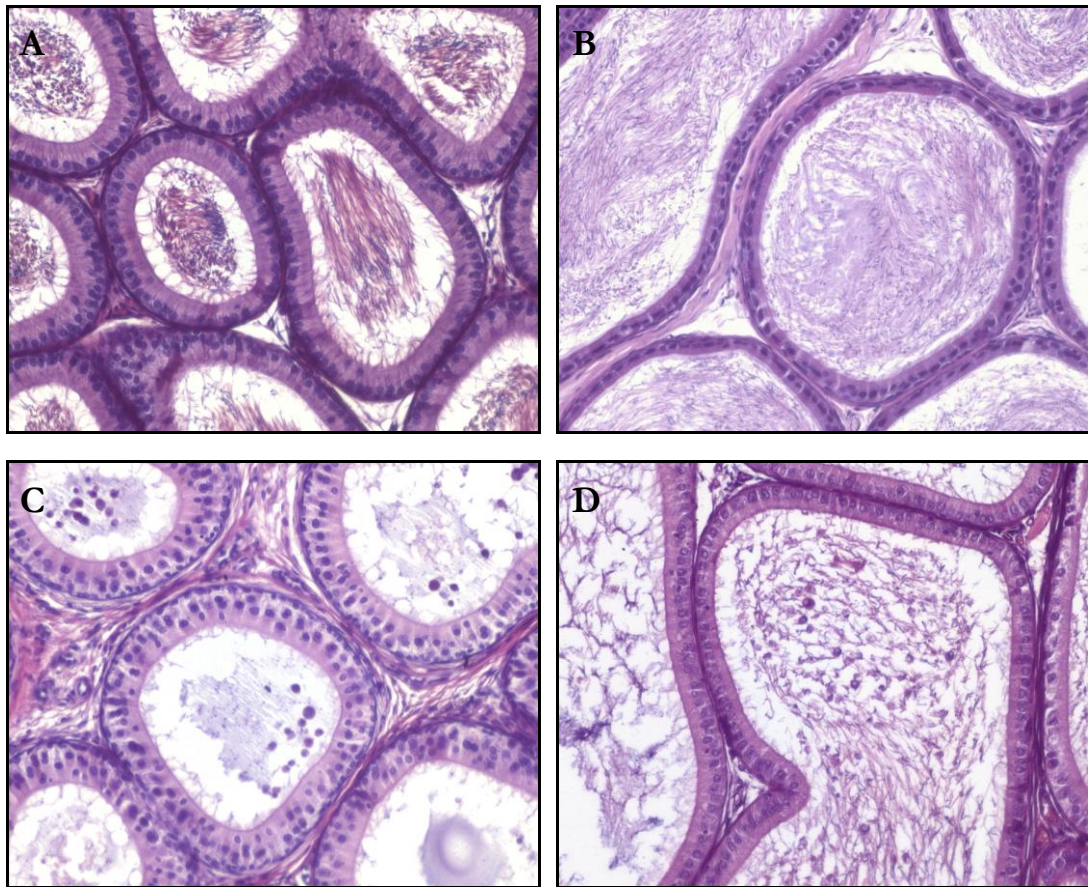
nálky, v nichž zůstaly zachovány pouze Sertoliho buňky se spermatogoniemi a několika spermatocyty v epitelu (**Obr. 2**). Ve většině kanálek jsme zaznamenali progresi patologických změn jako je tvorba vakuol v Sertoliho buňkách (v polosilných řezech jsme pozorovali také výskyt vakuol s pravděpodobně tukovým obsahem – **Obr. 3C**) a odlučování nezralých buněk zárodečné linie, včetně masivního odlučování



Obrázek č. 3. Tkáň varlete po 3 dnech (A) a 5 dnech (B, C) kryptorchismu. Polosilné řezy. Toluidinová modř-pyronin, originální zvětšení 200×

spermatocytů (**Obr. 2B, 3B**). V mnoha kanálcích jsme v tomto intervalu pozorovali splývání zárodečných buněk do vícejaderných útvarů. Neobvyklé nebyly útvary obsahující v rovině řezu 6 - 8 jader. Podle struktury jader v těchto útvarech byla většina těchto útvarů tvořena splynutím kulatých spermatid (**Obr. 2C, 2D, 3A, 3B - šipky**). Některé útvary vznikly sloučením spermatid a spermatocytů, výjimečně jsme pozorovali útvary vzniklé pouze ze spermatocytů. Na obrázcích **2E** a **2F** je demonstrováno odlučování jednotlivých typů zárodečných buněk z epitelu jednotlivě bez spojování do větších útvarů. Zřetelná jsou pyknotická jádra poškozených spermatocytů (**Obr. 2E - zelená šipka**). V některých kanálcích nabylo poškození zárodečného epitelu takových rozměrů, že jsme v lumen kanálku zaznamenali pouze Sertoliho buňky a několik

spermatogonií a spermatocytů při bazální membráně (**Obr. 2A**). V intersticiální tkáni mezi kanálky jsme pozorovali zvýšené množství Leydigových buněk. V lumen kanálků proximální části nadvarlat (ductuli efferentes) byly u několika pokusných jedinců zcela prázdné a neobsahovaly téměř žádné buňky (**Obr. 4C**). V distální části nadvarlat (ductus epididymidis) vyplňovala lumen kanálků tekutina obsahující různě vyzrálé buňky zárodečné linie (**Obr. 4D**), ale v mnohem menším množství, než v ductus epididymidis kontrolních jedinců (**Obr. 4B**).



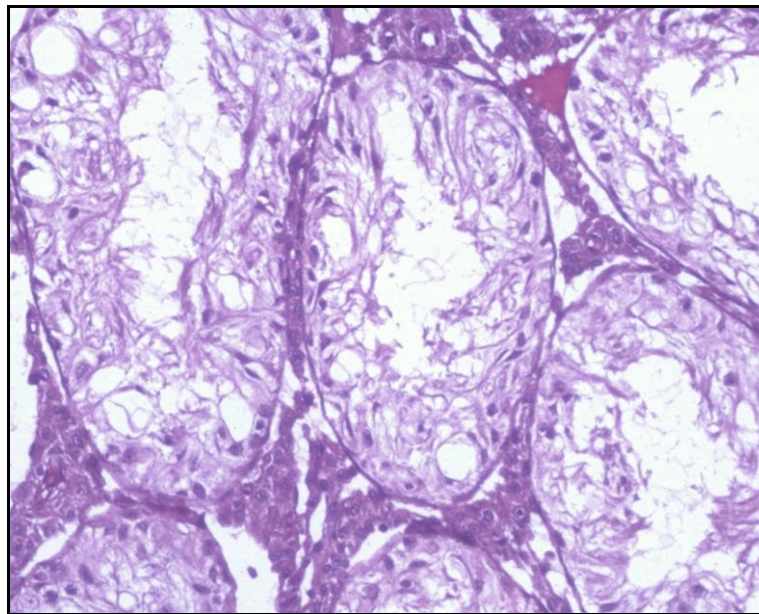
Obrázek č. 4. Kontrolní nadvarle (**A, B**), tkáň nadvarlete po 5 dnech kryptorchismu (**C, D**). (**A, C**) Ductuli efferentes (**B, D**) Ductus epididymidis.

Hematoxylin & eosin, originální zvětšení 200×

INTERVALY 11 A 22 DNŮ KRYPTORCHISMU

Ve fázi pokročilých patologických změn bylo možno pozorovat rozdílný stav zárodečného epitelu v jednotlivých semenotvorných kanálcích. V těchto intervalech jsme v ojedinělých izolovaných semenotvorných kanálcích stále ještě nalézali zralejší

formy buněk zárodečné linie – spermatocyty a výjimečně i spermatidy. Po 22 dnech kryptorchismu byly spermatidy přítomny pouze asi v 10% kanálků. V lumen kanálků se stále ještě vyskytovaly odloučené zárodečné buňky (v intervalu 22 dní již v menším množství). Většina kanálků však již téměř pozbyla zárodečných buněk a jejich epitel byl tvořen pouze Sertoliho buňkami a zbytkem spermatogonií při bazální membráně. K patologickým změnám v operovaných varlatech patřila rozsáhlá vakuolizace v bazálních úsecích kanálků. Změny v intersticiu kolem těchto kanálků nebyly příliš nápadné. Bylo možné pozorovat hyperplastické ostrůvky Leydigových buněk. Kanálky nadvarlat u operovaných zvířat byly vyplněny pouze amorfni nebuněčnou hmotou (u operovaného varlete).



Obrázek č. 5. Tkáň varlete po 44 dnech kryptorchismu.

Hematoxylin & eosin (krátké barvení), originální zvětšení 200×

INTERVALY 44, 85 A 121 DNŮ KRYPTORCHISMU

V naprosté většině semenotvorných kanálků jsme pozorovali kompletní, nebo téměř kompletní, eliminaci zárodečných buněk ze zárodečného epitelu (**Obr. 5**). V takovýchto kanálkách volné výběžky Sertoliho buněk zasahovaly do lumen kanálku. Zbarvení cytoplazmy těchto výběžků bylo eosinofilní. Průřezy takto změněných kanálků byly zřetelně menších rozměrů v porovnání s kanálky s normálně probíhající spermatogenezí. V intersticiu se kolem takovýchto kanálků nacházely hyperplastické

ostrůvky intersticiálních buněk. V některých případech tyto ostrůvky tvořily téměř úplnou výplň mezi hranicemi semenotvorných tubulů. Kanálky nadvarlat u operovaných zvířat byly vyplněny pouze tekutinou a zbytky buněčného materiálu (u operovaného varlete).

SKROTÁLNÍ VARLATA A NADVARLATA OPEROVANÝCH ZVÍŘAT, OPEROVANÉ KONTROLY

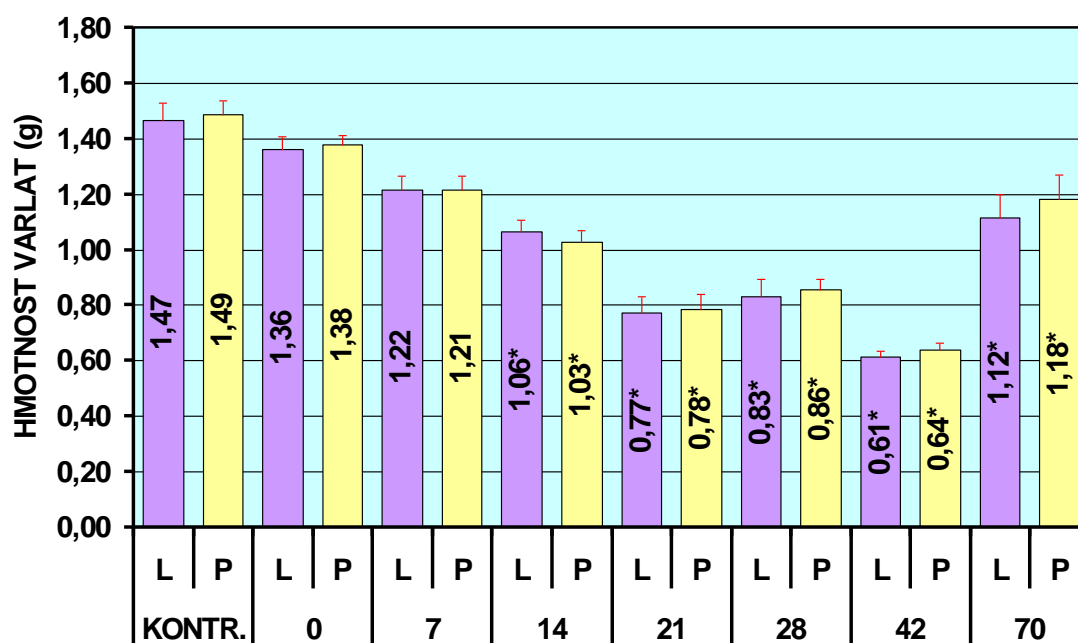
Neoperovaná skrotálně lokalizovaná varlata i nadvarlata pokusných jedinců ve všech sledovaných intervalech kryptorchismu nevykazovala žádné známky poškození a nález byl srovnatelný s kontrolními jedinci. Podobně u simulovaně operovaných jedinců nebyly pozorovány žádné patologické změny s výjimkou řídkých nálezů části odloučeného epitelu v lumen několika kanálků (pravděpodobně důsledek mechanického poškození epitelu v průběhu operace).

BUSULFAN

Podání 10 mg/kg busulfanu v jedné dávce nebo podání dvou těchto dávek v odstupu 21 dnů se neprojevilo na celkovém stavu experimentálních zvířat. Zvířata prospívala a přibývala na váze. Ojediněle se u několika jedinců objevila řidší stolice svědčící o gastrointestinální toxicitě busulfanu. Dávka 40 mg/kg se ukázala být pro potkana kmene Wistar dávkou letální. Zvířata rychle hubla, od 5. dne měla řídkou, krvavou stolici a všichni jedinci zemřeli mezi 8. – 10. dnem po aplikaci busulfanu.

HMOTNOST VARLAT

Hmotnosti varlat po podání dvou dávek busulfanu jsou uvedeny v **Grafu č. 2**.



GRAF č. 2. Hmotnost varlat po podání busulfanu (L-levé varle, P-pravé varle)

$p > 0,05$ v porovnání s kontrolní skupinou

Ke statisticky nevýznamnému poklesu hmotnosti varlat došlo již 21 dnů po podání jedné dávky busulfanu (10 mg/kg) – v grafu označeno jako den 0. 42. den po aplikaci jedné dávky klesla hmotnost varlat téměř na polovinu ($0,86\text{g} \pm 0,06\text{g}$). Po aplikaci dvou dávek busulfanu došlo k postupnému klesání hmotnosti varlat potkanů. Nejvýraznější hmotnostní úbytek varlat jsme zjistili v intervalech 21, 28 a 42 dnů od podání druhé dávky. Hmotnost varlat z těchto intervalů byla téměř poloviční ve

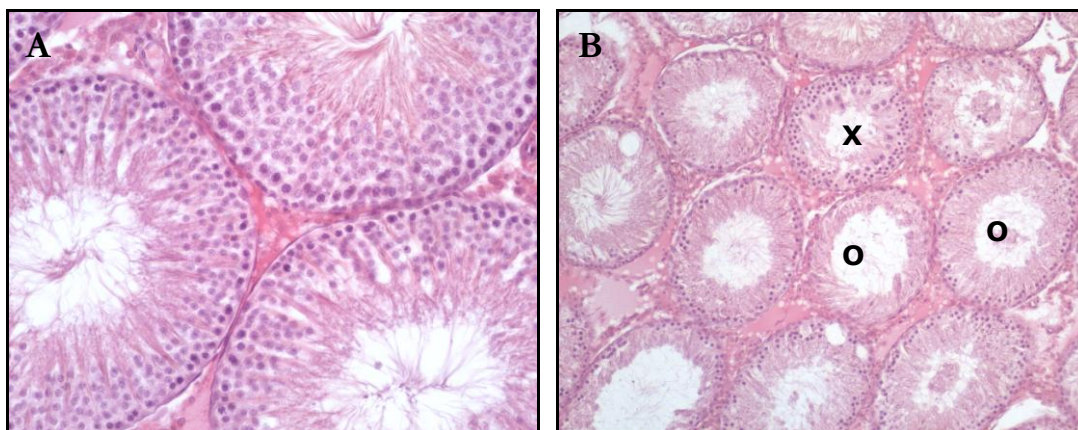
srovnání s kontrolní skupinou. 70. den došlo ke vzestupu hmotnosti varlat v důsledku postupného obnovování zárodečného epitelu a spermatogeneze. Přesto hmotnost těchto varlat dosáhla pouze necelých 80% hmotnosti kontrolních varlat.

VÝSLEDKY HISTOLOGICKÉHO HODNOCENÍ

KONTROLNÍ SKUPINA

Zvířata, kterým bylo dvakrát aplikováno vehikulum DMSO (dimethylsulfoxid), měla neporušený zárodečný epitel se Sertoliho buňkami a všemi stádii zárodečných buněk. Leydigovy buňky a další komponenty intersticiální tkáně mezi semenotvornými kanálky nevykazovaly žádné změny.

PODÁNÍ 1 DÁVKY 10 mg/kg A 1 DÁVKY 40 mg/kg BUSULFANU

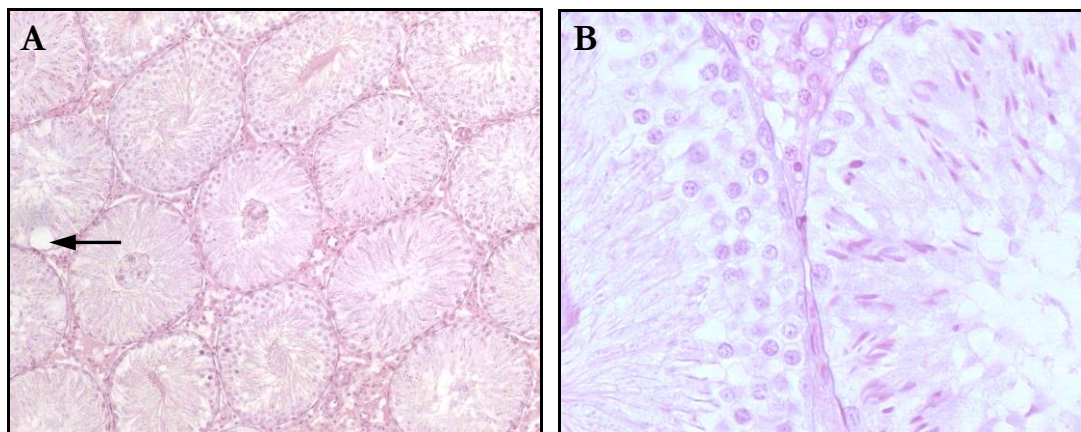


Obrázek č. 6. Tkáň varlete 7 dnů (A) a 42 dnů (B) po jedné dávce busulfanu (10 mg/kg). Hematoxylin & eosin (krátké barvení), originální zvětšení (A) - 200×, (B) - 100×

Ve varlatech potkanů nebyly nalezeny významné patologické nálezy 7 dní po aplikaci 10 mg/kg ani 40 mg/kg. Patologické změny byly pozorovány v intervalu 21 dní (výjimečný výskyt vakuol v Sertoliho buňkách) a velmi často nepřítomnost spermatogonií při bazální membráně (**Obr. 6A**). Zřetelnější poškození bylo pozorováno především 42 dní od podání busulfanu, kdy v zárodečném epitelu často chyběly vedle spermatogonií i spermatocyty a spermatidy. Rozsah poškození byl ovšem heterogenní a tak jsme vedle sebe pozorovali kanálky velmi poškozené (**Obr. 6B - O**) i kanálky s částečně probíhající spermatogenezí (**Obr. 6B - X**).

PODÁNÍ DVOU DÁVEK BUSULFANU 10 mg/kg

Ve skupině zvířat usmrčených 7 dnů po podání druhé dávky busulfanu nebyly patrné rozsáhlejší změny ve stavbě zárodečného epitelu (**Obr. 7A**). Pozorovali jsme kanálky se zachovalým zárodečným epitelem, v němž bylo možno sledovat všechna vývojová stádia spermatogeneze s výjimkou spermatogonií, které ve většině kanálků chyběly (**Obr. 7B, 10B**). V lumen některých kanálků se však vyskytovaly shluky z epitelu již odloupaných zárodečných buněk. Ojedinele byly v některých kanálcích patrné výraznější změny – tvorba vakuol v Sertoliho buňkách (**Obr. 7A – šipka**), vymizení spermatocytů a kulatých spermatid, zatímco elongované spermatidy byly v epitelu vždy přítomny (**Obr. 7B – pravý kanálek; 10B**). Intersticiální tkáň mezi kanálky byla nezměněna.



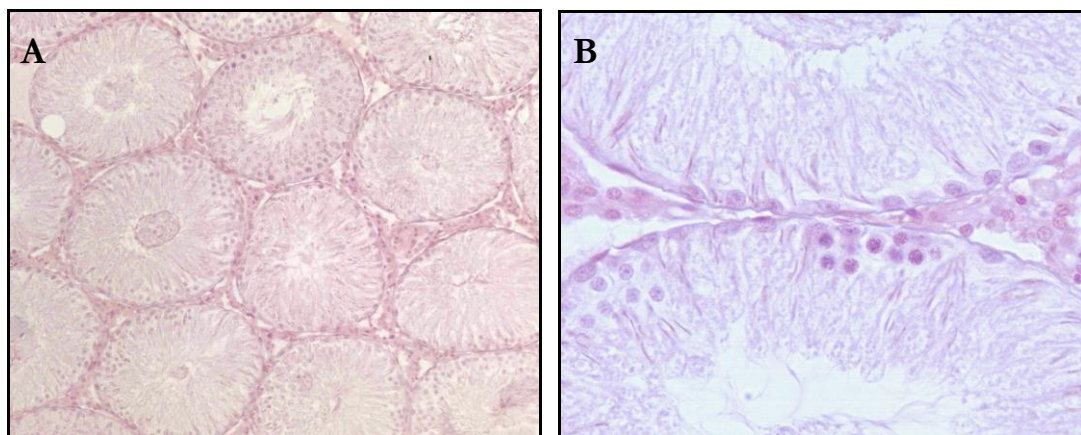
Obrázek č. 7. Tkáň varlete 7 dnů po druhé dávce busulfanu.

Hematoxylin & eosin (krátké barvení), originální zvětšení (A) - 100×, (B) - 400×

14. den od podání druhé dávky byly stále ve většině kanálků přítomny elongované spermatidy, ale v zárodečném epitelu chyběly spermatogonie, spermatocyty a často i kulaté spermatidy.

Na **obrázku 8B** lze pozorovat kanálek vystlaný pouze Sertoliho buňkami, do nichž jsou zanořeny elongované spermatidy, zatímco ve spodním kanálku jsou ještě přítomny skupiny kulatých spermatid. V lumen kanálků jsme ve větším množství pozorovali odloučené skupiny různě zralých stádií zárodečných buněk. K patologickým změnám patřila také tvorba menších či větších vakuol v Sertoliho buňkách

při bazální membráně semenotvorných kanálků, která vedla k desintegraci uspořádání zárodečného epitelu. V intersticiu nebyly patrné významné změny (**Obr. 8A**).



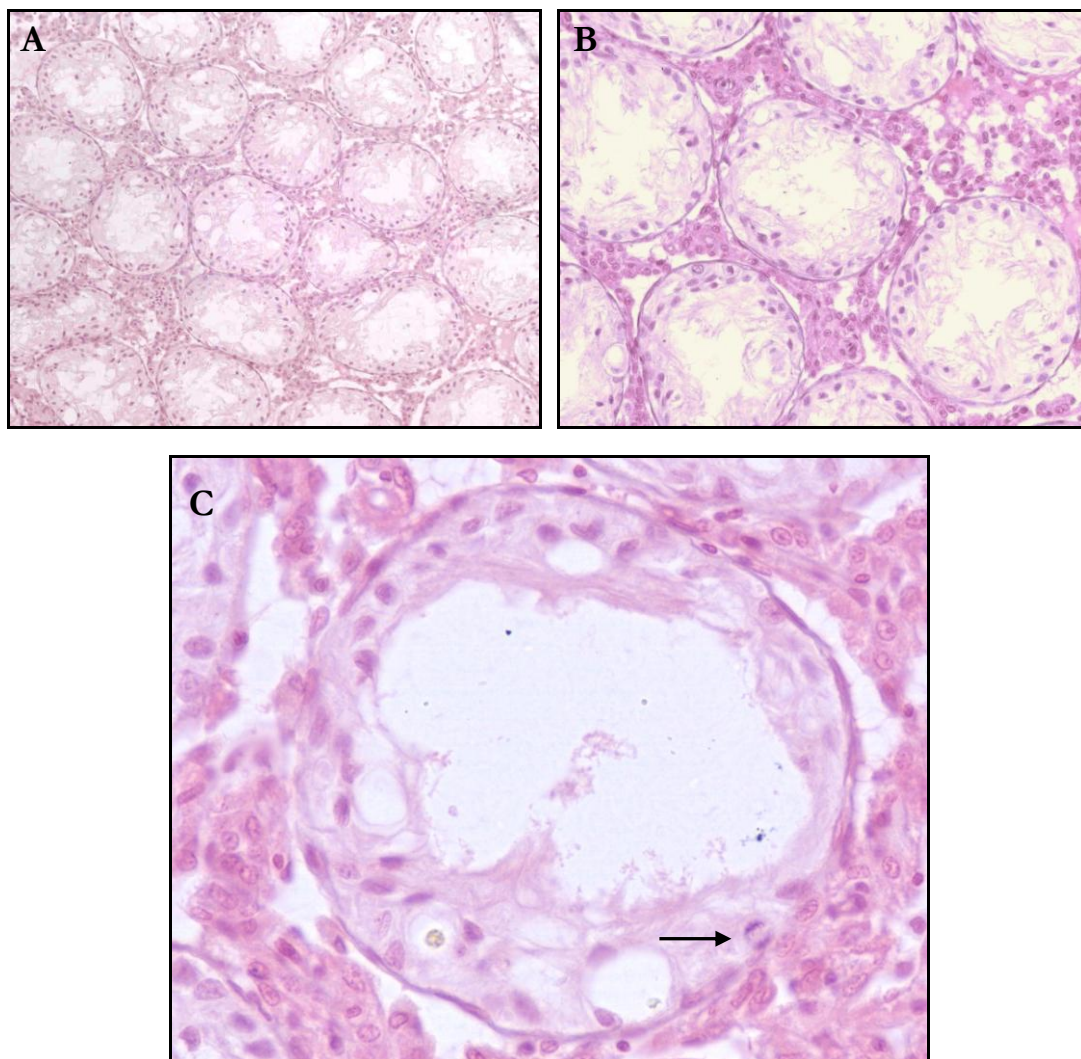
Obrázek č. 8. Tkáň varlete 14 dnů po druhé dávce busulfanu.

Hematoxylin & eosin (krátké barvení),
originální zvětšení (A) - 100×, (B) - 400×

21. den po aplikaci druhé dávky busulfanu a v následujících časových intervalech (28 a 42 dnů) byly patrné největší změny a nejrozsáhlejší poškození tkáně varlat. Pozorovali jsme nejen velké interindividuální rozdíly v reakci tkáně varlete na aplikované cytostatikum, ale také rozdílné poškození jednotlivých semenotvorných kanálků v jednom varleti.

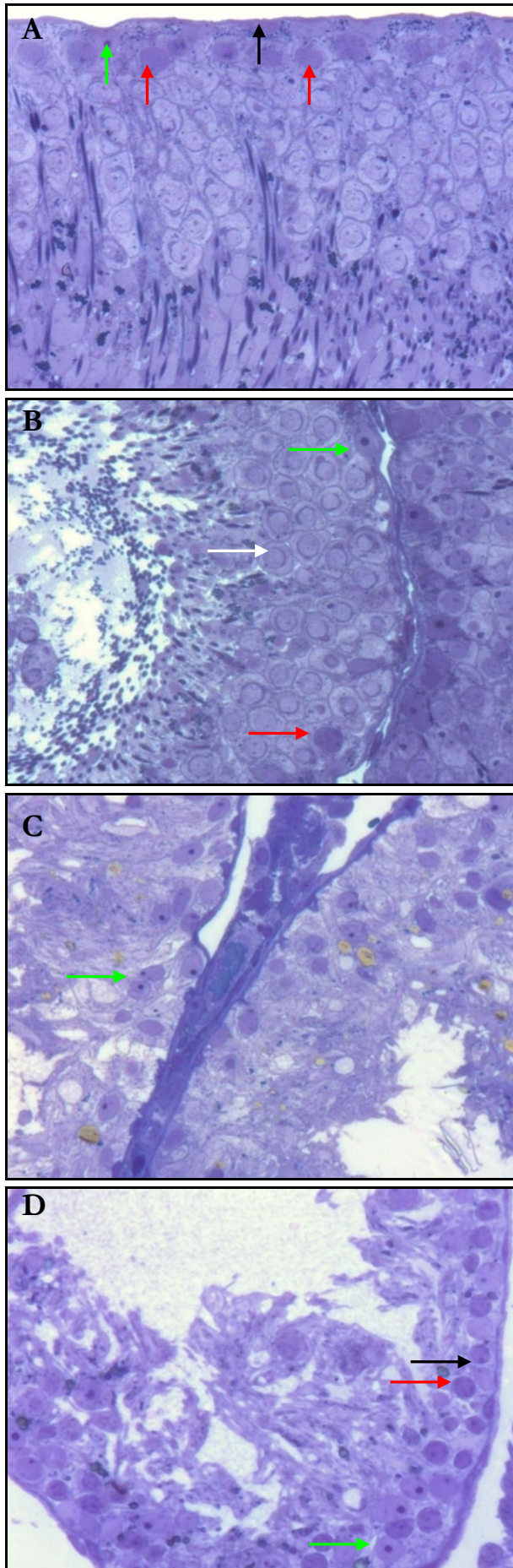
U 2 zvířat z **21** denní a u dvou z **28** denní experimentální skupiny došlo k výraznému poškození zárodečného epitelu obou varlat. Kolem vakuol v Sertolihových buňkách se zárodečný epitel dezintegroval a pozorovali jsme kompletní nebo téměř kompletní eliminaci zárodečného epitelu ve většině průřezů semenotvorných kanálků. Zůstalo zachováno pouze několik kmenových buněk – spermatogonií při bazální membráně. V takovýchto kanálcích byly pozorovány různě zprohýbané výběžky Sertolihových buněk zasahující do lumen kanálku. Průřezy kanálků byly zřetelně menší než-li kanálků kontrolních zvířat. V intersticiu se nacházely hyperplastické ostrůvky Leydigových buněk. V některých případech tyto ostrůvky tvořily úplnou výplň mezi jednotlivými semenotvornými tubuly (**Obr. 9, 10C**).

U dalších zvířat v tomto časovém intervalu (21 dnů) nebyly přítomny takto výrazné změny. V semenotvorných kanálcích bylo sice pozorováno odtrhávání velkých shluků buněk zárodečného epitelu, přesto v některých kanálcích stále ještě perzistovaly elongované spermatidy zanořené do výběžků Sertoliho buněk (ačkoliv spermatocyty a kulaté spermatidy nebyly přítomny). V poškozených kanálcích varlat v intervalech 28 a 42 dní již elongované spermatidy zcela chyběly.



Obrázek č. 9. Tkáň varlete 21 dní po druhé dávce busulfanu.

Šipka označuje přeživší, dělící se spermatogonii v poškozeném zárodečném epitelu. Hematoxylin & eosin (krátké barvení), originální zvětšení (A) - 100×, (B) - 200×, (C) - 400×



Obrázek č. 10. Tkáň varlete po podání dvou dávek busulfanu.

(A) kontrolní skupina –

v zárodečném epitelu lze pozorovat kompletní vývojová stádia zárodečných buněk;

(B) 7 dní – při bazální membráně chybí spermatogonie a téměř zcela také spermatocyty, kulaté spermatidy jsou v akrosomální fázi spermatohistogeneze;

(C) 21 dní – v epitelu jsou přítomny pouze Sertoliho buňky, nápadný je výskyt vakuol;

(D) 28 dní – je vidět znovunastartování spermatogeneze, zárodečné buňky jsou přítomny do stádia spermatocytu.

Polosilné řezy.

Toluidinová modř – pyronin.

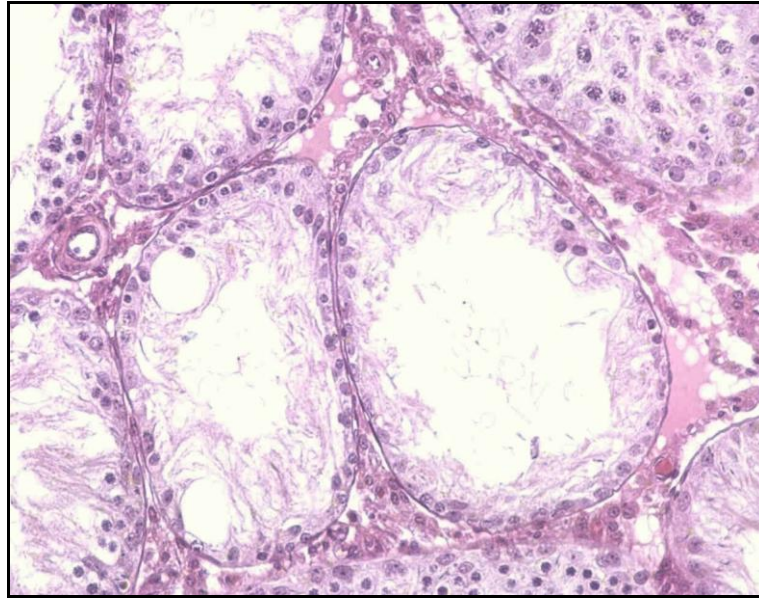
originální zvětšení 400×

Zelené šipky – Sertoliho buňky

Černé šipky – spermatogonie

Červené šipky – spermatocyty

Bílé šipky - spermatidy

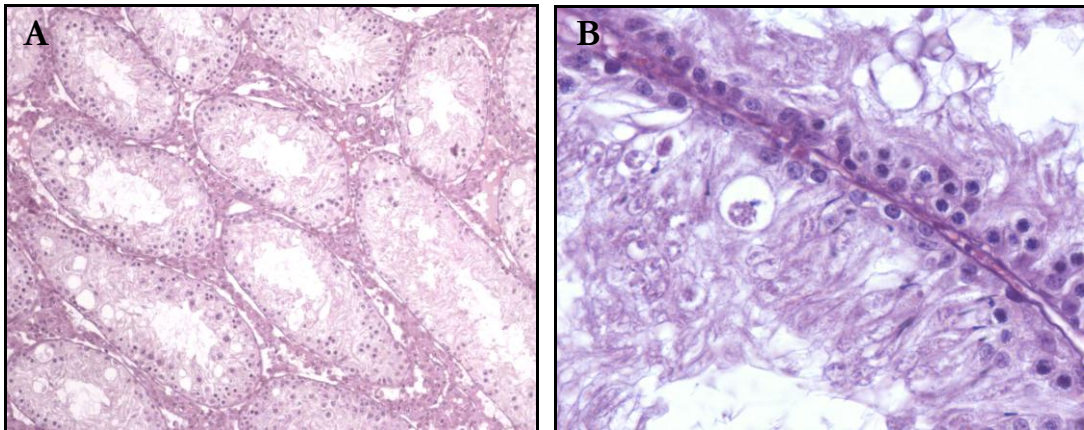


Obrázek č. 11. Tkáň varlete 28 dní po druhé dávce busulfanu.

Hematoxylin & eosin, originální zvětšení 200×

Ve skupině zvířat **28 dní** od podání druhé dávky busulfanu (a výjimečně i 21 dnů) jsme u některých vyšetřovaných jedinců (pouze v menší části zárodečných kanálků) pozorovali výskyt spermatogonií a také několika spermatocytů bez přítomnosti vyšších forem zárodečných buněk. Přeživší kmenová spermatogonie A v M-fázi buněčného cyklu je zachycena na obrázku **9C (šipka)** již 21. den po aplikaci busulfanu. Vzhledem k odstupu (28 dnů) od podání busulfanu je pravděpodobné, že v semenotvorných kanálkách zvířat z této skupiny již dochází ke skutečnému zahájení rekonstrukce zárodečného epitelu a znovunastartování spermatogeneze (**Obr. 10D, 11**). Pro tuto úvahu hraje fakt, že v dalším intervalu (42 dnů) byl tento efekt již zcela zřejmý u všech zvířat (ačkoliv se lišil rozsahem).

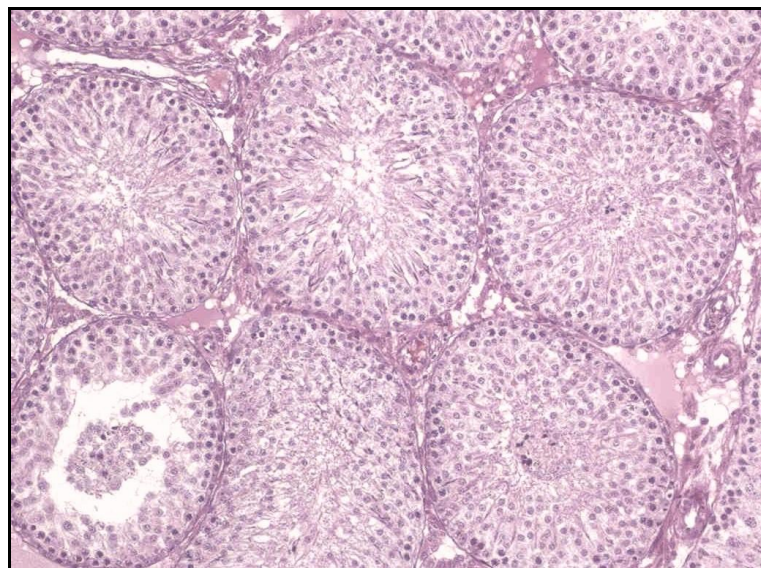
42 dní od podání druhé dávky busulfanu byla stále ještě výrazně poškozena obě varlata (v tomto intervalu měla také nejnižší hmotnost) a nezaznamenali jsme přítomnost spermatid v zárodečném epitelu pokusných zvířat. V bazální části zárodečného epitelu jsme mezi Sertoliho buňkami pozorovali dělicí se spermatogonie a také primární spermatocyty v různých stádiích profáze meiotického dělení (**Obr. 12**). Výstelku některých kanálků však tvořily stále pouze Sertoliho buňky, mezi nimiž se při bazální membráně občas objevila osamocená spermatogonie. Tyto kanálky byly zřetelně redukovaných rozměrů. V intersticiu varlat u zvířat z této experimentální skupiny se stále nacházely nápadné hyperplastické ostrůvky Leydigových buněk.



Obrázek č. 12. Tkáň varlete 42 dní po druhé dávce busulfanu.

Hematoxylin & eosin (krátké barvení), originální zvětšení (A) - 100×, (B) - 400×

V posledním sledovaném intervalu (**70 dní** od podání druhé dávky busulfanu) jsme již zaznamenali výraznou obnovu zárodečného epitelu ve většině semenotvorných kanálků (**Obr. 13**). Rozsah obnovy spermatogeneze se však u jednotlivých zvířat lišil. U bazální membrány se nacházely spermatogonie, ve směru do lumen byly primární spermatocyty. V mnoha kanálcích již byly mezi apikálními výběžky Sertoliho buněk přítomny kulaté i elongované spermatidy. Ve většině kanáleků tak došlo k postupné obnově všech vývojových fází zárodečného epitelu. Nepřímým důkazem obnovy spermatogeneze bylo zastoupení zralých forem spermatozoí v kanálcích nadvarlete.



Obrázek č. 13. Tkáň varlete 70 dní po druhé dávce busulfanu.

Hematoxylin & eosin, originální zvětšení 100×

Ve varlatech zvířat z této experimentální skupiny jsme pozorovali i kanálky se zcela poškozeným zárodečným epitelem. Tyto kanálky měly epitel tvořen pouze Sertoliho buňkami s četnými vakuolami. Spermatogonie v těchto kanálcích zcela chyběly. Průřezy těchto kanálků byly zřetelně redukovány. Množství těchto kanálků bylo však výrazně nižší než v předchozích časových intervalech.

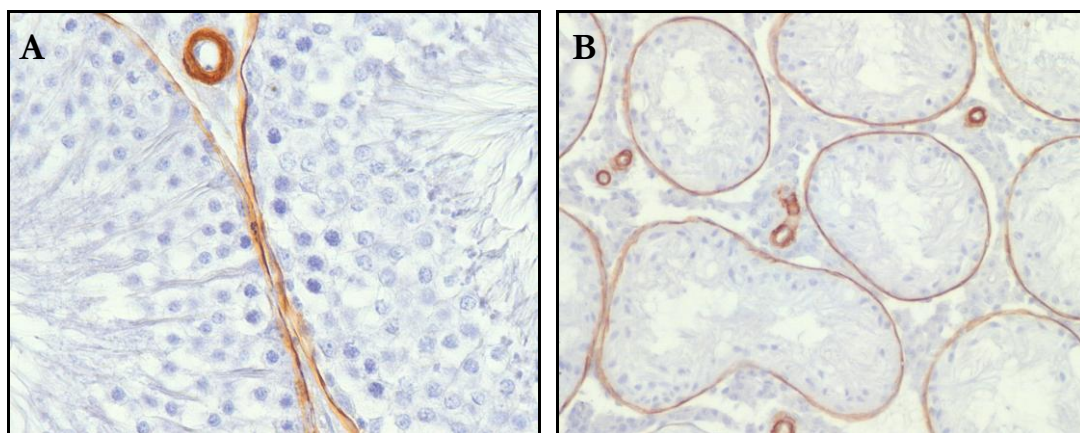
Intersticiální buňky nebyly již výrazně zmnoženy ve srovnání se zvířaty z předchozích skupin a nebyly v nich pozorovány výrazné patologické změny.

CYTOSKELET

Expresi aktinu, tubulinu i vimentinu vykazovala v kontrolních varlatech expresi závislou na stádiu zárodečného epitelu.

AKTIN HLADKOSVALOVÝCH BUNĚK

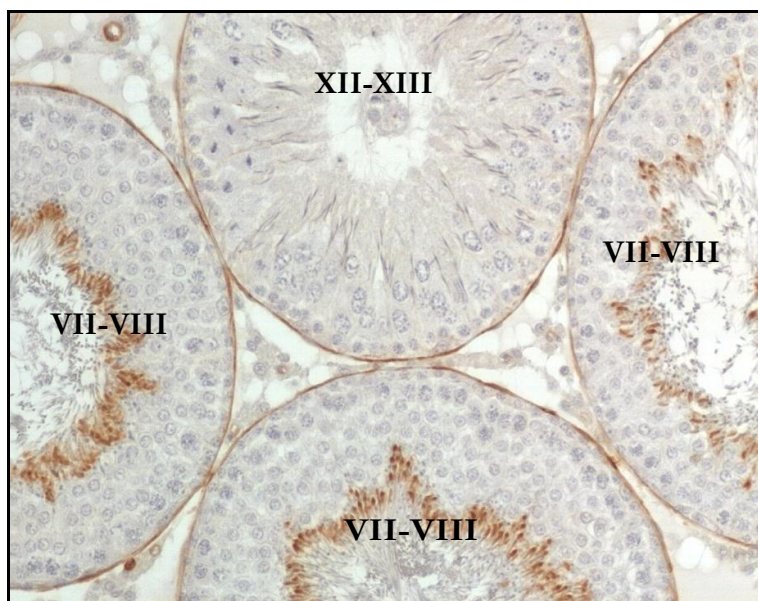
Aktin hladkosvalových buněk se nacházel pouze v peritubulárních myoidních buňkách a v tunica media cév v intersticiální tkáni (**Obr. 14A**). V průběhu poškození tkáně varlat oběma přístupy nedošlo k výrazným změnám v jeho expresi i v nejpoškozenějších semenotvorných kanálcích (**Obr. 14B**).



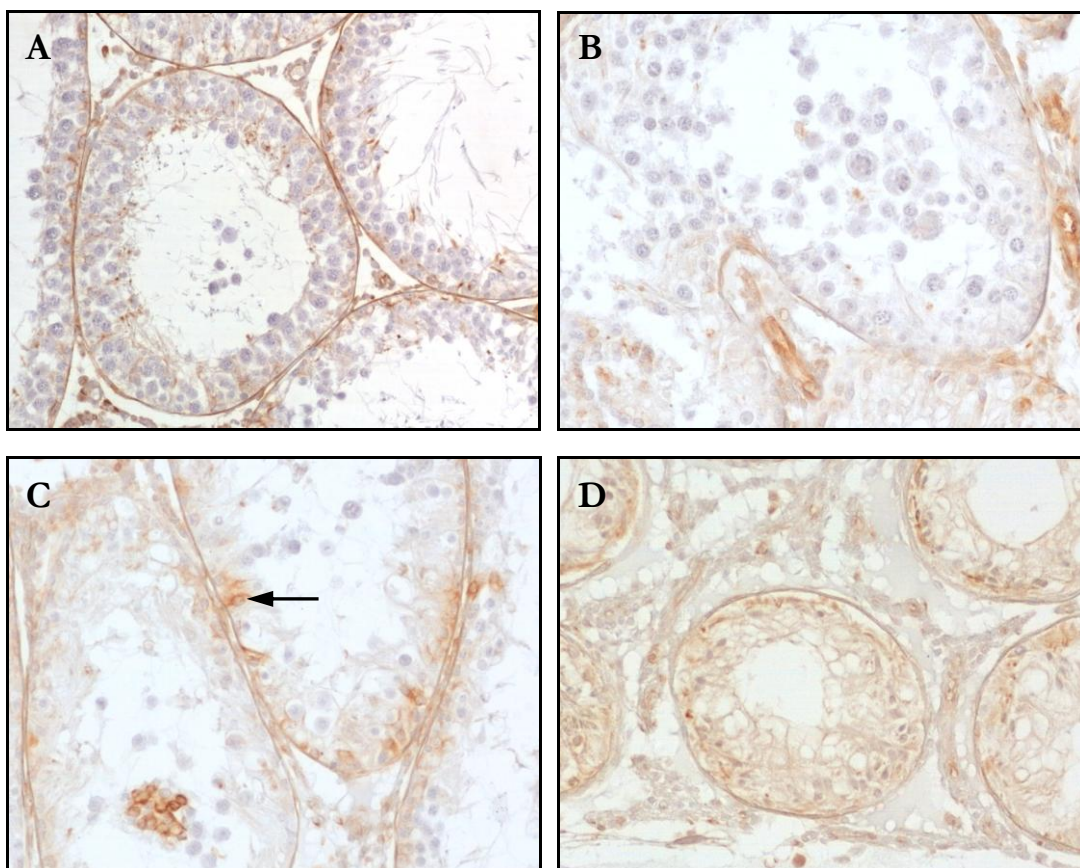
Obrázek č. 14. Expresi aktinu hladkosvalových buněk (A) v kontrolním varleti (B) 21 dnů po podání druhé dávky busulfanu. Dobarveno hematoxylinem, originální zvětšení (A) 400×, (B) 200×

AKTIN

Aktinová vlákna se nacházela především v peritubulárních myoidních buňkách. Expresi aktinu v zárodečném epitelu byla vždy méně výrazná než v peritubulárních myoidních buňkách. Aktinová vlákna jsme detekovali při bazi epitelu a také kolem elongovaných spermatid především ve stádiích III – VIII zárodečného epitelu, zatímco v dalších stádiích (IX-XIV) došlo ke snížení až vymizení exprese aktinu ze zárodečného epitelu (**Obr. 15**).



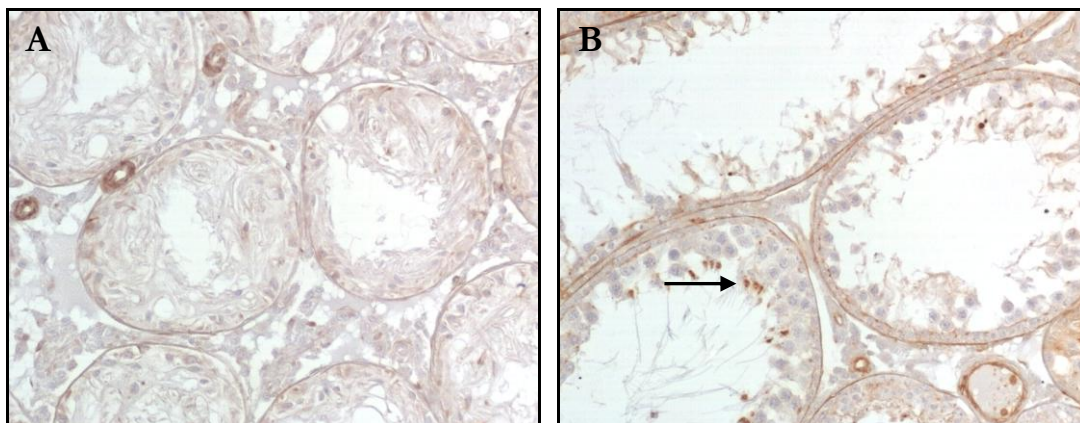
Obrázek č. 15. Expres aktinu v kontrolním varleti. Dobarveno hematoxylinem, originální zvětšení 200×



Obrázek č. 16. Expres aktinu v kryptorchickém varleti (A) 3 dny, (B, C) 5 dnů, (D) 22 dnů. Dobarveno hematoxylinem, originální zvětšení 200×

U **kryptorchizovaných** zvířat došlo k prvním změnám v expresi aktinu již 3. den trvání kryptorchismu, kdy se začaly odlučovat spermatické buňky do lumen semenotvorného kanálku (**Obr. 16A**). Tento děj byl doprovázen vymizením aktinových vláken z adluminalních částí zárodečného epitelu. V bazální části zárodečného epitelu zůstala aktinová vlákna zachována (**Obr. 16B, 16C - šipka**). V dalších intervalech dezintegrace aktinových vláken dále progredovala. V nejvíce poškozených kanálcích varlat byla exprese aktinu nejsilnější při bazální membráně, slabší zůstala zachována i v adluminalních částech semenotvorného kanálku, resp. v apikálních výběžcích Sertoliových buněk (**Obr. 16D**).

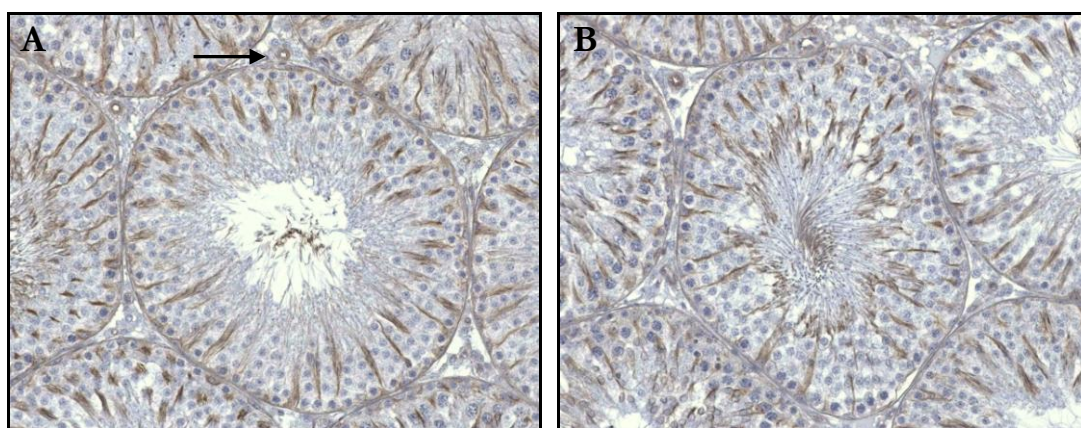
U zvířat, jimž byl podáván **busulfan**, došlo k prvním výraznějším změnám až 7., resp. 14. den po podání druhé dávky busulfanu, a to v kanálcích, kde začalo docházet k odlučování spermatických buňek ze zárodečného epitelu. 21. den po aplikaci 2. dávky došlo k úplnému zhroucení (v některých kanálcích k vymizení) aktinových vláken směrem k bazální membráně. Exprese aktinu se snížila i v peritubulárních myoidních buňkách (**Obr. 17A**). S postupnou obnovou spermatogeneze v posledních dvou intervalech došlo k obnovení sítě aktinových vláken, včetně vláken kolem elongovaných spermatických buňek. Opětovný výskyt aktinových vláken kolem spermatických buňek je zachycen na obrázku **17B - šipka**.



Obrázek č. 17. Exprese aktinu po aplikaci dvou dávek busulfanu. (A) 21 dnů, (B) 42 dnů. Dobarveno hematoxylinem, originální zvětšení 200×

TUBULIN

Tubulinová vlákna v Sertoliho buňkách kontrolních zvířat byla uspořádána do provazců mezi zárodečnými buňkami od bazální membrány až do jejich apikálních výběžků (**Obr 18**). Změny v expresi tubulinu odrážely změny tvaru Sertoliho buněk, ke kterým dochází podle uspořádání zárodečných buněk v zárodečném epitelu. Druhým typem buněk v zárodečném epitelu, v nichž se nacházel tubulin, byly elongované spermatidy. V intersticiální tkáni jsme tubulin detekovali především ve stěně cév (**Obr. 18A – šipka**).



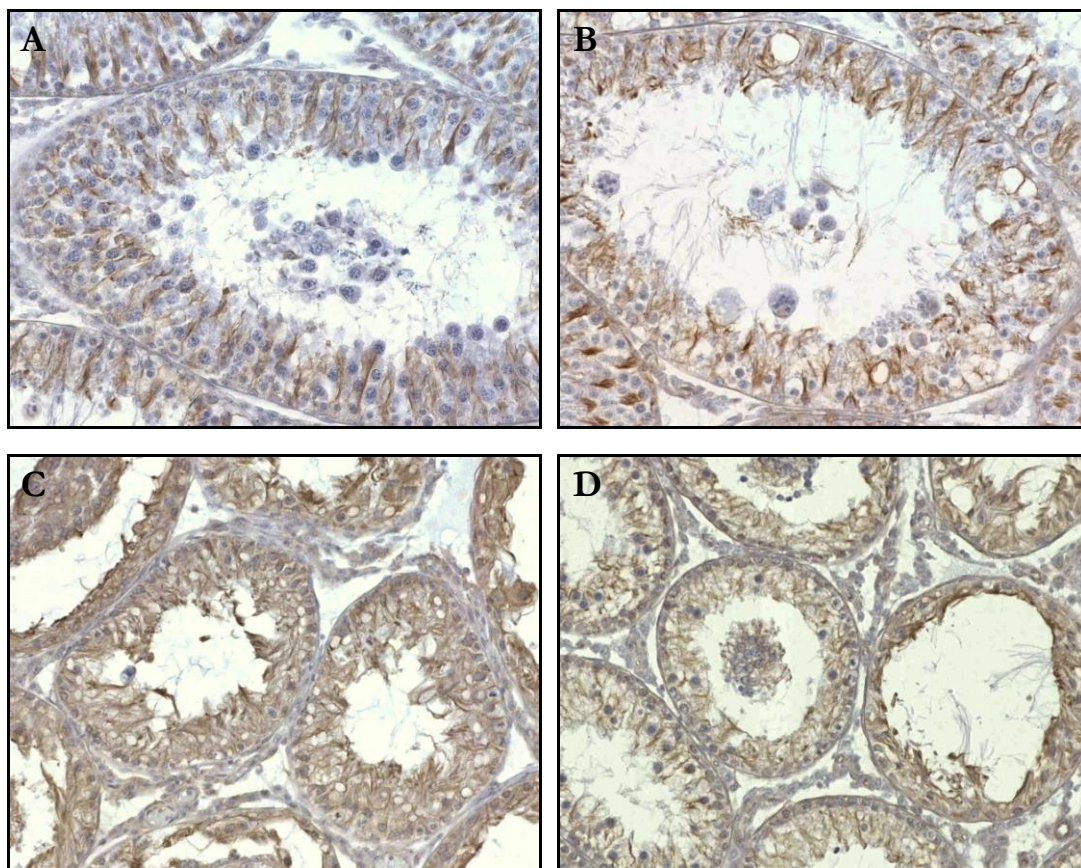
Obrázek č. 18. Expresie tubulinu v kontrolním varleti. (A) stádium zárodečného epitelu III-V, **(B)** – stádium zárodečného epitelu VII-VIII. Dobarveno hematoxylinem, originální zvětšení 200×

Kryptorchismus ani podání busulfanu neovlivnilo expresi tubulinu v Sertoliho buňkách, ale pouze uspořádání tubulinových vláken v Sertoliho buňkách (**Obr. 19, 20**). V semenotvorných kanálcích, v nichž byla přítomna jednotlivá vývojová stadia spermatogeneze, byl tubulin lokalizován ve formě provazců v Sertoliho buňkách mezi zárodečnými buňkami. Ve vakuolizovaných Sertoliho buňkách byla tubulinová vlákna přítomna i v bezprostřední blízkosti těchto vakuol. **U kryptorchických varlat**, kde zůstala zachována bazální část epitelu pouze se spermatogoniemi a spermatocyty, jsme v bazálním kompartmentu kanálku pozorovali tubulinová vlákna v Sertoliho buňkách mezi jednotlivými zárodečnými buňkami ve stejných konfiguracích jako v kontrolních varlatech. V adluminálním kompartmentu, kde již chyběly spermatidy, příp. i spermatocyty, jsme pozorovali tubulinová vlákna v apikálních výběžcích Sertoliho

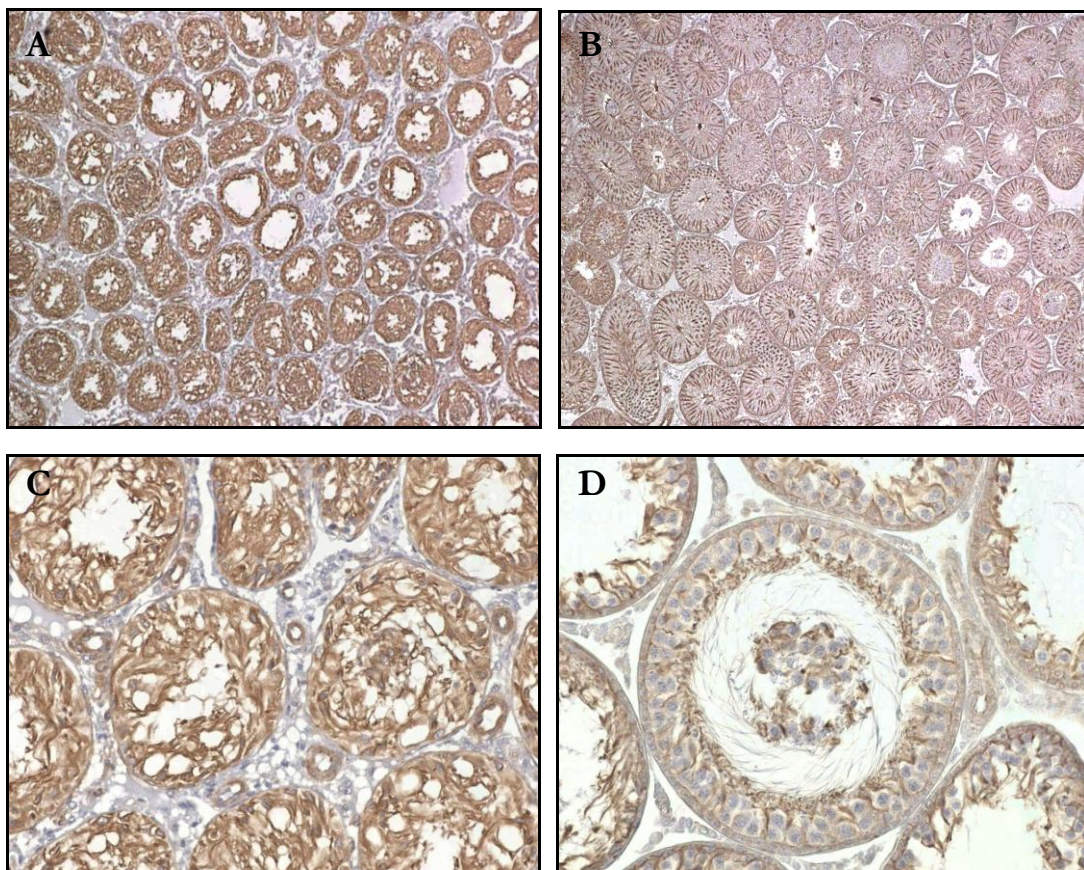
buněk vlajících do lumen kanálku bez vazby na cyklus zárodečného epitelu (**Obr. 19A, 19B**).

V experimentu s **busulfanem** jsme nezaznamenali výrazné změny v konfiguraci tubulinových vláken v méně poškozených kanálcích z prvních intervalů. Ztráta spermatogonií neměla vliv na uspořádání tubulinových vláken mezi spermatocyty a spermatidami.

V kanálcích bez přítomnosti zárodečných buněk (v rámci obou experimentů) byla exprese tubulinu přítomna v celé cytoplazmě Sertoliho buněk od baze až po do lumen volně trčí výběžky v obou experimentech. V takovýchto kanálcích nebyla vlákna tubulinu uspořádána do provazců, ale do různě uspořádaných shluků, které vyplňovaly výběžky Sertoliho buněk trčící do lumen kanálků (**Obr. 19C, 19D, 20A, 20C**).



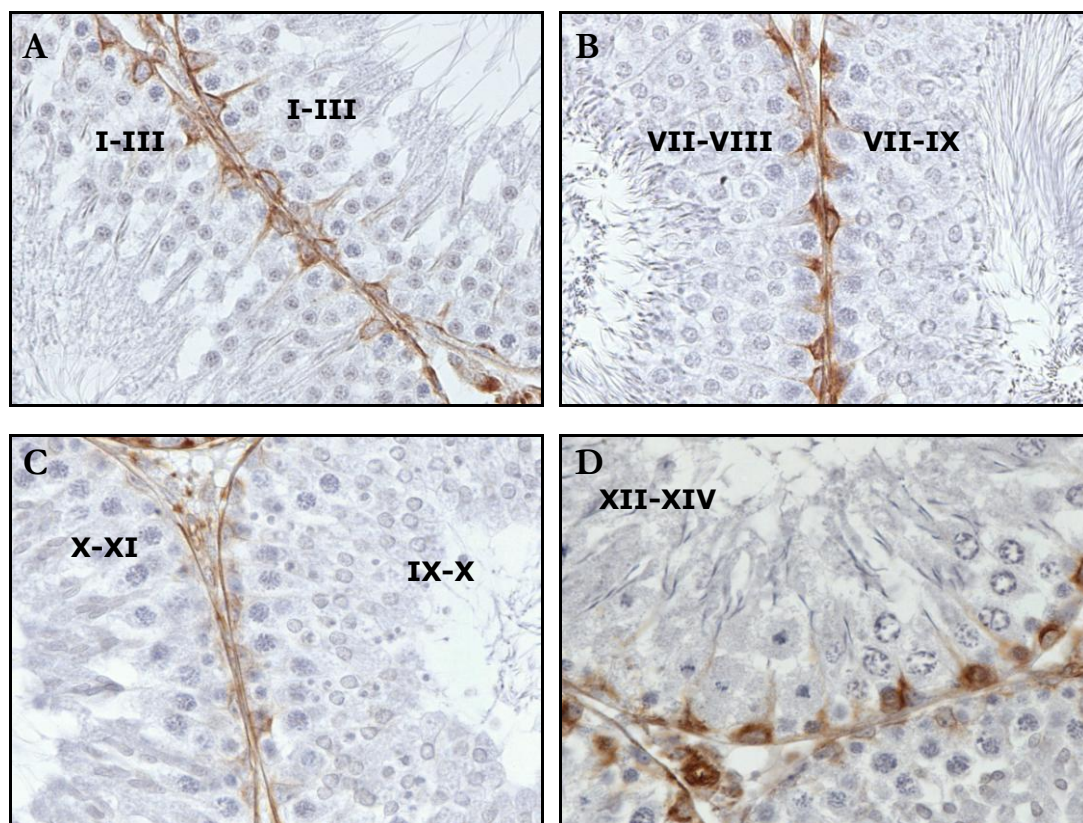
Obrázek č. 19. Exprese tubulinu v kryptorchickém varleti (**A**) 3 dny, (**B**) 5 dnů, (**C**) 11 dnů, (**D**) 22 dnů. Dobarveno hematoxylinem, originální zvětšení 200×



Obrázek č. 20. Expres tubulinu po aplikaci dvou dávek busulfanu (A) 21 dnů, (B) 70 dnů, (C) 21 dnů, (D) 42 dnů. Dobarveno hematoxylinem, originální zvětšení (A, B) – 40×, (C, D) – 200×

V posledních časových intervalech experimentu s aplikací busulfanu (28, 42 a 70 dnů) jsme pozorovali opětovnou obnovu strukturálního uspořádání tubulinu. V kanálcích, v nichž byly vedle spermatogonií přítomny pouze primární spermatocyty a zárodečný epitel se ještě plně neobnovil, byla zřetelná postupná strukturalizace tubulinových vláken. Zatímco kolem spermatogonií a spermatocytů byla tubulinová vlákna již uspořádána rovnoběžně (kolmo k bazální membráně), tak nad spermatocyty tvořila tubulinová vlákna stále ještě neuspořádané shluky ve výbězcích Sertoliho buněk (**Obr. 20D**). 70 dní po aplikaci druhé dávky busulfanu zaujímal tubulinová vlákna v kanálcích s obnovenou spermatogenezí stejnou konfiguraci jako v kontrolních varlatech (**Obr. 20B**).

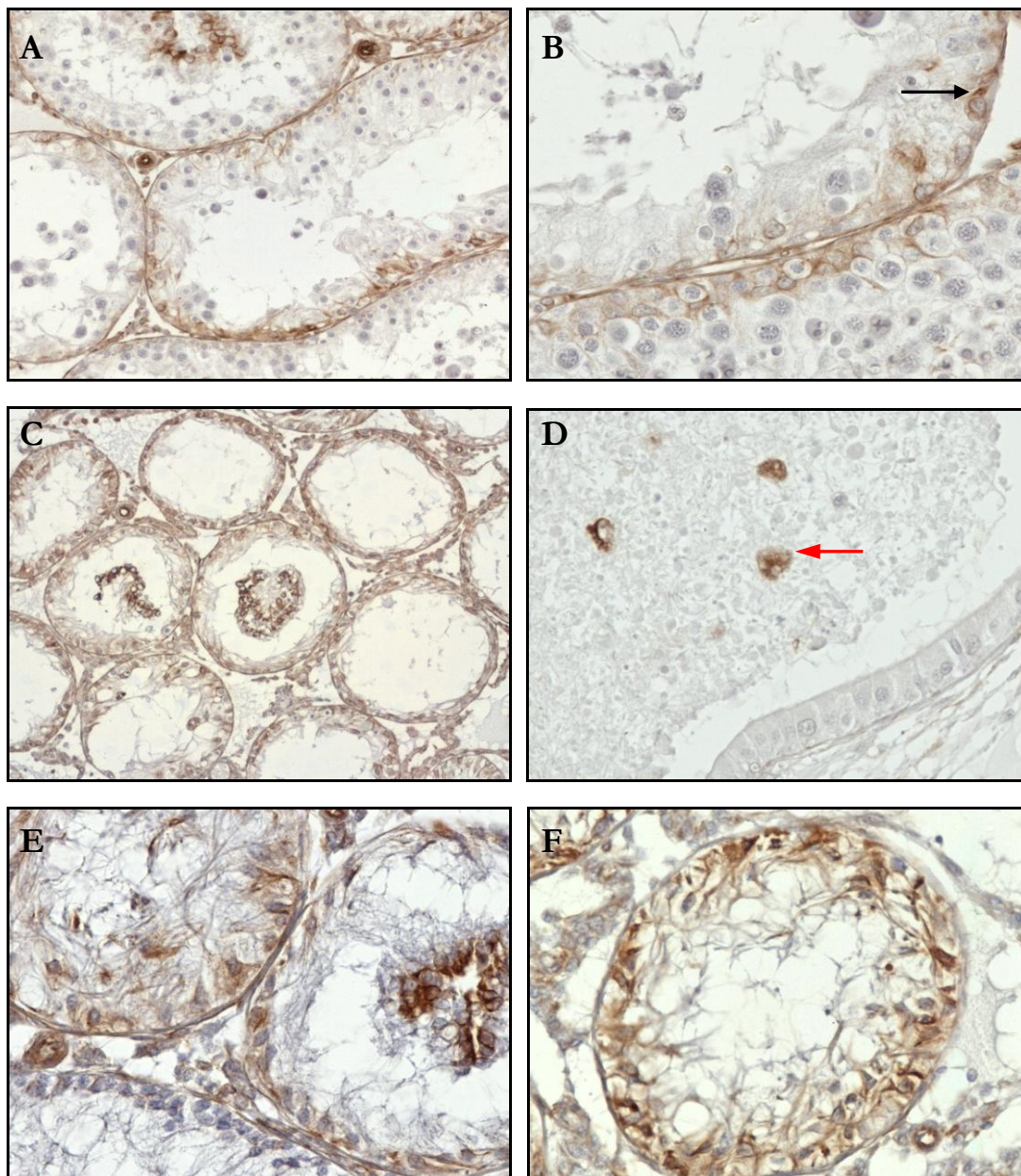
VIMENTIN



Obrázek č. 21. Expres vimentinu v kontrolních varlatech.

Dobarveno hematoxylinem, originální zvětšení 400×

Expres vimentinu byla na rozdíl od tubulinu v průběhu spermatogenního cyklu epitelu méně uniformní. Ve varlatech kontrolní skupiny se vimentinová filamenta v Sertoliho buňkách vyskytovala v bazální a perinukleární oblasti (nejsilnější exprese ve stádiu I-VI zárodečného epitelu) a vybíhala směrem k apikálnímu částem buňky. Apikální vimentinová vlákna byla v Sertoliho buňkách přítomna ve stádiích I-VII, poté vymizela (VII-XI), aby se opět začala objevovat mezi elongujícími se spermatidami ve stádiích (XI-XIV). Vimentin-pozitivní byly také peritubulární myoidní buňky. V intersticiu jsme nejsilnější pozitivitu pozorovali různých typech buněk stěny testikulárních cév. Pozitivita byla také v Leydigových buňkách, fibroblastech a buňkách imunitního systému (**Obr. 21**).



Obrázek č. 22. Expresi vimentinu v kryptorchickém varleti (A, B) 5 dnů,

(C) 11 dnů, (E) 22 dnů, (F) 85 dnů a nadvarleti (D) 11 dnů.

Dobarveno hematoxylinem, originální zvětšení (C) – 100×,

(A, E, F) – 200×, (B, D) – 400×

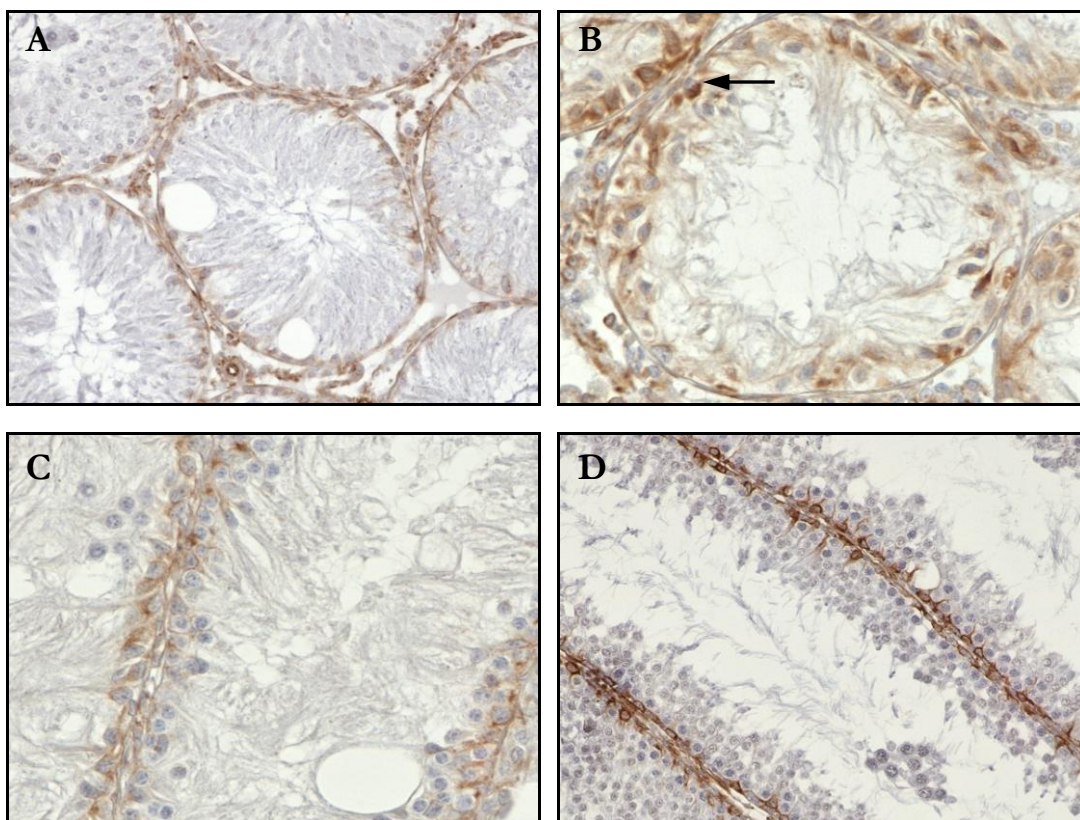
První změny se v expresi vimentinu **u kryptorchizovaných zvířat** objevily 3. – 5. den po operaci, kdy došlo k vymizení apikálních vimentinových vláken v kanálcích s poškozenou spermatogenezí. V těchto kanálcích jsme pozorovali silnou expresi v perinukleární a bazální oblasti Sertoliho buněk (**Obr. 22A, 22B - šipka**). Vimentinová vlákna jsme našli také kolem jader buněk, které se odloučily ze zárodečného epitelu (tato pozitivita zůstala v těchto buňkách zachována, i když dosáhly nadvarlete – **Obr.**

22D - červená šipka). Postupný kolaps a dezintegrace vimentinových vláken pokračovala i v dalších intervalech do 22. dne (**Obr. 22C, 22E**). Od tohoto intervalu, kdy se v zárodečném epitelu nacházeli již pouze Sertoliho buňky, příp. několik spermatogonií, byla vimentinová vlákna chaoticky uspořádána v bazální části kanálků kolem jader Sertoliho buněk (**Obr. 22F**).

V experimentu s **busulfanem** jsme první změny pozorovali v semenotvorných kanálcích zvířat, jimž byla aplikovaná jedna dávka busulfanu. 21 dnů a 42 dnů po aplikaci busulfanu došlo ke změnám exprese vimentinu v bazálním i apikálním kompartmentu Sertoliho buněk v kanálcích, v nichž došlo ke ztrátě zárodečných buněk. 7. a 14. dne po aplikaci druhé dávky busulfanu jsme v kanálcích s porušeným zárodečným epitelem pozorovali ubývání vimentinu v apikální oblasti cytoplazmy Sertoliho buněk. V těchto tubulech jsme zaznamenali vzestup reaktivity vimentinu kolem jader Sertoliho buněk (**Obr. 23A**). Ve většině poškozených kanálků v dalších intervalech, kde byl epitel tvořen pouze Sertoliho buňkami, jsme pozorovali progresi těchto změn s intenzivní expresí vimentinu v bazální a perinukleární oblasti Sertoliho buněk (**Obr. 23B – šipka**). Vimentinová vlákna byla v těchto tubulech dezorganizována a náhodně uspořádána. Tyto změny byly pozorovány především ve varlatech ze skupiny 21 a 28 dnů po aplikaci druhé dávky.

Od 28. dne jsme zaznamenali postupnou obnovu zárodečného epitelu. V tubulech s postupně se obnovujícím procesem spermatogeneze jsme pozorovali nové uspořádání vimentinových filament nejprve v bazální oblasti a v oblasti kolem jádra Sertoliho buněk. V dalších intervalech se s výskytem primárních spermatocytů, případně spermatid, vimentinová filamenta v apikální oblasti postupně prodlužovala směrem k lumen kanálků (**Obr. 23C**). 70. den se ve většině tubulů s obnovenou spermatogenezí exprese vimentinu nelišila od uspořádání vimentinových filament v kanálcích varlat zvířat z kontrolní skupiny (**Obr. 23D**).

Změny v expresi vimentinu v intersticiální tkáni nebyly silně vyjádřeny. Nejnápadnější změnou byla zvýšená exprese vimentinu v intersticiálních buňkách varlat s nejvíce poškozenou spermatogenezí (21. – 42. den). Toto zvýšení souviselo se zvýšeným počtem Leydigových buněk v těchto varlatech. 70 dnů po aplikaci 2. dávky busulfanu došlo opět k normalizaci exprese vimentinu na úroveň exprese v kontrolní skupině.



Obrázek č. 23. Expze vimentinu po aplikaci dvou dávek busulfanu –
(A) 14 dnů, (B) 21 dnů, (C) 42 dnů, (D) 70 dnů. Dobarveno hematoxylinem,
originální zvětšení (A, D) – 200×, (B, C) – 400×

MEZIBUNĚČNÁ SPOJENÍ

TĚSNÁ SPOJENÍ

CLAUDIN-11/OSP, OCCLUDIN

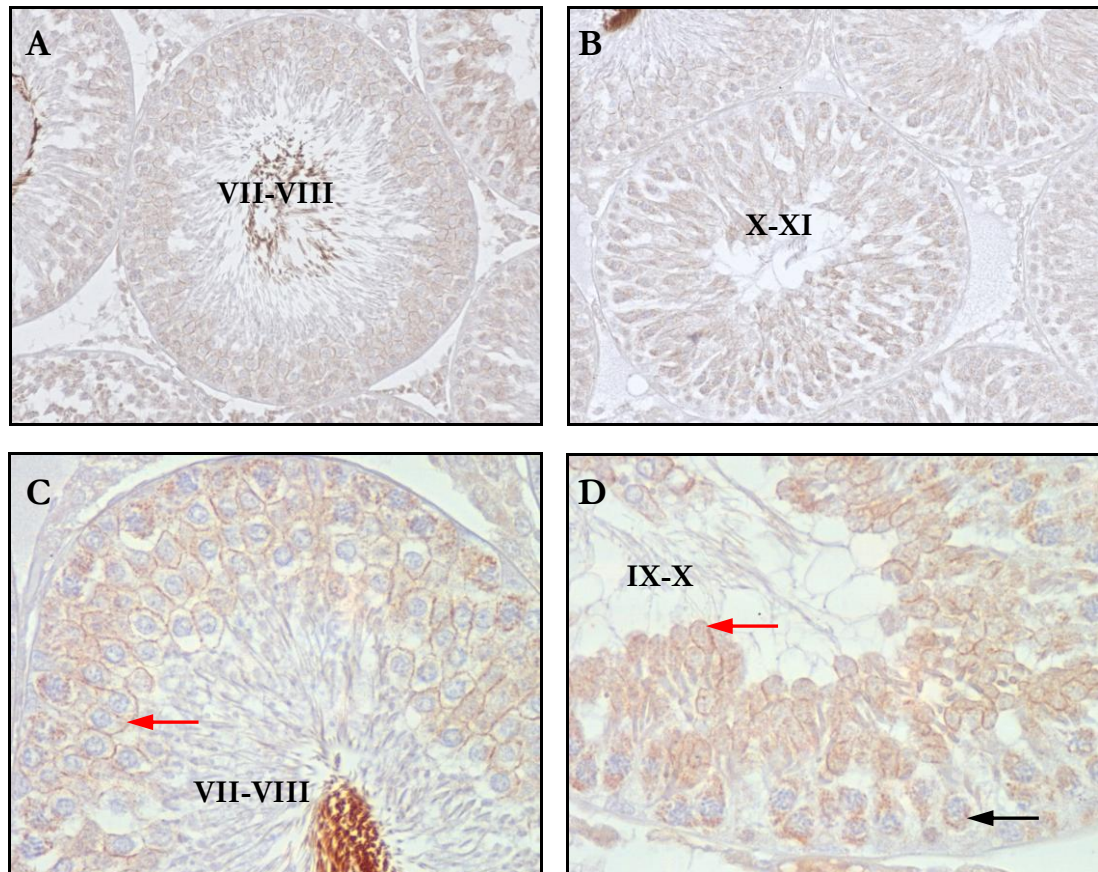
Protilátky proti claudinu-11/OSP (Králičí polyklonální protilátka - Abcam, Cambridge, Velká Británie – kat. č. ab7474) a occludinu (Králičí polyklonální protilátka - Zymed Laboratories Inc., San Francisco, USA - kat. č. 71-1500), které jsme v průběhu experimentu testovali, se v našich podmínkách ukázaly jako nevhodné pro detekci v potkaním varleti. (Protilátka proti occludinu fungovala ovšem ve vzorcích stejným způsobem zpracovaných tkání než varle, např. v tenkém střevě a ledvinách.)

ADHERENTNÍ SPOJENÍ

P-CADHERIN

P-cadherin byl exprimován převážně v zárodečném epitelu, v menší míře v intersticiální tkáni mezi kanálky.

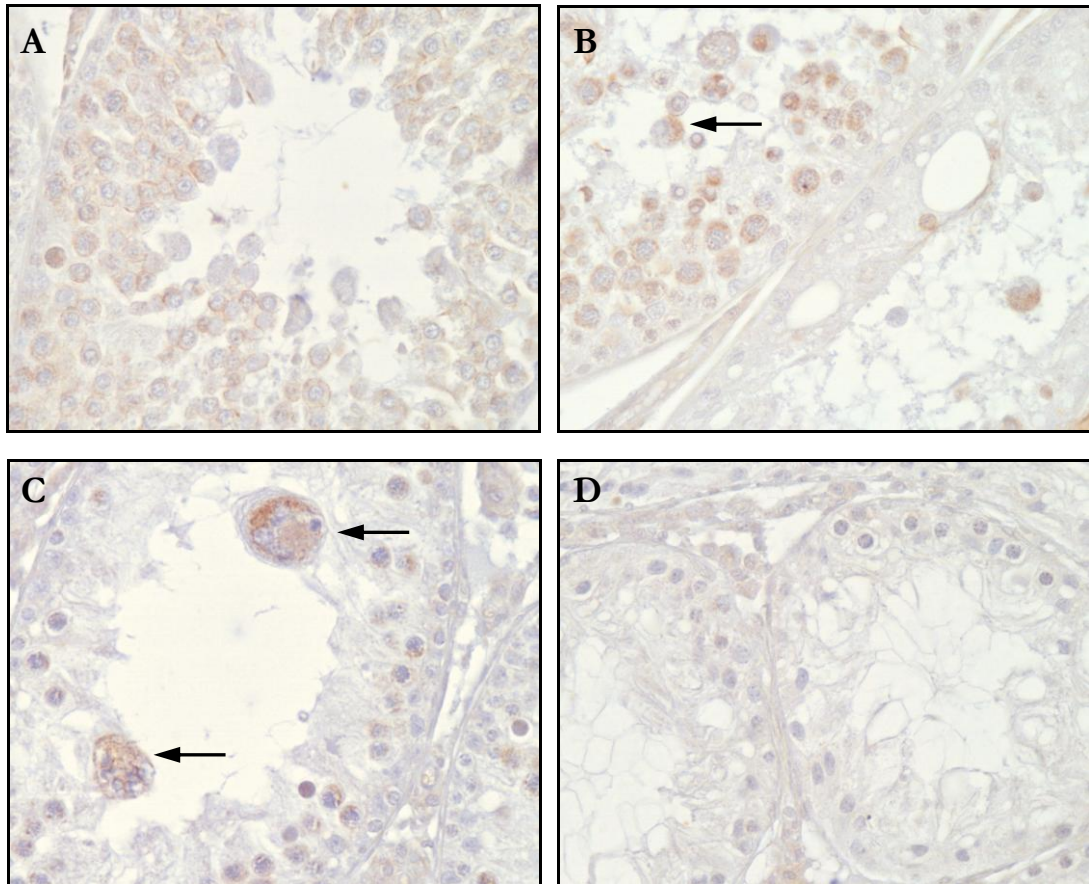
Expres P-cadherinu v semenotvorném kanálku kontrolních varlat se měnila podle stádia zárodečného epitelu. V průběhu spermatogeneze jsme P-cadherin detekovali v pachytenních spermatocytech v membráně, ale také v cytoplazmě ve formě gran při cytoplazmatické membráně – přibližně od stádia zárodečného epitelu I-III. Tato exprese byla pozorována v pachytenních spermatocytech až do stádia epitelu XI (**Obr. 24D – černá šipka**) a zůstala zachována i v diplotenních spermatocytech (XII-XIII). Po ukončení meiotického dělení došlo ke změně exprese P-cadherinu v kulatých spermatidách (I-VIII) a v elongujících se spermatidách (přibližně ve stádiu IX-XI), v nichž již byl P-cadherin exprimován v cytoplazmatické membráně (**Obr. 24C, 24D – červené šipky**). Expresi P-cadherinu jsme pozorovali také v elongovaných spermatidách (stádium I-VIII). V intersticiální tkáni jsme slabou expresi P-cadherinu pozorovali v Leydigových buňkách.



Obrázek č. 24. Expres P-cadherinu v kontrolním varleti.

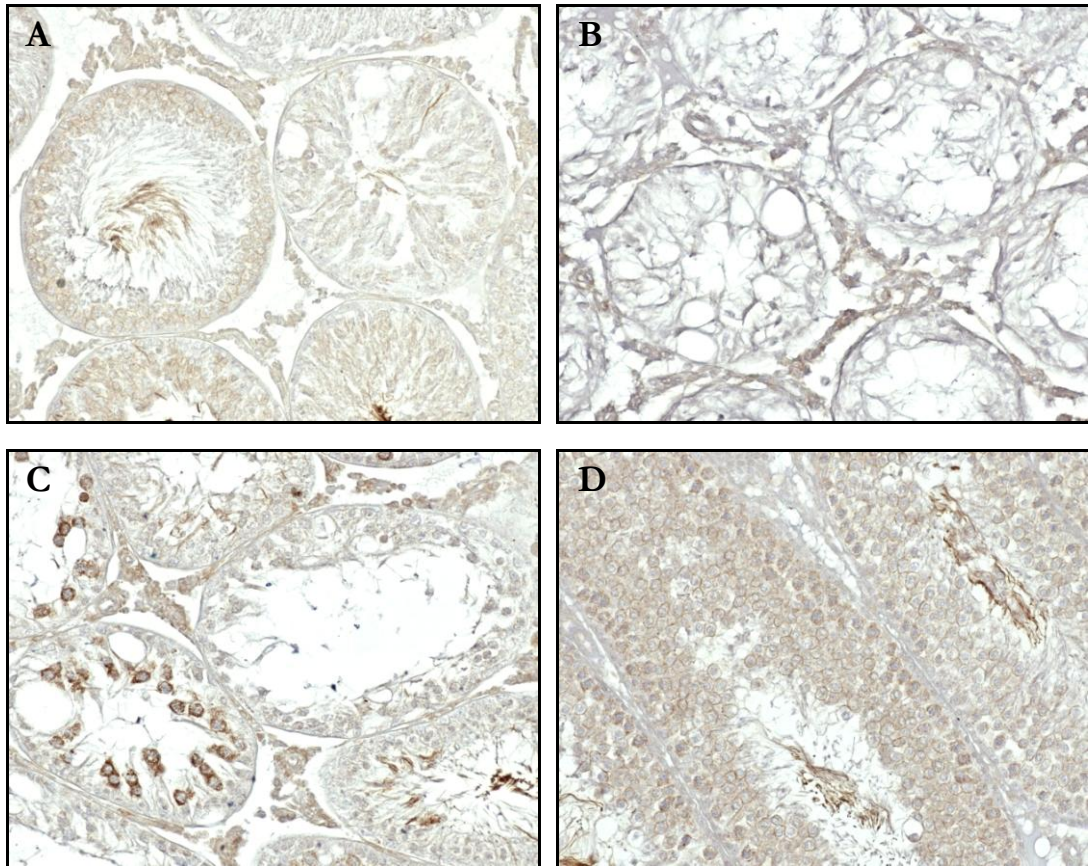
Dobarveno hematoxylinem, originální zvětšení (A, B) - 200×, (C, D) - 400×

Již po dvou dnech kryptorchismu jsme pozorovali změny v expresi P-cadherinu v zárodečném epitelu operovaného varlete. Expres zůstala zachována v zárodečných buňkách, které byly součástí epitelu. Vymizela ovšem ze spermatid, které byly (i částečně) odloučeny z epitelu (**Obr. 25A**). V dalších intervalech (3-11 dní), kdy se z epitelu odlučovaly také spermatocyty, zůstala expres v cytoplasmě odloučených spermatocytů stále zachována. V některých neodloučených spermatocytech dokonce zesílila (v cytoplasmě v okolí jádra). Expresi jsme v těchto intervalech pozorovali i v některých odloupaných spermatidách a multinukleárních útvech (**Obr. 25B, 25C - šipky**). V semenotvorných kanálcích, v nichž došlo k úplnému vymizení zárodečných buněk, se expres P-cadherinu zcela vytratila (**Obr. 25D**).



Obrázek č. 25. Expres P-cadherinu v kryptorchickém varleti – (A) 2 dny, (B, C) 5 dnů, (D) 22 dnů. Dobarveno hematoxylinem, originální zvětšení - 200×

Poškození zárodečného epitelu **busulfanem** rezultovalo v podobné změny v expresi P-cadherinu, jako jsme pozorovali v kryptorchických varlatech. Po aplikaci 1 dávky busulfanu jsme první změny pozorovali až 42 dní po aplikaci (vymizení z membrány spermatid, změny ve spermatocytech). Po aplikaci 2 dávek busulfanu byla exprese P-cadherinu v intervalech 7-28 dnů ovlivněna přítomností, resp. nepřítomností zárodečných buněk v zárodečném epitelu. Byly-li spermatocyty, resp. spermatidy, přítomny v epitelu, nadále jsme v nich byl P-cadherin detekovali jako v kontrolním varleti (**Obr. 26A**). V kanálcích, které byly nejvíce poškozeny a obsahovaly pouze Sertoliho buňky, příp. několik spermatogonií, jsme expresi P-cadherinu nepozorovali. V intervalech 21-42 dnů jsme pozorovali také nárůst exprese P-cadherinu v intersticiální tkáni (**Obr. 26B**).



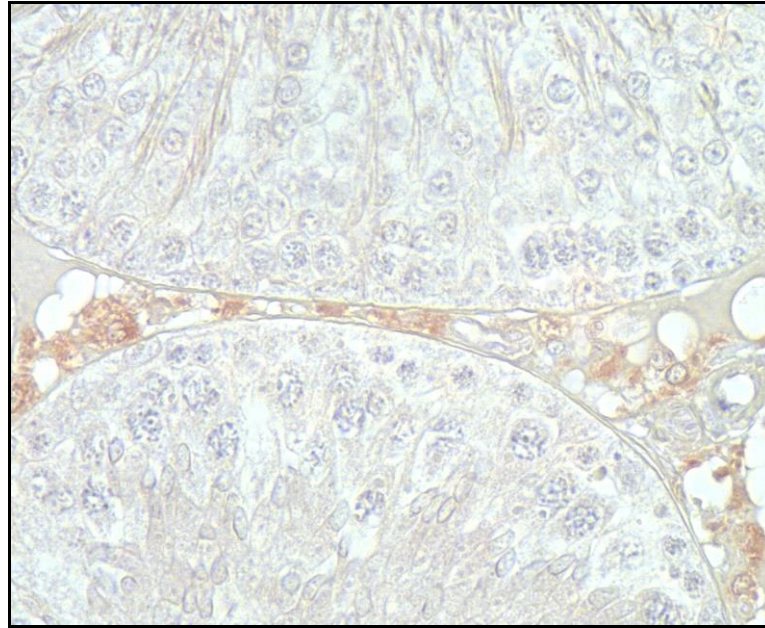
Obrázek č. 26. Expres P-cadherinu po aplikaci dvou dávek busulfanu

(A) 14 dnů, (B) 21 dnů, (C) 28 dnů, (D) 70 dnů. Dobarveno hematoxylinem, originální zvětšení - 200×

V posledních časových intervalech (28, 42 a 70 dnů) jsme zaznamenali postupnou obnovu zárodečného epitelu. Se znovuobjevením se nových spermatocytů se také znovu objevila exprese P-cadherinu v těchto semenotvorných kanálcích. Expres P-cadherinu v těchto spermatocytech byla velmi silná, nejprve v podobě gran v cytoplasmě (**Obr. 26C**), později i v membráně. Po objevení se prvních kulatých spermatid, se exprese P-cadherinu objevila v jejich membránách. S obnovou epitelu v intervalu 70 dní od aplikace 2. dávky busulfanu došlo také k obnovení stádium specifické exprese P-cadherinu a pouze v ojedinělých kanálcích, ve kterých nedošlo k obnově zárodečného epitelu, nebyla exprese P-cadherinu přítomna (**Obr. 26D**).

E-CADHERIN

E-cadherin byl exprimován pouze v intersticiální tkáni. (**Obr. 27**). V průběhu poškození varlat oběma přístupy nedošlo k výrazným změnám v jeho expresi. Pouze v experimentu s busulfanem (v intervalech 21-42 dnů po aplikaci 2. dávky busulfanu) jsme pozorovali nárůst exprese E-cadherinu, který odpovídal zvýšenému počtu Leydigových buněk v intersticiální tkáni.



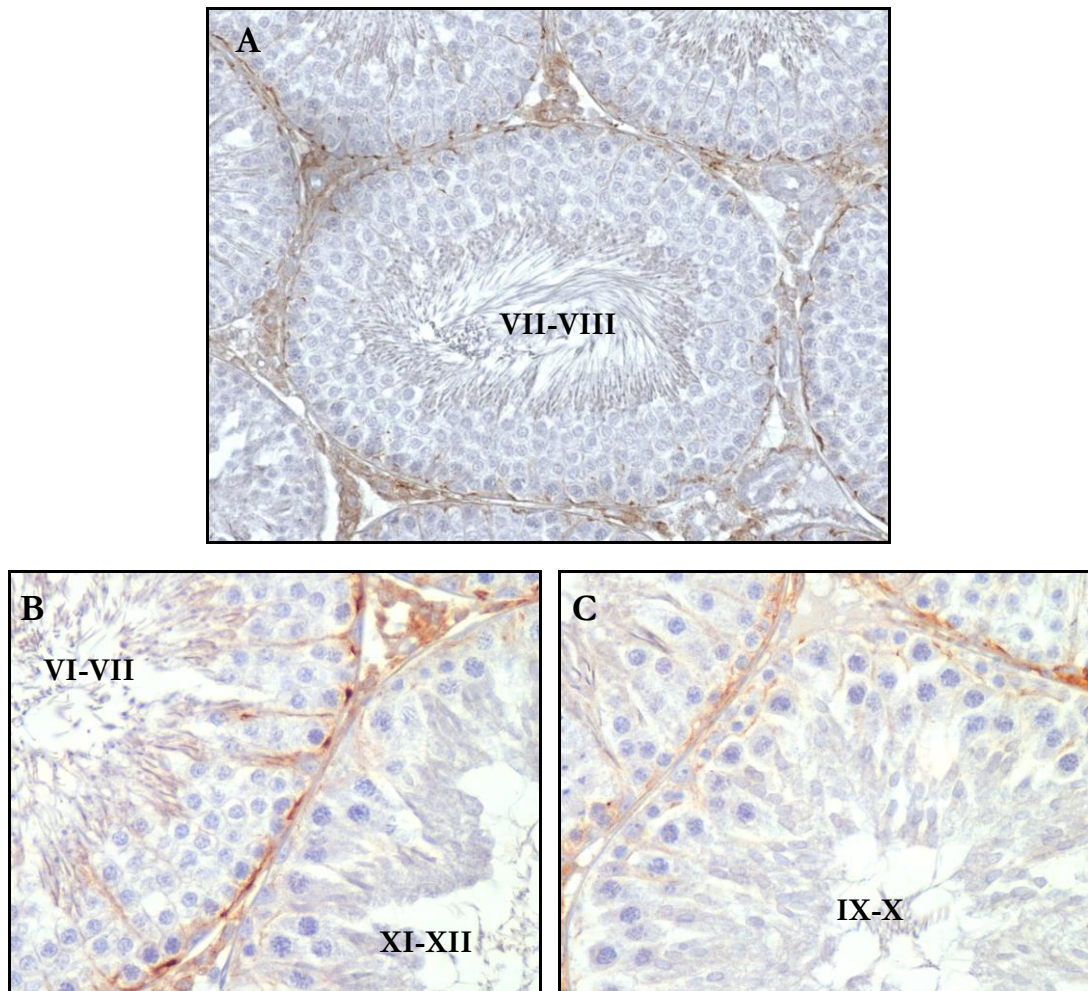
Obrázek č. 27. Exprese E-cadherinu v kontrolním varleti.

Dobarveno hematoxylinem, originální zvětšení 400×

NEXY

CONNEXIN 43

Connexin 43 byl exprimován převážně v bazálním kompartmentu semenotvorných kanálků mezi jednotlivými populacemi buněk – nejčastěji mezi Sertoliho buňkami a spermatogoniemi, Sertoli a Sertoliho buňkami a Sertoliho buňkami a spermatocyty. Výjimečně jsme expresi connexinu 43 pozorovali mezi pachytenními spermatocyty.

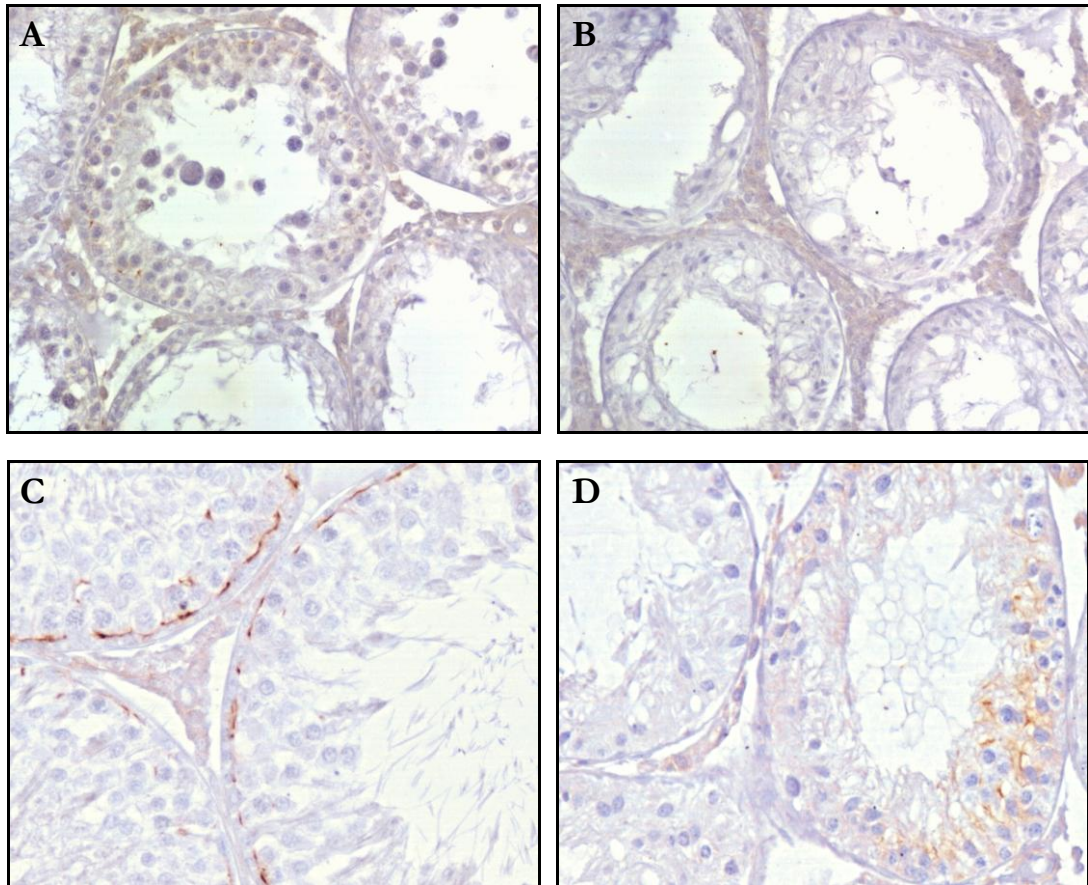


Obrázek č. 28. Expresie connexinu 43 v kontrolním varleti.

Dobarveno hematoxylinem, originální zvětšení (A) 100×, (B, C) 200×

Expresie connexinu 43 v semenotvorných kanálcích kontrolních varlat byla závislá na stádiu zárodečného epitelu. Ve stádiích I - III byla pozorována slabá nebo žádná exprese, přibližně od stádia IV jsme pozorovali expresi connexinu 43 v bazálním kompartmentu zárodečného epitelu. Nejsilnější exprese se nacházela v epitelu ve stádiích

VII – VIII (**Obr. 28A, 28B**). Následovalo rychlé vymizení connexinu 43 – ve stádiích IX a X jsme pozorovali pouze stopy exprese connexinu 43. Od stádia XI do stádia XIV již epitel nevykazoval takřka žádnou nebo pouze slabou expresi connexinu 43 (**Obr. 28B, 28C**). Ve všech vzorcích varlat jsme connexin 43 detekovali také v intersticiu mezi semenotvornými kanálky. Exprese byla hojná zejména v Leydigových buňkách, na druhou stranu takřka nulovou expresi connexinu 43 jsme zaznamenali v cévních strukturách.



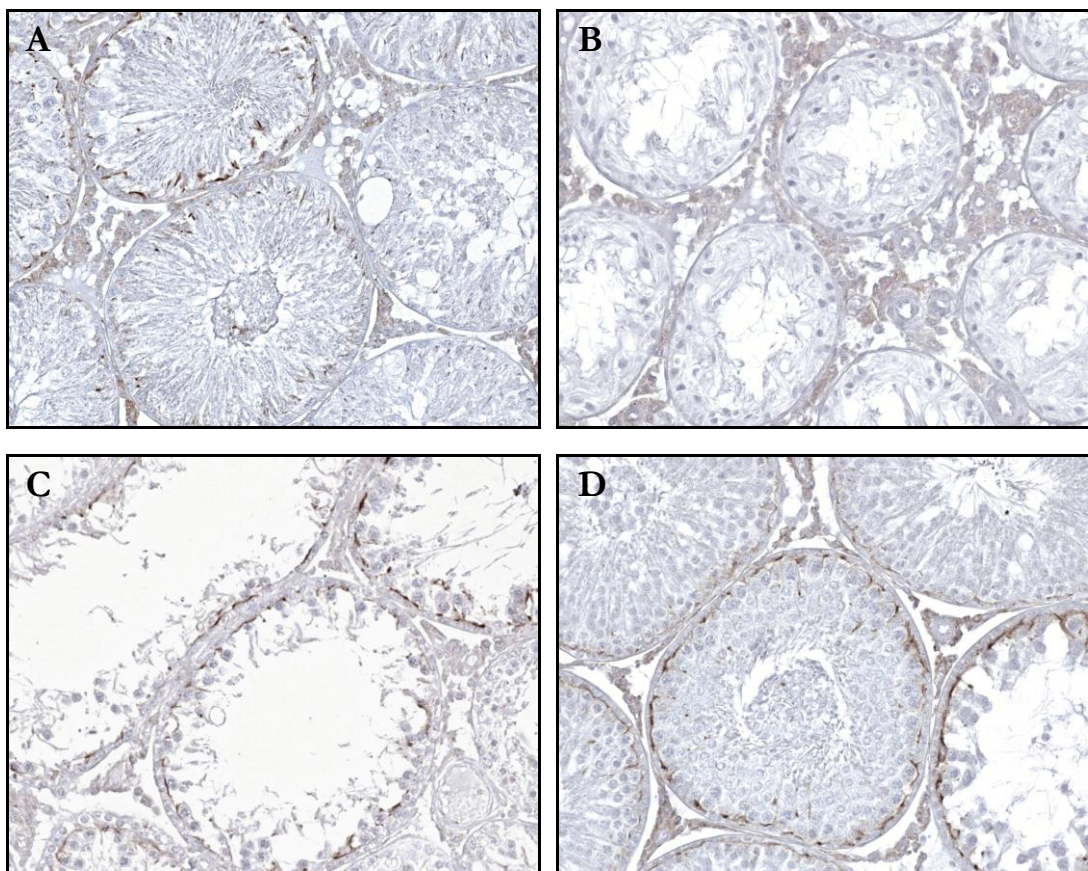
Obrázek č. 29. Exprese connexinu 43 v kryptorchickém varleti

(**A**) 5 dnů, (**B**) 85 dnů, (**C**) 3 dny, (**D**) 85 dnů. Dobarveno hematoxylinem, originální zvětšení – (A, B) - 200×, (C, D) - 400×

Ačkoliv došlo již po 2 dnech trvání **kryptorchismu** k odlučování prvních buněk ze zárodečného epitelu, exprese connexinu 43 v bazálním kompartmentu zárodečného epitelu nebyla ovlivněna (**Obr. 29C**). Jakmile v zárodečném epitelu došlo k odlučování spermatocytů, exprese connexinu 43 v těchto kanálcích poklesla a následně úplně zmizela. V ostatních kanálcích byl connexin 43 exprimován nadále podle stádia epitelu. Takto různorodou expresi jsme pozorovali zejména v intervalech 3-11 dnů, v nichž byl

zárodečný epitel různou měrou poškozen (**Obr. 29A**). Při dlouhém kryptorchismu (22-121 dní) byl již connexin exprimován pouze v intersticiální tkáni, výjimečně v poškozených semenotvorných kanálcích (**Obr. 29B, 29D**).

U zvířat, jimž byl aplikován **busulfan** (jedna dávka), byl connexin 43 exprimován v bazálním kompartmentu semenotvorných kanálků, ačkoliv v nich při bazální membráně často chyběly spermatogonie. Snížená exprese ovšem byla kolem vakuolizovaných Sertoliho buněk. Větší změny jsme pozorovali až od okamžiku, kdy došlo k postupnému vymizení spermatocytů z epitelu - v intervalu 21 dnů a ve větším množství 42 dní po aplikaci.



Obrázek č. 30. Exprese connexinu 43 ve varleti po aplikaci dvou dávek busulfanu

(A) 14 dnů, **(B)** 21 dnů, **(C)** 28 dnů, **(D)** 70 dnů. Dobarveno hematoxylinem,

originální zvětšení - 200×

Podobný dynamický vývoj změn exprese jsme pozorovali po aplikaci 2 dávek busulfanu. Snížená exprese connexinu 43 byla přítomna pouze v několika nejpoškozenějších kanálcích v intervalech 7 a 14 dnů od aplikace 2. dávky (**Obr. 30A**).

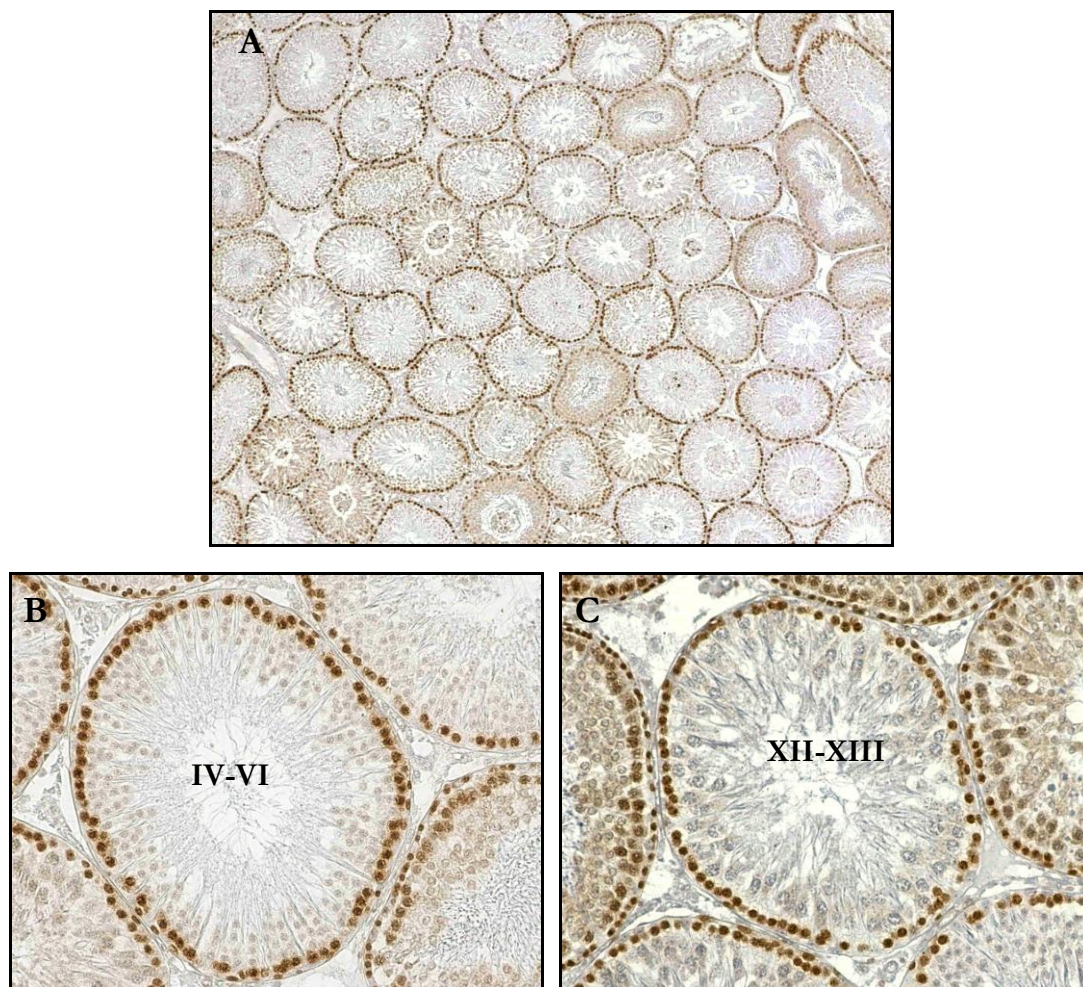
Výjimečně byla také pozitivita pro connexin 43 nalezena v odloupaných částech epitelu uvnitř lumen kanálků. U zvířat, která nejvíce zareagovala na podání busulfanu v intervalech 21 a 28 dní (v epitelu pouze Sertoliho buňky), došlo ke kompletnímu vymizení exprese connexinu 43 v zárodečném epitelu kanálků varlete. Exprese connexinu 43 v intersticiu zůstala nezměněná (**Obr. 30B**).

S postupnou obnovou zárodečného epitelu semenotvorných kanálků se také znovu objevila exprese connexinu 43 v zárodečném epitelu. V kanálcích, jejichž epitel obsahoval pouze spermatogonie a jednu řadu spermatocytů mezi Sertoliho buňkami při bázi kanálků, jsme pozorovali expresi connexinu 43 mezi jednotlivými buňkami a také na jejich apikálním konci odhaleném do lumen kanálků a nesousedícím s další buňkou (**Obr. 30C**). V posledním časovém intervalu jsme zaznamenali takřka úplnou obnovu zárodečného epitelu a došlo také ke znovunastolení stádium specifické exprese connexinu 43. V ojedinělých kanálcích, v nichž nedošlo k obnově zárodečného epitelu, exprese connexinu 43 přítomna nebyla (**Obr. 30D**).

PROHIBITIN, PCNA, TUNEL

KONTROLNÍ SKUPINY

PCNA pozitivita byla v zárodečném epitelu spojena s mitoticky se dělicími spermatogoniemi ve všech stádiích zárodečného epitelu. PCNA aktivitu jsme též zaznamenali u některých forem primárních spermatocytů - leptotenní, zygotenní a pachytenní spermatocyty (**Obr. 31**).

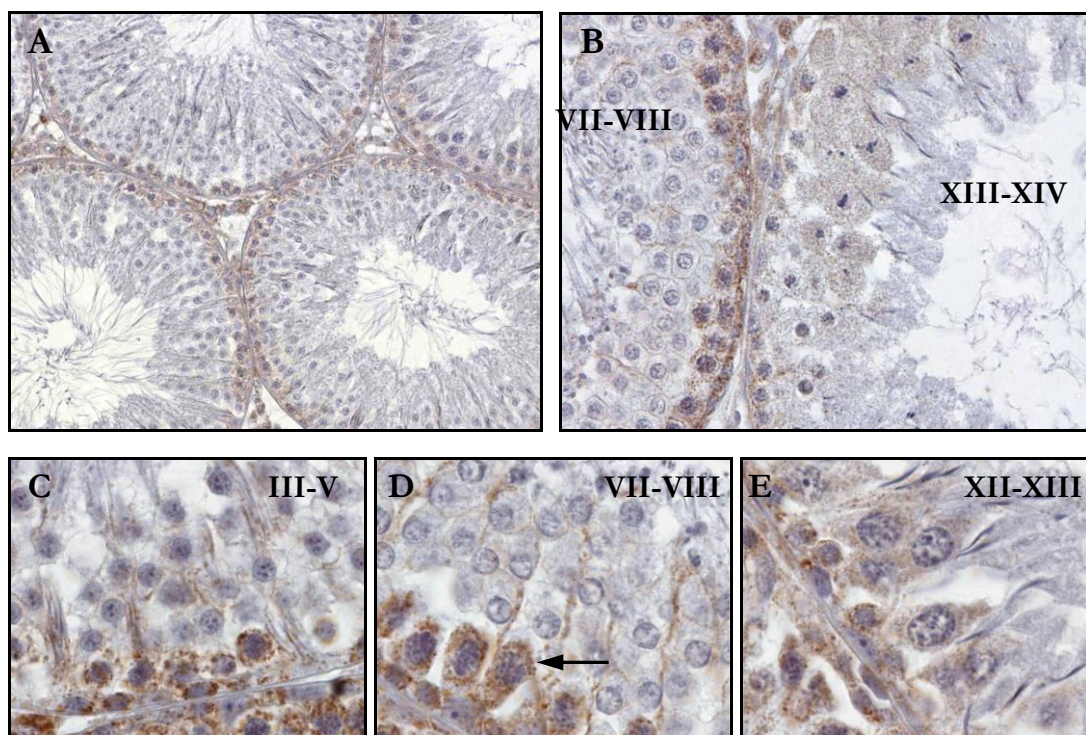


Obrázek č. 31. Expres PCNA v kontrolním varleti. Dobarveno hematoxylinem, originální zvětšení (A) 40×, (B, C) - 200×

U pachytenních spermatocytů se PCNA pozitivita postupně snižovala a diplotenní spermatocyty již žádnou PCNA pozitivitu neměly (**Obr. 31C**). Slabou PCNA pozitivitu v jádře i v cytoplazmě vykazovaly spermatidy v akrosomální fázi spermatohistogeneze. Jádra Sertoliho buněk byla vždy PCNA negativní. Kromě buněk zárodečné linie byla slabší proliferační aktivita pozorována též v Leydigových buňkách

v intersticiu a peritubulárních myoidních buňkách (**Obr. 31B, 31C**). V epitelu kanálků nadvarlete jsme našli menší počet PCNA pozitivních buněk. Dozrávajících spermatozoa v lumen kanálků byla vždy PCNA negativní.

Jako druhý proliferační marker jsme chtěli využít také **Ki-67**, ale ani jedna ze dvou námi zkoušených protilátek (králíčí polyklonální protilátka LabVision-NeoMarkers, Fremont, USA, kat. č. RB-081 Ab-3; myši monoklonální protilátka, klon MIB-5, DAKOCytomation, Carpenteria, USA) nebyla vhodná pro naše experimentální podmínky.

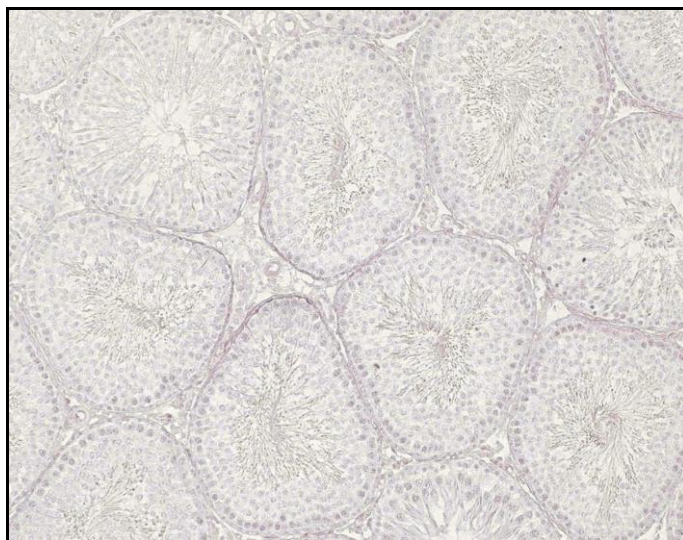


Obrázek č. 32. Expresе prohibitinu v kontrolním varleti. Dobarveno hematoxylinem, originální zvětšení (A) 200×, (B) - 400×, (C, D, E) - 1000×

Expresе **prohibitinu (PHB)** v zárodečném epitelu v jednotlivých populacích zárodečných buněk byla závislá na spermatogenním cyklu epitelu. PHB byl exprimován přednostně v cytoplasmě ve formě granul. PHB byl stále exprimován v bazálním kompartmentu Sertoliho buněk s nejsilnější pozitivitou ve stádiích V-X a nejnižší mezi stádií XIII-II. Apikální výběžky Sertoliho buněk byly slabě pozitivní ve stádiích I-VIII. Silnější pozitivita byla ovšem přítomna v buňkách zárodečných. Ve spermatogoniích jsme nejvyšší expresi pozorovali ve stádiích V-XII, preleptotenní spermatocyty byly také prohibitin pozitivní (VII-VIII) a expresе PHB postupně rostla v leptotenních a zygotenních spermatocytech. Nejsilnější pozitivitu v zárodečném epitelu jsme detekovali v pachytenních spermatocytech jako granula uspořádaná v cytoplasmě kolem jader

(Obr. 32D – šipka). V diplotenních spermatocytech jsme pozorovali opět pokles aktivity PHB (**Obr. 32B, 32E**) a žádná pozitivita nebyla nalezena ve spermatidách. V intersticiální tkáni mezi kanálky varlete byly nejvíce pozitivní Leydigovy buňky. Ostatní typy buněk vykazovaly nižší pozitivitu.

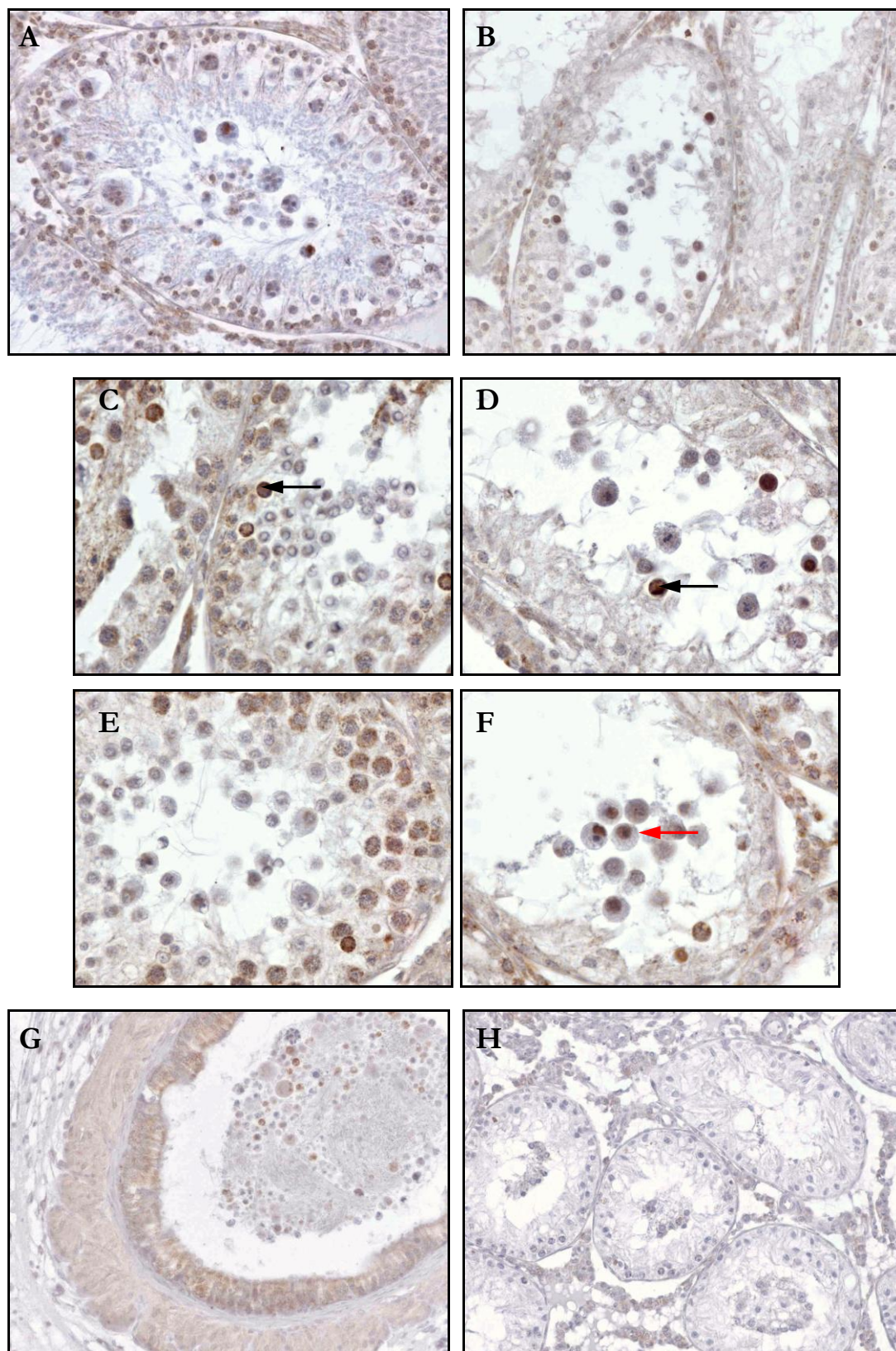
Ačkoliv v průběhu spermatogeneze podléhá apoptóze velké množství zárodečných buněk, žádné **TUNEL** pozitivní buňky jsme v kontrolních varlatech nenalezli (**Obr. 33**).



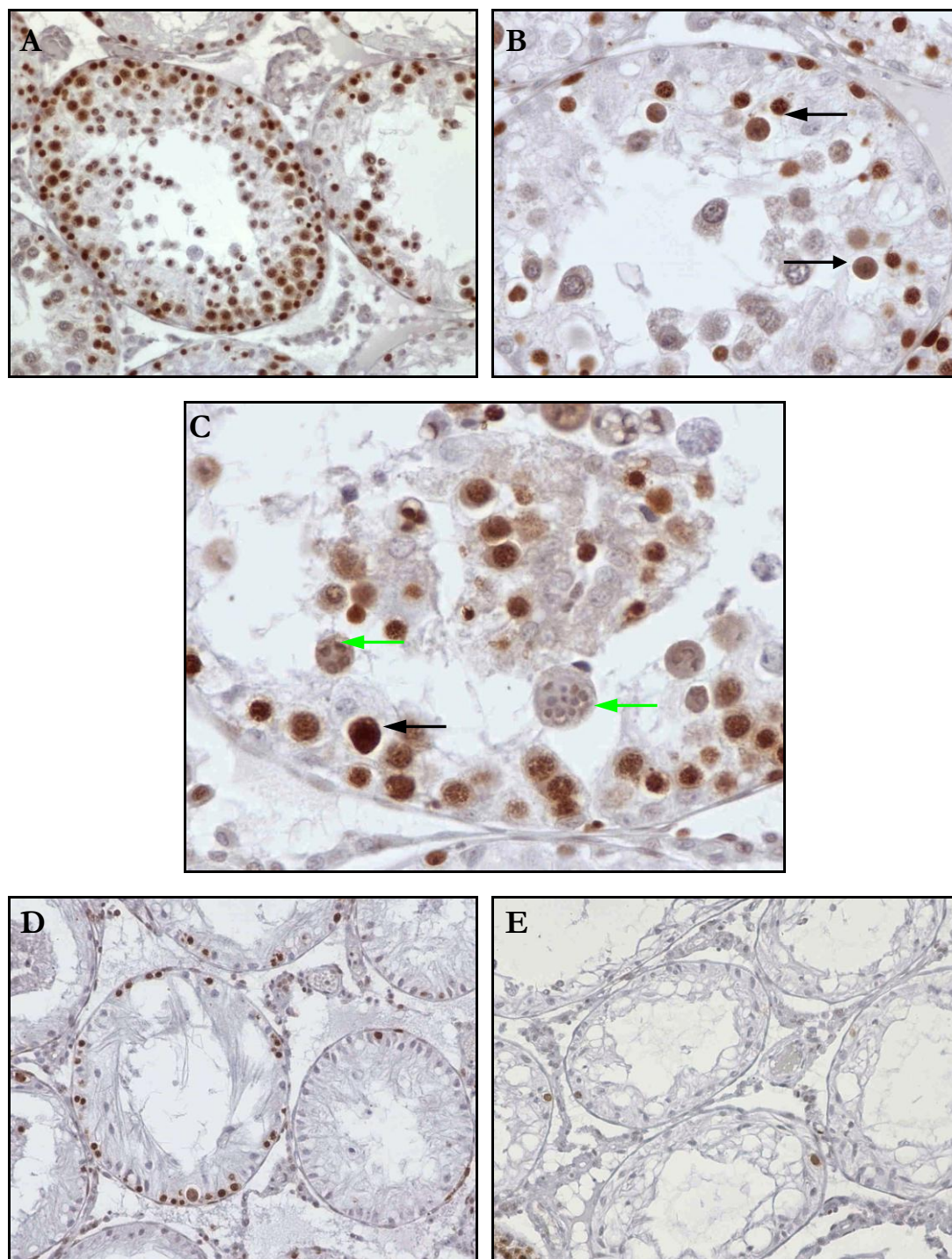
Obrázek č. 33. TUNEL v kontrolním varleti. Dobarveno hematoxylinem, originální zvětšení 100×

EXPRESSE PROHIBITINU A PCNA, TUNEL VE VARLATECH KRYPTORCHIZOVANÝCH ZVÍŘAT

První změny v expresi PHB a PCNA a první TUNEL pozitivní buňky v zárodečném epitelu jsme pozorovali v několika kanálcích již po 2 dnech kryptorchismu. Tyto změny progredovaly v intervalech 3, 5 a 11 dnů. Pozorovali jsme snížení exprese PHB v Sertoliho buňkách, v nichž se objevily vakuoly (**Obr. 34A**). Od 3. dne se v zárodečném epitelu vedle primárních spermatocytů s nezměněnou nebo sníženou expresí PHB objevovaly také velmi silně PHB pozitivní spermatocyty (**Obr. 34B, 34C, 34D - šipky**) s pozitivitou nejen v cytoplazmě, ale v některých buňkách i v jádrech. Největší počet takovýchto buněk byl přítomen v intervalu 5 dní. Pozitivita v jádrech neměla podobu gran, ale byla rozprostřena v celém jádře.



Obrázek č. 34. Expresе prohibitinu v kryptorchickém varleti a nadvarleti (A) 3 dny, (B, C, D, E, F) 5 dnů, (G) nadvarle – 5 dnů, (H) 11 dnů. (šipky viz. text) Dobarveno hematoxylinem, originální zvětšení (H) - 100×, (A, B, G) – 200×, (C, D, E, F) - 400×



Obrázek č. 35. Exprese PCNA v kryptorchickém varleti. (A, B, C) 5 dnů, (D) 22 dnů, (E) 85 dnů. (šipky viz. text.) Dobarveno hematoxylinem, originální zvětšení (A, D, E) - 200×, (B, C) - 400×

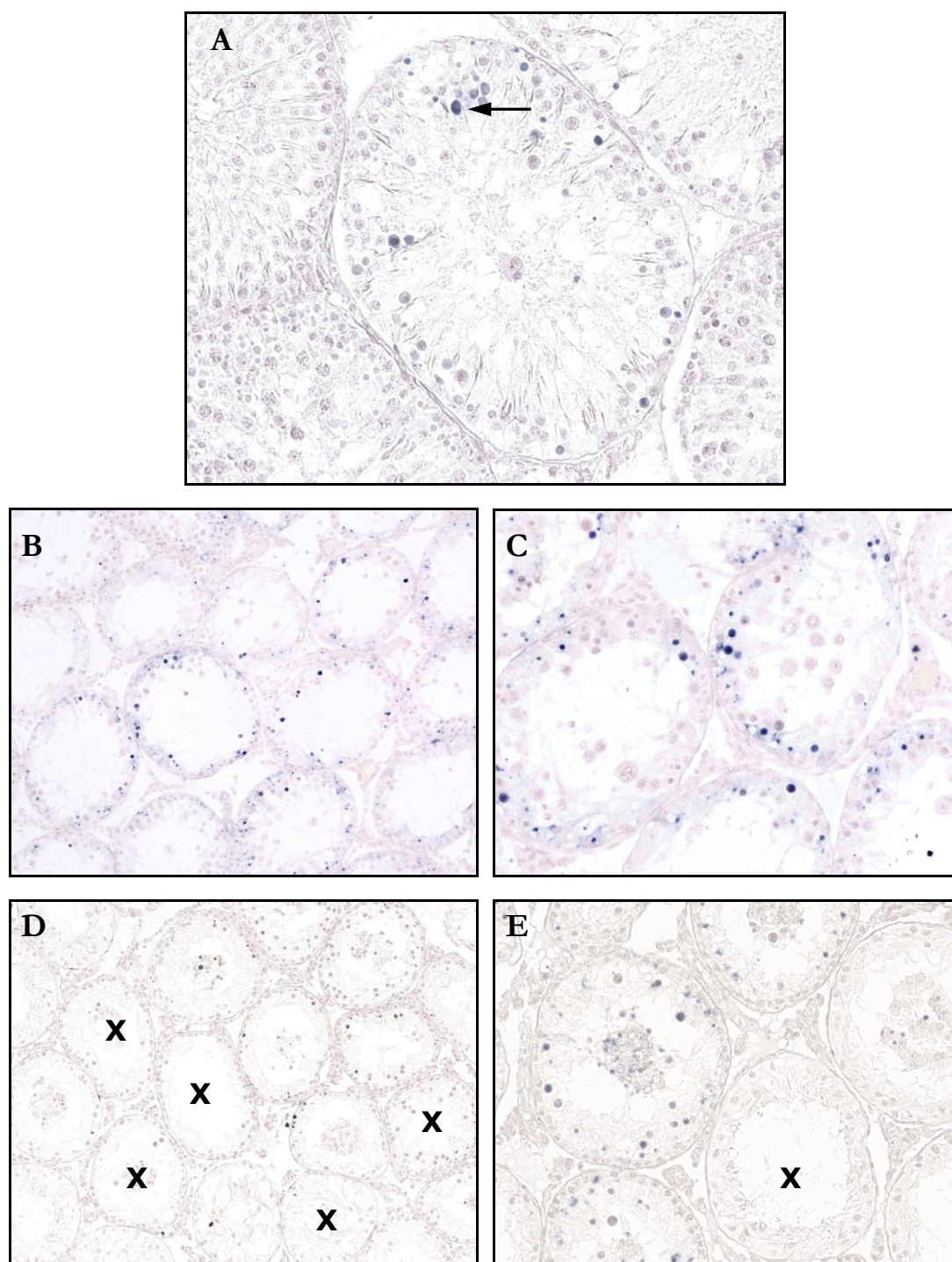
Některé spermatocyty v poškozeném zárodečném epitelu vykazovaly nápadně vyšší expresi PCNA než ostatní zárodečné buňky v epitelu (**Obr. 35B, 35C - černé šipky**). Na základě porovnání sousedních řezů jsme zjistili, že PHB a PCNA silně pozitivní buňky nejsou totožné. Naopak, PHB silně pozitivní (v jádrech) buňky postupně ztrácely cytoplazmatickou PHB pozitivitu, jadernou PCNA pozitivitu a byly TUNEL pozitivní.

V semenotvorných kanálcích s progredujícím poškozením jsme našli také silně PCNA pozitivní buňky, a to odloučené spermatocyty v lumen kanálků. Zatímco v celistvém zárodečném epitelu byla PCNA pozitivní pouze jádra, v odloučených buňkách vykazovalo PCNA pozitivitu jádro i cytoplazma. Zaznamenali jsme také výskyt multinukleárních buněk, jejichž některá jádra byla PCNA pozitivní, zatímco jiná nikoliv (**Obr. 35C – zelené šipky**). Cytoplazmatická a v menší míře i nukleární PHB pozitivita byla nalezena také v některých odloučených buňkách i v multinukleárních útvarech (exprese PHB v těchto útvarech byla podobně heterogenní jako exprese PCNA) (**Obr. 34E, 34F – červená šipka**). PCNA a PHB aktivita přetrvávala v odloučených buňkách i v průběhu jejich postupu kanálky nadvarlete (**Obr. 34G**).

PHB i PCNA pozitivita zůstala nezměněná v Sertoliho a v zárodečných buňkách v kanálcích s dosud normálně probíhající spermatogenezí. Jejich exprese v intersticiální tkáni, zejména v Leydigových buňkách, a v buňkách epitelu kanálků nadvarlete se nelišila od kontrolních zvířat.

Primární spermatocyty byly prvními TUNEL pozitivními buňkami v zárodečném epitelu varlete od 2. dne kryptorchismu (**Obr. 36A**). Největší množství TUNEL pozitivních zárodečných buněk, spermatogonií a spermatocytů, jsme pozorovali v intervalech 5 až 11 dnů. V těchto intervalech jsme TUNEL pozitivní buňky detekovali téměř ve všech semenotvorných kanálcích (**Obr. 36B, 36C**).

V intervalech 22-120 dnů zůstala slabá exprese PHB přítomna pouze v některých Sertoliho buňkách kryptorchických varlat. Pokud byly v epitelu stále ještě přítomny spermatogonie a spermatocyty, byla i v nich nalezena exprese PHB - slabší intenzita v podobě gran v cytoplazmě. Jaderná PHB exprese byla přítomna výjimečně v několika spermatocytech pouze v intervalu 22 dnů. Exprese ve zbytcích odloučených zárodečných buněk v lumen kanálků byla slabší než v předchozích intervalech ale s podobnou charakteristikou. Velmi slabá exprese PHB byla přítomna v Sertoliho buňkách v kanálcích bez přítomnosti zárodečných buněk. Exprese PHB v Leydigových buňkách nebyla kryptorchismem ovlivněna (**Obr. 34H**).



Obrázek č. 36. TUNEL v kryptorchickém varleti.

(A) 3 dny, (B, C) 5 dnů, (D, E) 22 dnů. X = TUNEL negativní kanálky.

Dobarveno hematoxylinem, originální zvětšení (B, D) - 100×, (A, C, E) - 200×

Přítomnost PCNA pozitivních buněk v zárodečném epitelu byla závislá na stavu zárodečného epitelu. Aktivita PCNA zůstala zachována ve spermatogoniích i spermatocytech přítomných v zárodečném epitelu i ve dlouhých intervalech kryptorchismu, pokud byly stále součástí epitelu. Zbytkovou PCNA pozitivitu jsme pozorovali v buňkách odloučených z epitelu, ale v menším množství a se slabší intenzitou než v krátkých intervalech. Žádná PCNA pozitivní buňka nebyla nalezena v tubulech, v nichž zůstaly pouze Sertoliho buňky (**Obr. 35D, 35E**).

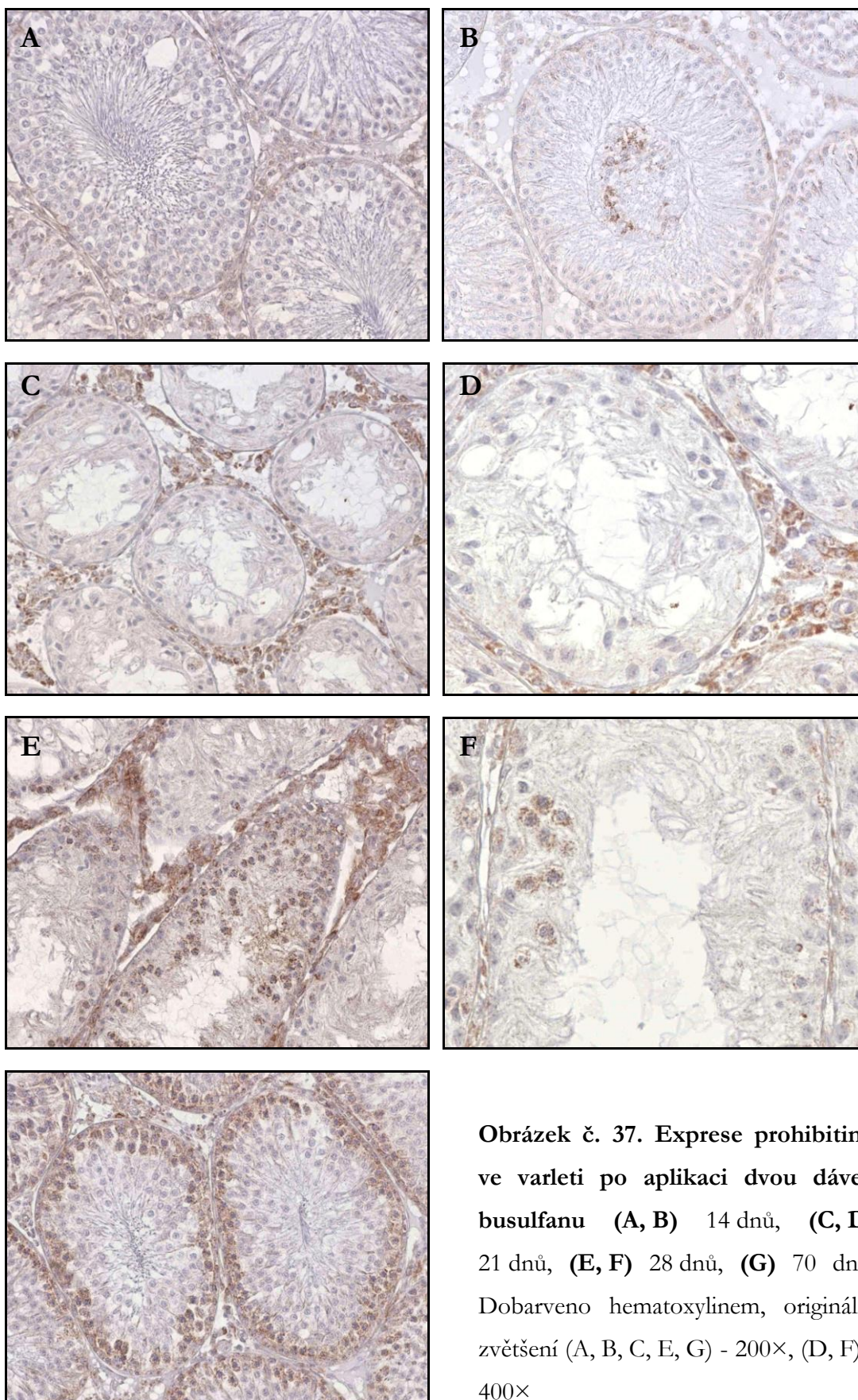
Výskyt TUNEL pozitivních spermatocytů a spermatogonií postupně klesal s tím, jak zárodečné buňky ubývaly z epitelu. Od intervalu 22 dnů se již nacházely ve tkáni varlat semenotvorné kanálky, v nichž nebyly přítomny žádné TUNEL pozitivní buňky. V těchto kanálcích byl zárodečný epitel tvořen pouze Sertoliho buňkami (**Obr. 36D, 36E**).

Neoperovaná skrotální varlata

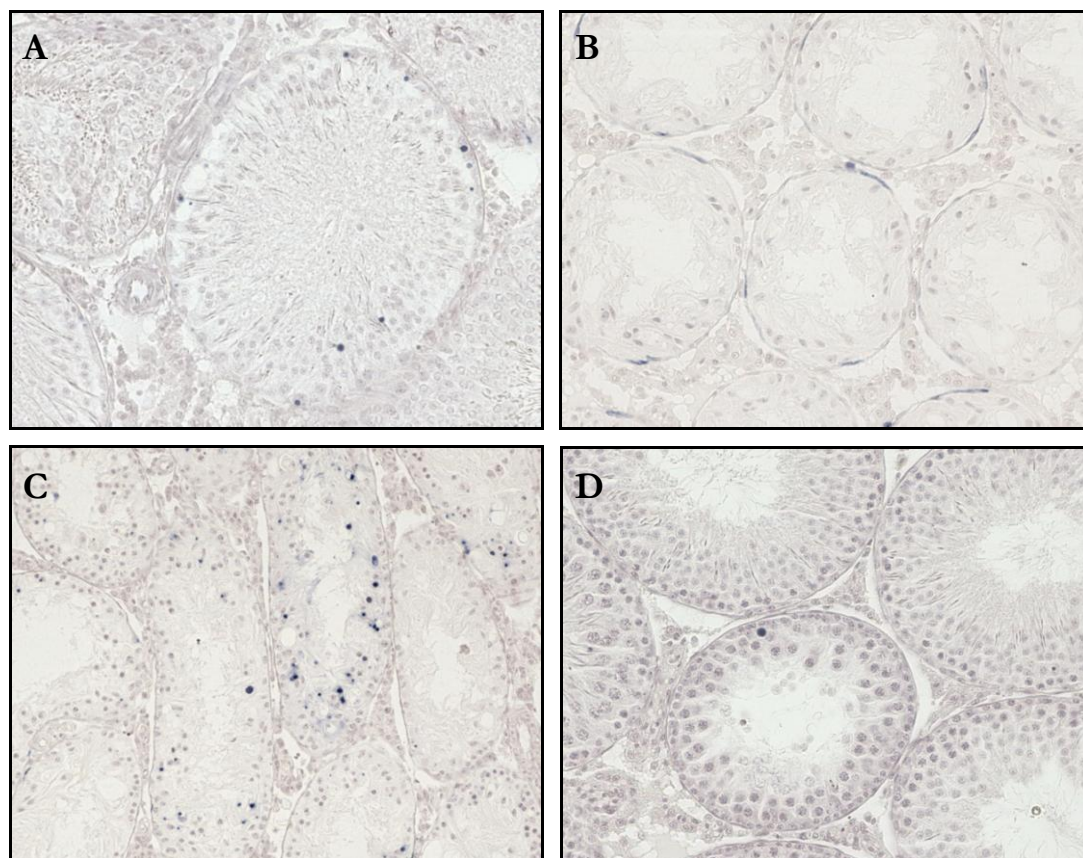
Žádné změny v expresi PHB a PCNA a minimální množství TUNEL pozitivních buněk (tři) jsme našli v neoperovaných skrotálních varlatech.

EXPRESE PROHIBITINU A PCNA, TUNEL VE VARLATECH PO APLIKACI BUSULFANU

Expresie prohibitinu poklesla v Sertoliho i zárodečných buňkách, které byly součástí zárodečného epitelu, již v intervalech 21 dní po aplikaci 1 dávky busulfanu a 7 dní po druhé injekci busulfanu (**Obr. 37A**). Expresi PHB jsme pozorovali také v zárodečných buňkách (spermatocytech) odloučených ze zárodečného epitelu do lumen semenotvorného kanálku (**Obr. 37B**). V dalších intervalech již prohibitin z buněk tvořících zárodečný epitel téměř zcela vymizel, především v kanálcích, které byly tvořeny pouze Sertoliho buňkami - intervaly 21 a 28 dnů. PHB byl ve varlatech zvířat z těchto skupin stále přítomen v intersticiální tkáni – v Leydigových buňkách i v dalších typech buněk (**Obr. 37C, 37D**).



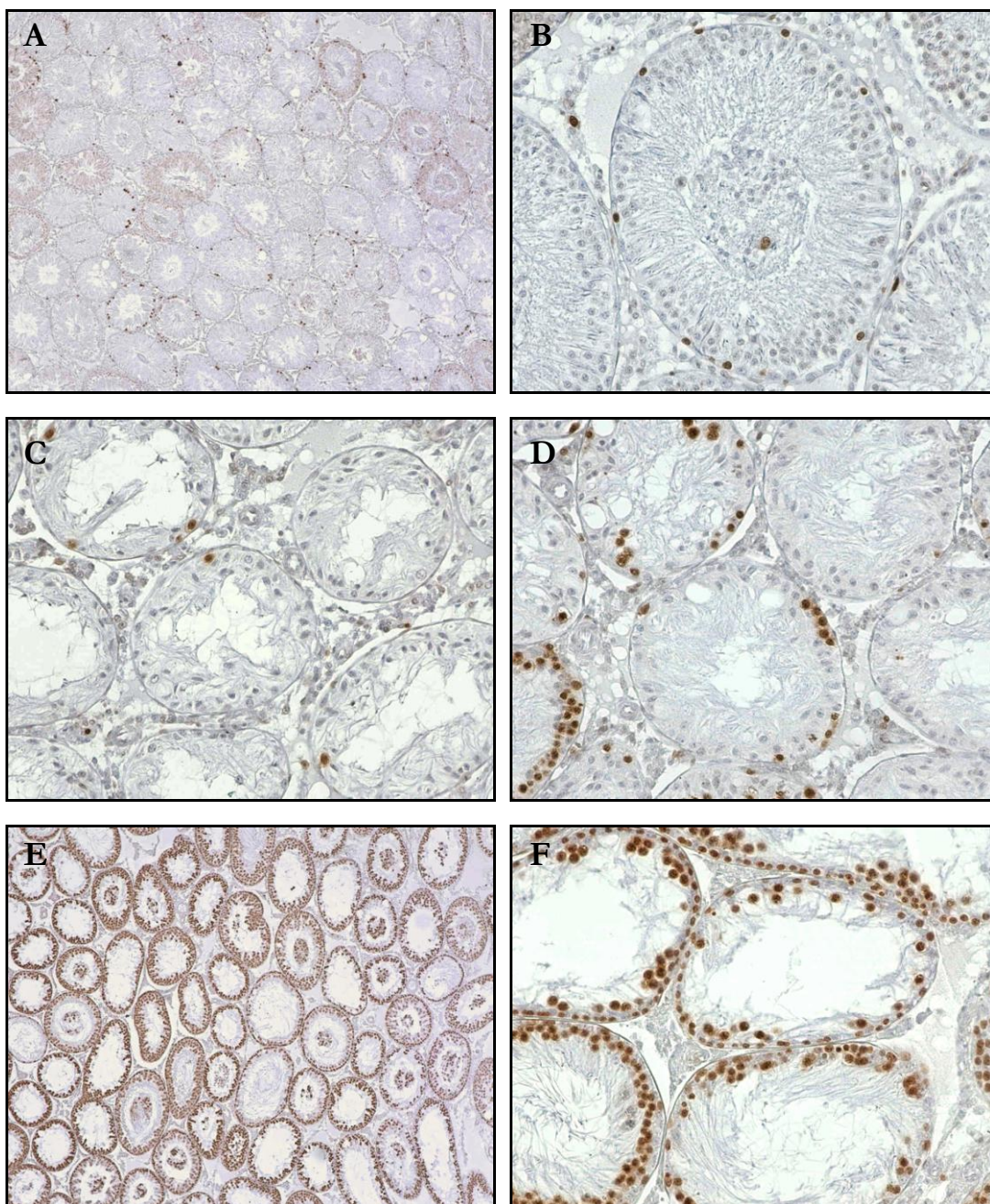
Obrázek č. 37. Expresе prohibitinu ve varleti po aplikaci dvou dávek busulfanu (A, B) 14 dnů, (C, D) 21 dnů, (E, F) 28 dnů, (G) 70 dnů. Dobarveno hematoxylinem, originální zvětšení (A, B, C, E, G) - 200×, (D, F) - 400×



Obrázek č. 38. TUNEL ve varleti po aplikaci dvou dávek busulfanu.
(A) 7 dnů, **(B)** 21 dnů, **(C)** 42 dnů, **(D)** 70 dnů. Dobarveno hematoxylinem,
originální zvětšení 200×

Malý počet TUNEL pozitivních buněk v zárodečném epitelu jsme našli ve skupinách 21 a 42 dnů po aplikaci jedné dávky a 7 a 14 dnů po aplikaci dvou dávek busulfanu pouze sporadicky v několika kanálcích. TUNEL pozitivní spermatogonie jsou demonstrovány v semenotvorném kanálku na **Obr. 38A**. V intervalech s nejvíce poškozeným zárodečným epitelem (Sertoliho buňky bez přítomnosti zárodečných buněk) jsme pozorovali TUNEL pozitivní peritubulární myoidní buňky (**Obr. 38B**).

PCNA aktivita poklesla v zárodečných buňkách stejně rychle jako exprese PHB a zůstala zachována pouze v několika spermatogoniích a spermatocytech, které zůstaly při bazální membráně zárodečného epitelu (**Obr. 39A, 39B**). V nejpoškozenějších semenotvorných kanálcích varlat byly díky jejich PCNA pozitivitě velmi dobře



Obrázek č. 39. Expres PCNA ve varleti po aplikaci dvou dávek busulfanu (A, B) 7 dnů, (C) 21 dnů, (D) 28 dnů, (E, F) 42 dnů. Dobarveno hematoxylinem, originální zvětšení (A, E) - 40×, (B, C, D, F) - 200×

rozlišitelné přeživší kmenové spermatogonie při bazální membráně, často pouze 1 buňka v průřezu kanálkem (**Obr. 39C**). PCNA pozitivitu těchto spermatogonií (společně s pozorováním mitotického dělení těchto buněk - **Obr. 9C**) lze považovat za důkaz toho, že díky proliferačnímu potenciálu těchto nejodolnějších buněk dochází

v pozdějších intervalech ke znovunastartování spermatogeneze. Na rozdíl od PHB, aktivita PCNA nebyla pozorována v odloupaných zárodečných buňkách.

S tím, jak od 28. dne docházelo k postupné obnově spermatogeneze, se postupně obnovovala také exprese PHB v nových zárodečných buňkách i v Sertolihových buňkách. Nejlépe byla obnova PHB aktivity (jako granula v cytoplazmě) pozorovatelná v primárních spermatocytech, které se ve skupinách začaly objevovat v některých semenotvorných kanálcích již v intervalu 28 dní (**Obr. 37E, 37F**). 70 dní po aplikaci druhé dávky busulfanu byla již exprese PHB v obnoveném zárodečném epitelu závislá na stádiu epitelu stejně jako u kontrolních zvířat (**Obr. 37G**).

Zajímavým nálezem byl výskyt poměrně vysokého počtu TUNEL pozitivních buněk v některých semenotvorných kanálcích (v intervalech 28 a 42 dnů po druhé dávce busulfanu). V těchto kanálcích byly TUNEL pozitivní především spermatocyty (**Obr. 38C**). Jejich počet se opět snížil v semenotvorných kanálcích varlat zvířat z posledního intervalu (70 dnů po podání druhé dávky) (**Obr. 38D**).

Obnova PCNA aktivity korelovala s postupným objevením se spermatogonií a prvních generací spermatocytů v zárodečném epitelu. Nejprve se při bazální membráně objevily skupiny PCNA pozitivních spermatogonií (**Obr. 39D**) a poté zaujaly postupně přibývajících zárodečné buňky (nové spermatogonie a spermatocyty) svá místa mezi Sertolihovými buňkami (**Obr. 39E, 39F**). V intervalu 70 dní po aplikaci busulfanu byla v kanálcích s kompletní spermatogenezí exprese PCNA stejná jako u kontrolních zvířat.

V ireverzibilně poškozených kanálcích varlat ze skupiny 70 dnů po podání druhé dávky byla pozorována pouze nízká exprese PHB a žádná PCNA pozitivní buňka v zárodečném epitelu.

DISKUSE

V současné populaci se stále zvyšuje počet mužů se sníženou fertilitní schopností. Příčinou je přítomnost různých poruch spermatogeneze s přítomností degenerativních změn varlat. K těmto změnám může docházet vlivem genetických predispozic, některých patologických stavů, výskytu různých polutantů v životním prostředí i vlivem současného životního stylu (stres, kouření, alkohol, léky,...) apod. (Baker et al. 2000; Sharpe 2000).

Patologické změny varlete jsou výsledkem dějů odehrávajících se na molekulární úrovni. V experimentu, kdy experimentálním zvířetem byl potkan kmene Wistar, jsme porovnávali vliv modelového xenobiotika - busulfanu a vliv operativně navozeného jednostranného kryptorchismu (přesun varlete ze šourku do břišní dutiny) na morfologický obraz tkáně varlete potkana (stav zárodečného epitelu i intersticiální tkáně mezi semenotvornými kanálky) a na spermatogenezi. Pomocí histologických a imunohistochemických metod jsme posuzovali některé změny odehrávající se ve varleti na úrovni cytoskeletárních vláken, dále změny v expresi proteinů mezibuněčných spojení mezi jednotlivými populacemi testikulárních buněk a porovnávali jsme proliferaci testikulárních buněk s rozsahem jejich poškození.

V obou experimentálních modelech jsme pozorovali postupně progredující poškození zárodečného epitelu v semenotvorných kanálcích (postupné vymizení zárodečných buněk ze zárodečného epitelu a zmenšení průměru poškozených semenotvorných kanálků) spojené se snížením hmotností varlat a edematózním prosáknutím tkáně varlete. Vznik, průběh a důsledky tohoto poškození byly však v obou experimentech různé.

V průběhu prvního experimentu byl u dospělých potkanů kmene Wistar operativně navozen jednostranný **kryptorchismus** na dobu od 6 hodin do 121 dnů. Pro přehlednost a zkrácení lze intervaly do 14 dnů považovat za krátkodobé, delší než 15 dnů za dlouhodobý kryptorchismus. U zvířat kryptorchizovaných na dobu od 6 hodin do 3 dnů jsme nezaznamenali žádné změny v průměrné hmotnosti kryptorchických varlat oproti varlatům skrotálním, ani skrotálně lokalizovaným varlatům kontrolních zvířat. To odpovídá údajům nalezeným v literatuře, které udávají signifikantní úbytek hmotnosti kryptorchického varlete nejdříve 4. den od navození kryptorchismu (Courtens a Ploen 1999; Ogi et al. 1998; Wang et al. 1998).

Po 5 dnech od operačního zákroku jsme u abdominálně umístěných varlat zaznamenali signifikantní úbytek hmotnosti také v našem experimentu. Pokles hmotnosti operovaných varlat pokračoval do 22. dne. V následujících intervalech zůstala hmotnost operovaných varlat přibližně stejná až do 121. dne. V těchto intervalech dosahovala hmotnost operovaného varlete přibližně 40 - 50 % hmotnosti neoperovaného varlete. Poškozená kryptorchická varlata byla také menší než-li varlata skrotální, měkká a silně prosáklá tekutinou, která tvořila většinu hmotnosti kryptorchického varlete. Průměrná hmotnost neoperovaných skrotálních varlat byla ve všech časových intervalech kryptorchismu srovnatelná s hmotností varlat kontrolních jedinců. Naše pozorování jsou v souladu např. s výsledky těchto autorů (Courstens a Ploen 1999; Ogi et al. 1998; Wang et al. 1998; Zakaria et al. 2000). Existuje ale také práce ukazující úbytek hmotnosti kryptorchického varlete doprovázený kompenzační hypertrofií kontralaterálního skrotálního varlete, jehož hmotnost se postupně zvyšovala a po 6 - 12 týdnech (specifické pro různé kmeny potkanů) se ustálila (Watts et al. 2000).

Morfologický obraz patologických změn ve varleti jsme sledovali na úrovni světelného mikroskopu. V semenotvorných kanálcích jedinců, u nichž byl operativně navozen jednostranný kryptorchismus, se poškození zárodečného epitelu projevilo nejprve na úrovni spermatid. V našem experimentu se elongované a kulaté spermatidy začaly oddělovat z epitelu do lumen semenotvorného kanálku u některých jedinců již po 48 hodinách trvání kryptorchismu. Pouze autoři dvou studií uvádějí první známky poškození semenotvorných kanálků již jeden den po navození experimentálního kryptorchismu (Ogi et al. 1998; Wang et al. 1998). Od 3. dne byly spermatidy odlučovány ze zárodečného epitelu společně se spermatocyty. K nejmasivnějšímu odlučování zárodečných buněk docházelo v intervalech mezi 3. a 11. dnem trvání kryptorchismu. Zároveň bylo v těchto intervalech v kryptorchických varlatech přítomno největší množství TUNEL pozitivních buněk (3. den převážně spermatocyty, od 5. dne již i spermatogonie). Pomocí metody TUNEL lze označit jádra buněk, v nichž dochází ke zvýšené fragmentaci DNA (Gavrieli et al. 1992). Mezi 11. a 22. dnem kryptorchismu došlo k poklesu počtu TUNEL pozitivních buněk v semenotvorném kanálku jako důsledek poklesu celkového množství zárodečných buněk v epitelu. V nejdelších intervalech došlo ke kompletní nebo téměř kompletní eliminaci zárodečných buněk (včetně spermatogonií) ze zárodečného epitelu většiny semenotvorných kanálků. Výskyt TUNEL pozitivních spermatocytů a spermatogonií v těchto intervalech dále klesal. Průřezy semenotvorných kanálků kryptorchických varlat u zvířat z těchto

experimentálních skupin byly zřetelně menších rozměrů než-li kanálky skrotálně lokalizovaných varlat nebo kontrolních jedinců. Podobné změny pozorovali v kryptorchickém varleti např. (Courtens a Ploen 1999; Farooqui et al. 2001; Ogi et al. 1998; Wang et al. 1998; Wang et al. 2002b).

Poškození zárodečného epitelu varlete se projevilo také v nadvarlatech, v jejichž kanálcích se vedle postupně se snižujícího množství vyzrávajících spermií objevovaly nejprve také nezralé formy gamet a od intervalu 11 dní často pouze amorfní nebuněčný materiál.

PCNA pozitivita ve varlatech kontrolních zvířat byla spojena s mitoticky se dělicími spermatogoniemi ve všech stádiích zárodečného epitelu, s leptotenními, zygotenními a pachytenními spermatocyty, dále s Leydigovými buňkami v intersticiální tkáni a peritubulárními myoidními buňkami. Podobná pozorování publikovali (Liang et al. 2001). U kryptorchických zvířat v poškozených semenotvorných kanálcích jsme silnou PCNA pozitivitu zaznamenali nejen ve zbylých zárodečných buňkách v epitelu, ale také v již odloučených spermatocytech. Ale zatímco v celistvém zárodečném epitelu byla PCNA pozitivní pouze jádra, v odloučených buňkách vykazovalo PCNA pozitivitu jádro i cytoplazma. PCNA pozitivita cytoplazmy by mohla být důsledkem poškození jaderné membrány při regresi odlučujících se spermatocytů (PCNA přechází z jádra do cytoplazmy buněk přes porušenou jadernou membránu.). Expresi PCNA v cytoplazmě buněk jsme pozorovali i v dalších orgánech (játra, ledviny) v rámci jiných experimentů. Zde se také jednalo o buňky poškozené. Jiným případem, kdy se PCNA nachází v cytoplazmě je mitóza buněk, kdy se jaderná membrána rozpouští v průběhu dělení jader). S popisem výskytu PCNA v cytoplazmě buněk jsme se v naší studované literatuře dosud neseťkali.

V mnoha kanálcích se v intervalech 3 - 11 dnů vyskytoval velký počet vícejaderných buněk v lumen kanálku. Neobvyklé nebyly útvary obsahující v rovině řezu 6-8 jader. Tyto útvary vznikly splynutím kulatých spermatid, některé útvary také sloučením spermatid a spermatocytů. Zajímavým zjištěním bylo, že pouze některá jádra těchto útvarů byla PCNA pozitivní. Tato heterogenita byla pozorována i v rámci jednoho kanálku. Multinukleární buňky se objevují v semenotvorných kanálcích také při jiných modelech poškození varlat, např. po podvázání chámovodu, kdy je zastaven odtok semenné tekutiny. Zároveň v tomto modelu také dochází k apoptóze zárodečných buněk přibližně ve stejném časovém horizontu jako u kryptorchizovaných zvířat (Anton 2003).

Ve druhém experimentu byl potkanům intraperitoneálně podáván **busulfan** (v dávce 10 mg/kg). Sledovali jsme intervaly 7, 21 a 42 dní po aplikaci 1 dávky a 7, 14, 21, 28, 42 a 70 dní po aplikaci 2 dávek (v odstupu 21 dnů). (Podání dávky 40 mg/kg se ukázalo být dávkou letální pro potkana kmene Wistar, ačkoliv literární zdroje udávají i možnost podání vyšších dávek potkanům (Moisan et al. 2003; Wistuba et al. 2002). Jako poslední byl zvolen interval 70 dní (10 týdnů). Za tuti dobu proběhne cyklus spermatogeneze u potkana kmene Wistar téměř dvakrát, neboť diferenciací gamety trvá přibližně 42 dnů.

Podání jedné dávky busulfanu (10 mg/kg) rezultovalo ve statisticky nevýznamný pokles hmotnosti varlat již 21 dnů po aplikaci. V intervalech 7 a 14 dní po druhé dávce jsme zaznamenali pokles hmotnosti varlat až o jednu třetinu oproti kontrolní skupině. V časových intervalech 21 až 42 dní po aplikaci dvou dávek busulfanu byl pokles nejmarkantnější a zaznamenali jsme až 50% úbytek hmotnosti varlat jako důsledek poškození zárodečného epitelu varlat po aplikaci cytostatika. V posledním časovém intervalu, 70 dní po aplikaci druhé dávky busulfanu, jsme zaznamenali hmotnostní nárůst, avšak stále byla hmotnost varlat o jednu třetinu nižší oproti kontrolní skupině. Tento hmotnostní přírůstek si můžeme vysvětlit jako důsledek obnovy spermatogeneze a postupného dorůstání zárodečného epitelu. Jiang (1998) ve své práci popisuje také hmotnostní úbytek varlat u potkanů kmene LONG EVANS po aplikaci dvou dávek busulfanu (10 mg/kg hmotnosti zvířete) ve stejném dávkovacím schématu, jako jsme použili v našem experimentu. Zjistil pokles hmotnosti varlat ve všech sledovaných skupinách (20, 48, 74 a 96 dnů po podání druhé dávky busulfanu) proti kontrolní skupině. Největší rozdíl byl v časovém intervalu 74 dní (pokles o cca 75%). V tomto intervalu jsme již u kmene Wistar zaznamenali spíše hmotnostní přírůstek, který Jiang pozoroval až v časovém intervalu 96 dní od druhé aplikace busulfanu (Jiang 1998). Haddad et al. (1997) ve svém pokusu, kdy aplikovali pouze jednu dávku busulfanu (10 mg/kg hmotnosti zvířete) samcům potkana kmene WISTAR, také zaznamenali hmotnostní úbytek varlat. V jejich pokusu byl rozdíl proti kontrolní skupině nejmarkantnější v časovém intervalu 56 dní, více než 50%. Od 77. dne pozorovali již zvyšování hmotnosti, ale hmotnost varlat experimentálních zvířat nedosáhla hmotnosti varlat kontrolní skupiny ani v časovém intervalu 119 dní po aplikaci jedné dávky busulfanu (Haddad et al. 1997).

Toxický vliv busulfanu na tkáň varlete se projevil také ve zmenšení průměru semenotvorných kanálků a v poškození procesu spermatogeneze (pozvolné

degenerativní změny a pokles počtu zárodečných buněk v zárodečném epitelu). Na rozdíl od kryptorchických jedinců došlo u zvířat, jímž byl podáván busulfan, nejprve k vymizení mitoticky se dělících spermatogonií (částečně již 21 dnů po podání 1. dávky, takřka úplně v intervalech 7 a 14 dní po podání druhé dávky), přičemž spermatocyty a spermatidy zůstávaly přítomny v epitelu a jejich meiotické dělení, resp. spermatohistogeneze, dále pokračovaly. Došlo ovšem k poklesu počtu PCNA pozitivních zárodečných buněk bez zvýšení počtu TUNEL pozitivních buněk. TUNEL pozitivními buňkami byly v těchto intervalech pouze spermatogonie, a to sice v malém počtu. Největší poškození zárodečného epitelu jsme zaznamenali až v delších časových intervalech - 21, 28 a 42 dní po druhé dávce busulfanu, kdy došlo k výrazným změnám ve struktuře semenotvorných tubulů. Z epitelu vymizely téměř všechny spermatocyty a spermatidy a při bazální membráně zůstalo zachováno pouze několik spermatogonií. Nejpoškozenější semenotvorné kanálky byly tvořeny pouze Sertoliho buňkami. Na rozdíl od kryptorchických varlat se spermatidy a spermatocyty v průběhu odlučování z epitelu nespojovaly do mnohojaderných útvarů a v lumen kanálku se téměř výlučně nacházely jednotlivě. Jiang (1998) ve studii, jejíž podmínky byly srovnatelné s našimi, zaznamenal 20 dní po druhé intraperitoneální injekci busulfanu ztrátu většiny spermatogenních buněk a menší počet samostatně přežívajících spermatogonií, vyskytujících se v těsném kontaktu s bazálním kompartmentem sousedních Sertoliho buněk (Jiang 1998). Aich et al., kteří aplikovali potkanům kmene Indian house rat (*Rattus Rattus*) pouze jednu dávku busulfanu, nepozorovali 10. den po injekci žádné výraznější změny v přestavbě zárodečných a Sertoliho buněk. 40 dnů po aplikaci busulfanu pozorovali změny ve všech kanálcích, v jejichž epitelu byly pouze spermatogonie, zygotenní spermatocyty a Sertoliho buňky (Aich a Manna 2001).

Díky přeživším spermatogoniím došlo po odeznění účinků busulfanu ke znovunastartování procesu spermatogeneze (od intervalu 28 dnů po podání druhé dávky). Zároveň se v nových generacích spermatogonií a spermatocytů obnovila exprese PCNA. V těchto intervalech byla exprese PCNA v semenotvorných kanálcích přesným markerem mitoticky aktivních spermatogonií mezi Sertoliho buňkami. Relativně častý nálezný TUNEL pozitivních zárodečných buněk v těchto intervalech lze vysvětlit jako přirozenou buněčnou smrt zárodečných buněk, ke které v průběhu spermatogeneze dochází. Na rozdíl od kontrolních zvířat se nám TUNEL pozitivní buňky podařilo v těchto intervalech zachytit pravděpodobně díky částečné synchronizaci spermatogeneze po jejím opětovném nastartování. Jiným důvodem může být, že ačkoliv

kmenové spermatogonie přežily a daly základ novým zárodečným buňkám, byla jejich DNA vlivem mutagenního účinku busulfanu natolik poškozena, že se to projevilo i na „kvalitě“ nových spermatogonií a spermatocytů.

V intervalech 42 a zejména 70 dní po druhé injekci busulfanu jsme již obnovu a růst zárodečného epitelu pozorovali ve většině semenotvorných kanálků. Po 70 dnech došlo k obnově všech vývojových fází zárodečného epitelu – spermatogonií, spermatocytů a v adlumínálním kompartmentu kanálek byly přítomny dozrávající spermatidy. Zahájení obnovy spermatogeneze a zárodečného epitelu varlete začalo probíhat u potkana kmene Wistar dříve, než uvádějí jiní autoři ve svých studiích. Aich et al. zaznamenali u potkana Indian house rat až po 70 dnech znovuobjevení se spermatogonií typu A a B a zygotenních spermatocytů, tubuly však stále postrádaly pachytenní spermatocyty, spermatidy a spermatozoa. Aktivní spermatogenezi pozorovali ve většině kanálek až 100 dní po injekci busulfanu – ale již po 56 dnech byly v zárodečném epitelu přítomny spermatocyty (Aich a Manna 2001). Jiang zaznamenal začátek znovuobnovy zdecimovaného epitelu 48. den po aplikaci busulfanu (potkan – kmen Long Evans). 74. den pozoroval v některých kanálcích již spermatidy v akrosomální fázi spermatohistogeneze a 96. den normální spermatogenezi ve většině semenotvorných tubulů. Přesto stejně jako u našich potkanů kmene Wistar zůstaly v zárodečném epitelu některých kanálek přítomny pouze Sertoliho buňky bez přítomnosti jakýchkoliv zárodečných buněk (Jiang 1998).

Výsledky podobné našim zaznamenali i jiní autoři při použití modelových xenobiotik methylmethansulfonátu a ethandimethansulfonátu (EDMS), tedy látek s chemickou strukturou podobnou busulfanu (Bartlett et al. 1986; Santra a Manna 2002). Ethandimethansulfonát je alkylační látka, která se často používá v experimentech jako látka toxická pro Leydigovy buňky. Po intraperitoneální injekci EDMS bylo pozorováno progresivní poškození spermatogeneze již 3. den po aplikaci látky. Z intersticia zmizely Leydigovy buňky (na rozdíl od busulfanu) a v tubulech se vyskytovaly stádium - specifické degenerující pachytenní spermatocyty ve stádiu VII – VIII spermatogenního cyklu. K maximálnímu poškození došlo po 14 dnech od podání EDMS, kdy tubuly postrádaly jednu nebo více generací zárodečných buněk, obsahovaly lipidové inkluze či různý počet degenerujících zárodečných buněk. Mezi 21. a 28. dnem se začaly obnovovat Leydigovy buňky v intersticiální tkáni. 70. den po jedné dávce EDMS se kvalitativně normální spermatogeneze obnovila ve velké většině semenotvorných kanálek. Několik tubulů

však zůstalo ve fázi, kdy v zárodečném epitelu zůstaly jen Sertoliho buňky a spermatogonie (Bartlett et al. 1986).

V průběhu experimentu jsme se dále zaměřili na změny v uspořádání cytoskeletu v jednotlivých typech buněk varlete. Pomocí imunohistochemických technik jsme sledovali změny v expresi **aktinu**, **tubulinu** a intermediárního filamenta **vimentinu**, k nimž dochází v kontrolních varlatech v průběhu spermatogenního cyklu a také během poškození v obou experimentálních modelech.

Aktinová vlákna se nacházela především v peritubulárních myoidních buňkách, méně výraznou aktivitu jsme našli v zárodečném kanálku při bazi epitelu a také kolem elongovaných spermatid především ve stádiích III – VIII. Tubulinová vlákna se nacházela především v elongovaných spermatidách a v Sertoliho buňkách a byla uspořádána do provazců mezi zárodečnými buňkami od bazální membrány až do jejich apikálních výběžků. V intersticiální tkáni jsme tubulin detekovali především ve stěně cév. Exprese vimentinu v epitelu byla na rozdíl od tubulinu méně uniformní a v průběhu spermatogenního cyklu se seskupení vimentinových vláken měnilo. Vždy se ovšem nacházely pouze v Sertoliho buňkách. Vimentin-pozitivní byly také peritubulární myoidní buňky a v intersticiu různé typy buněk ve stěně testikulárních cév, méně intenzivní nález byl v Leydigových buňkách, fibroblastech a buňkách imunitního systému.

První změny v expresi aktinu byly spojeny v obou modelech s odlučováním spermatocytů a spermatid. Od 3. dne kryptorchismu a 14. dne po podání druhé dávky busulfanu došlo k vymizení aktinových vláken z apikálních částí zárodečného epitelu, což bylo spojeno se zhroucením aktinových vláken směrem k bazální membráně. Dále výsledky této práce ukázaly, že podání busulfanu i kryptorchismus rezultovaly v podobné změny také v konfiguraci vimentinových filament v Sertoliho buňkách. Odlučování zárodečných buněk z epitelu bylo spojeno s kolapsem vimentinových vláken směrem k jádru Sertoliho buněk, kde tvořila intenzivně zbarvený prsteneček v blízkosti jádra Sertoliho buněk. Vimentinová i aktinová vlákna zůstala přítomna v Sertoliho buňkách i v nejpoškozenějších kanálech (byť byla neuspořádána v bazálním kompartmentu Sertoliho buněk) a zůstala jim schopnost opět se uspořádat v průběhu obnovy spermatogeneze (u poškození busulfanem). Na rozdíl od těchto dvou typů cytoskeletárních vláken nedošlo ke kolapsu tubulinových vláken v Sertoliho buňkách. V nejvíce poškozených varlatech (u obou experimentálních skupin) byla tubulinová

vlákna přítomna v Sertoliho buňkách od bazálního kompartmentu až po apikální výběžky těchto buněk. Došlo pouze ke ztrátě stádium specifického uspořádání tubulinových vláken v Sertoliho buňkách, což díky nepřítomnosti zárodečných buněk v epitelu nebylo překvapením.

Význam pozorovaných skutečností nabyde na významu, uvědomíme-li si funkci jednotlivých typů cytoskeletárních vláken v zárodečném epitelu varlete. Tubulin se nachází v Sertoliho buňkách, v dělicím vřetenku spermatogonií a spermatocytů, v manžetě vyvíjejících se spermatid a v jejich bičíku (Aumuller a Seitz 1988). Aktin se v semenotvorném epitelu vyskytuje v bazálním kompartmentu u spojení Sertoliho buněk a v blízkosti hlav zanořených spermatid (u adherentních spojení typu ektoplazmatických specializací) (Aumuller a Seitz 1988; Maekawa et al. 1995) a byl také detekován v intercelulárních můstcích a tubulobulbárních komplexech (Mulholland et al. 2001). Vimentinová vlákna tvoří v bazální části epitelu hustou síť, z níž vybíhají apikálním směrem vlákna ke strukturám adhezních spojení v cytoplazmatické membráně Sertoliho buněk (hemidesmosomální spojení mezi Sertoliho buňkami a extracelulární matrix a desmosomální spojení mezi Sertoliho buňkami a sousedními zárodečnými buňkami). Předpokládá se, že aktinová a vimentinová filamenta mají význam pro ukotvení zárodečných buněk v semenotvorném epitelu (Amlani a Vogl 1988; Mulholland et al. 2001).

Poškození aktinových a vimentinových vláken může způsobit poškození „kotvící“ funkce několika typů mezibuněčných spojení. Rozpad těchto filament a mezibuněčných spojení může buď předcházet odlučování zárodečných buněk z epitelu, nebo probíhat současně s ním. Poškození vimentinových filament v Sertoliho buňkách působením některých xenobiotik má souvislost s porušením struktury semenotvorného epitelu. Kolaps vimentinových vláken byl pozorován např. po podání toluenu (Dalgaard et al. 2001), mono(2-ethylhexyl)ftalátu (Richburg a Boekelheide 1996), 2,5-hexandionu (Hall et al. 1991) nebo kolchicinu (Allard et al. 1993). Podobně, experimentální snížení intratestikulární hladiny testosteronu rezultovalo v odlučování spermatid od Sertoliho buněk a v jejich uvolnění do lumen kanálku, které bylo doprovázeno kolapsem vimentinových vláken (Show et al. 2003). Kolaps vimentinových vláken po operabilně navozeném kryptorchismu pozorovali (Wang et al. 2002b)).

Dávky busulfanu, použité v tomto experimentu, nezpůsobily ireverzibilní poškození zárodečného epitelu ve všech tubulech. Naopak došlo k obnově spermatogeneze. S objevením se zárodečných buněk v zárodečném epitelu došlo také

k obnově uspořádání vimentinových a aktinových vláken v Sertoliho buňkách. Je pravděpodobné, že současně s výskytem nových zárodečných buněk mezi Sertoliho buňkami se vyvíjelo jejich ukotvení k Sertoliho buňkám pomocí různých typů mezibuněčných spojení. Po znovu objevení se spermatocytů v epitelu se vimentinová filamenta začala organizovat v bazální a perinukleární oblasti Sertoliho buněk mezi spermatogoniemi a spermatocyty. V další fázi došlo k růstu a prodlužování apikálních filament ke spermatidám. Podobný vývoj jsme pozorovali také u aktinových vláken. Je pravděpodobné, že existují nějaké lokální faktory, které ovlivňují reorganizaci obou typů filament z chaotického a náhodného uspořádání do vysoce organizovaných struktur. Spruill et al. (1989) prokázal v *in vitro* pokusech, že FSH vyvolává fosforylaci vimentinových jednotek a tím ovlivňuje nové uspořádání filament. Je tedy možné, že po odeznění účinku busulfanu, FSH prostřednictvím cAMP indukuje fosforylaci vimentinových filament a tím umožní reorganizaci vimentinu. Reorganizace vimentinu (a aktinu) během obnovy spermatogeneze se však mohou účastnit i další neznámé faktory (Spruill et al. 1983).

Zásadní roli ve stavbě a funkci hematotestikulární bariéry hrají **těsné spoje (tight junctions – TJ)** mezi Sertoliho buňkami, které brání prostupu molekul z bazálního do adlumínálního kompartmentu paracelulární cestou. Je pravděpodobné, že v průběhu poškození tkáně varlete v rámci obou experimentů dochází ke změnám v expresi stavebních jednotek těchto spojů. Proto jsme pomocí imunohistochemických sond chtěli zkoumat expresi strukturních jednotek těsných spojení, konkrétně claudinu-11/OSP, který je považován za claudin specifický pro testikulární TJ (Hellani et al. 2000; Morita et al. 1999), dále occludinu, jehož exprese je nutná pro bariérové funkce TJ v tkáních (Antonetti et al. 2002; Bolton et al. 1998; DeMaio et al. 2001; Wan et al. 1999). Bohužel ale komerčně dostupné protilátky, které jsme vyzkoušeli, nebyly vhodné a použitelné pro naše experimentální podmínky (V současné době probíhá na našem pracovišti testování protilátky proti ZO-1, proteinu asociovanému s TJ) (Byers et al. 1991). Podobně jsme neuspěli s protilátkami proti proteinům adhezních spojů α -catenin a β -catenin.

Z proteinů **adherentních spojení (AJ)** jsme se zabývali expresí E-cadherinu a P-cadherinu (Studium exprese N-cadherinu nebylo dokončeno v době sepisování práce). Lin a DePhilip (1996) detekovali **P-cadherin** v Sertoliho buňkách myši do 8. dne postnatálně a u dospělých samců pouze v peritubulárních myoidních buňkách (Lin a

DePhilip 1996). Na rozdíl od těchto autorů jsme P-cadherin u dospělých potkanů pozorovali v zárodečném epitelu a jeho exprese se měnila podle stádia zárodečného epitelu. Ve varlatech dospělých potkanů stejně jako my detekovali P-cadherin např. (Andersson et al. 1994; Byers et al. 1994; Wu et al. 1993). Vzhledem k tomu, že P-cadherin je membránový protein (Nachtigal et al. 2001), bylo zajímavé, že jsme jeho expresi pozorovali také jako grana v cytoplazmě spermatocytů a až ve spermatidách byl P-cadherin exprimován pouze v cytoplazmatické membráně. Vzhledem k tomuto charakteru exprese P-cadherinu lze usuzovat, že P-cadherin je ve spermatocytech syntetizován a skladován a posléze využit pro stavbu adherentních spojení. V menším množství jsme P-cadherin detekovali v intersticiální tkáni mezi kanálky, konkrétně v Leydigových buňkách. **E-cadherin** byl exprimován pouze v intersticiální tkáni varlete.

Změnami exprese P-cadherinu a E-cadherinu ve varlatech při patologických stavech se, pokud je nám známo, dosud nikdo nezabýval. Změny v expresi P-cadherinu v zárodečném epitelu operovaného varlete jsme pozorovali již po dvou dnech kryptorchismu. Exprese zůstala zachována v zárodečných buňkách, které byly součástí epitelu. Vymizela ovšem ze spermatid, které byly odloučeny ze zárodečného epitelu. Zda je odlučování spermatid důsledkem poškození AJ, nebo poškození spermatid postupně progreduje i v poškození membránových struktur včetně AJ, je otázka, která zůstává v naší práci nezodpovězena. Svoji roli zde hraje také poškození proteinů adherentních spojení a cytoskeletárních vláken ze strany Sertoliho buněk. Vzhledem k tomu, že adheze mezi zárodečnými a Sertoliho buňkami je důležitá pro spermatogenezi a členové superrodiny cadherinů jsou rozhodující komponenty adherentních spojů mezi buňkami, může být narušení buněčné interakce ve varlatech mimo jiné důsledkem poškození funkce cadherinů. Cadheriny jsou totiž důležité pro udržení mnohobuněčných struktur a jejich poškození resultuje v desintegraci těchto struktur (Alberts et al. 2002; Andersson et al. 1994; Johnson et al. 2000). V dalších intervalech (3-11 dní), kdy se z epitelu odlučovaly také spermatocyty, zůstala exprese v cytoplazmě odloučených spermatocytů stále zachována. To může opět potvrzovat fakt, že v těchto buňkách neplní P-cadherin pouze svou adherentní funkci, ale je v nich také syntetizován a skladován. V semenotvorných kanálcích, v nichž došlo k úplnému vymizení zárodečných buněk, se exprese P-cadherinu zcela vytratila.

Po podání busulfanu došlo ke ztrátě exprese P-cadherinu v semenotvorných kanálcích až v okamžiku vymizení spermatid z epitelu. Zdá se, že nemusí jít o přímý efekt busulfanu, ale ke změnám exprese P-cadherinu dochází, protože v poškozených

kanálcích postupně dobíhá spermatohistogeneze a dozrávající spermatidy se uvolňují z epitelu fyziologicky. Jakmile dozní účinky busulfanu na tkáň varlete, přeživší spermatogonie se začnou dělit a objevují se spermatocyty a spermatidy, objevuje se společně s nimi i exprese P-cadherinu (nejprve v podobě gran ve spermatocytech a poté v membránách spermatid).

V současnosti máme málo údajů o toxickém vlivu xenobiotik na cadheriny a jejich funkci. Byl prokázán negativní účinek těžkých kovů, zejména rtuti, olova a kadmia, na cadheriny. Tyto kovy a v některých případech i jejich organické sloučeniny mohou působit na adhezivní molekuly ve všech úrovních jejich syntézy, skladování, transportu do membrány i při tvorbě a funkci adherentních spojení (Prozialeck et al. 2002). Další studie prokázala toxický účinek Cd^{2+} iontů na cadheriny v epitelálních a endotelálních buňkách plicní tkáně (Pearson et al. 2003).

V průběhu poškození varlat oběma přístupy nedošlo k výrazným změnám v expresi E-cadherinu. Pouze v experimentu s busulfanem jsme pozorovali nárůst exprese E-cadherinu, který koreloval s vyšším počtem Leydigových buněk v intersticiální tkáni v intervalech 21-42 dnů po aplikaci druhé dávky busulfanu.

Dalším typem mezibuněčných spojení, který jsme studovali, jsou **gap junction (GJ)** nebo-li nexy, které jsou tvořeny proteiny zvanými connexiny. **Connexin 43** je nerozšířenějším connexinem ve tkáni varlete, přítomným již od časných stádií embryonální gonády a jeho exprese roste kontinuálně až do dospělosti. Exprese connexinu 43 se v zárodečném epitelu mění v závislosti na stádiu epitelu. Je přítomen také v Leydigových buňkách (Batias et al. 2000; Bravo-Moreno et al. 2001; Pelletier 1995; Perez-Armendariz et al. 1994; Risley et al. 1992). Podobně jako výše citovaní autoři jsme expresi connexinu 43 zaznamenali ve všech vzorcích kontrolních varlat mezi jednotlivými populacemi buněk zárodečného epitelu – mezi Sertoliho buňkami a spermatogoniemi, Sertoliho a Sertoliho buňkami, Sertoliho buňkami a spermatocyty. Exprese connexinu 43 byla závislá na stádiu zárodečného epitelu. Ve stádiích I – III jsme pozorovali pouze slabou expresi, nejvyšší exprese connexinu 43 se nacházela v zárodečném epitelu ve stádiích VII – VIII. Následovalo rychlé vymizení connexinu 43 a od stádia XI do stádia XIV již epitel nevykazoval téměř žádnou expresi connexinu 43. Tyto výsledky jsou v souladu s pozorováním Risleho et al. (1992), kteří pozorovali expresi connexinu 43 ve zralých potkaních varlatech zejména ve spojení Sertoliho buněk, u spermatocytů a spermatogonií, na povrchu peritubulárních myoidních buněk a na Leydigových buňkách (Risley et al. 1992).

K vymizení exprese connexinu 43 v kryptorchizovaných varlatech došlo poté, co se z epitelu oddělily spermatocyty (od 3. až 5. dne kryptorchismu). Při dlouhém kryptorchismu (22-121 dní) byl connexin exprimován pouze v intersticiální tkáni a pouze výjimečně v méně poškozených semenotvorných kanálcích. Výjimečně byla pozitivita pro connexin 43 nalezena v odloupaných částech epitelu uvnitř lumen kanálků. U zvířat, jimž byl aplikován busulfan, byl connexin 43 exprimován v bazálním kompartmentu semenotvorných kanálků, i když v nich při bazální membráně chyběly spermatogonie. Větší změny (vymizení exprese connexinu 43) jsme pozorovali také až po odloučení spermatocytů ze zárodečného epitelu. U zvířat, která nejvíce zareagovala na podání busulfanu v intervalech 21 a 28 dní (v epitelu pouze Sertoliho buňky), došlo ke kompletnímu vymizení exprese connexinu 43 ze zárodečného epitelu kanálků varlete. Expresce connexinu 43 v intersticiu zůstala nezměněná. S postupnou obnovou zárodečného epitelu semenotvorných kanálků se znovu objevila exprese connexinu 43 v zárodečném epitelu. Zajímavé bylo pozorování exprese connexinu 43 v apikální membráně spermatocytů a Sertoliho buněk odhalené do lumen kanálků v průběhu restaurace spermatogeneze, kde tyto buňky nesousedí s jinou buňkou. Vzhledem k tomu, že connexin 43 nebyl pozorován v zárodečném epitelu poškozených tubulů, je pravděpodobné, že connexin 43 byl podobně jako P-cadherin syntetizován *de novo* a v průběhu znovunastartování spermatogeneze dochází k vytvoření nových mezibuněčných spojení typu gap junctions.

Změny v expresi connexinu 43 v testikulární tkáni jako důsledek toxického inzultu zatím nebyly studovány *in vivo*. V literatuře jsme našli pouze studie, kde jsou změny zkoumány u azoospermických pacientů a na buněčných liniích. Defamie et al. zjistili, že exprese connexinu 43 ve varlatech pacientů se sekreční azoospermii byla výrazně omezena ve srovnání s varlaty vykazujícími normální spermatogenezi (pacienti s exkreční azoospermii). Na potkaním modelu, kde se v tubulech vyskytovaly pouze Sertoliho buňky (Sertoli cell-only syndrom), se projevil nedostatek connexinu 43 v Sertoliho buňkách zhoršenou intercelulární komunikací přes kanály typu gap junctions mezi sousedními Sertoliho buňkami. Autoři vyslovili také domněnku, že nedostatečná exprese connexinu 43 v Sertoliho buňkách neplodných pacientů může souviset se zvyšujícím se nebezpečím rakoviny varlat (Defamie et al. 2003; Defamie et al. 2001).

Ve druhé studii autoři sledovali vliv lindanu (γ -hexachlorocyclohexan), pesticidu s karcinogenními a reprotoxickými vlastnostmi na testikulární funkci. Na buněčných liniích Sertoliho buněk 42GPA9 zjistili, že lindan v necytotoxických dávkách (50 μ M)

ruší komunikaci přes kanály typu gap junctions mezi sousedními buňkami. Tato změna byla spojená s časově závislou redistribucí connexinu 43 z membrány do cytoplazmatické perinukleární oblasti (Defamie et al. 2001).

Posledním markerem, který jsme v rámci této práce studovali, byl protein **prohibitin (PHB)**. Vybrali jsme jej původně jako marker antiproliferativní aktivity v poškozené tkáni varlete, který by doplnil výsledky analýzy TUNEL a exprese PCNA. Prohibitin je všudypřítomný, evolučně konzervovaný protein, jehož přesná role není dosud plně objasněna (Kihara et al. 1996) (Nijtmans et al. 2000). Diskutuje se protinádorová aktivita (Nuell et al. 1991; Sato et al. 1992), indukce apoptózy (Welburn a Murphy 1998), účast v regulaci transkripce přes interakci s proteiny E2F a Rb (retinoblastoma protein), které se podílejí na řízení buněčného cyklu (Wang et al. 1999a; Wang et al. 1999b; Wang et al. 2002a; Wang et al. 2002b) a „chaperonová“ funkce v průběhu syntézy proteinů dýchacího řetězce v mitochondriích (Nijtmans et al. 2002; Nijtmans et al. 2000). PHB byl lokalizován na vnitřní membráně mitochondrií (Coates et al. 1997; Ikonen et al. 1995). Exprese prohibitinu v zárodečném epitelu v jednotlivých populacích zárodečných buněk byla závislá na spermatogenním cyklu epitelu. PHB byl exprimován přednostně v cytoplazmě ve formě granul v Sertoliho i zárodečných buňkách. Nejsilnější pozitivitu v zárodečném epitelu jsme pozorovali v pachytenních spermatocytech jako granula uspořádaná v cytoplazmě kolem jader. V intersticiální tkáni mezi kanálky varlete byly nejvíce pozitivní Leydigovy buňky. Ostatní typy buněk vykazovaly nižší pozitivitu. Naše pozorování je v souladu s pozorováním (Choongkittaworn et al. 1993).

V rámci experimentů jsme expresi PHB sledovali i během poškození spermatogeneze oběma přístupy a nálezy jsme porovnávali s aktivitou PCNA a s analýzou fragmentace DNA - TUNEL ve tkáni varlat. Od 3. dne kryptorchismu se v zárodečném epitelu vedle primárních spermatocytů s nezměněnou nebo sníženou expresí PHB objevovaly také velmi silně PHB pozitivní spermatocyty s pozitivitou v jádrech. Porovnáním sousedních řezů jsme zjistili, že PHB silně pozitivní buňky postupně ztrácely jadernou PCNA pozitivitu a byly TUNEL pozitivní. Exprese PHB poklesla v Sertoliho i v zárodečných buňkách v epitelu již 21 dní po první aplikaci busulfanu. Naproti tomu silná exprese PHB byla pozorována v některých zárodečných buňkách (spermatocytech) odloučených z epitelu do lumen semenotvorného kanálku. V dalších intervalech téměř kompletně vymizela exprese PHB ze zárodečného epitelu,

který byl tvořen pouze Sertoliho buňkami. S tím, jak od 28. dne došlo k obnově spermatogeneze, se postupně obnovovala i exprese PHB v zárodečných i Sertoliho buňkách.

Tyto výsledky nelze přesto interpretovat zcela jednostranně a není možné rozhodnout, zda prohibitin má spíše antiproliferativní (Wang et al. 1999a) nebo chaperonovou funkci (Nijtmans et al. 2002). Důležitým faktem je, že jsme expresi PHB pozorovali především jako granula v cytoplazmě – což souhlasí s mitochondriální lokalizací prohibitinu v buňkách. Ale v určitých stádiích poškození buněk jsme zaznamenali silnou expresi PHB i v buněčném jádře.

Jednou z možností je, že v důsledku snížené exprese PHB je nedostatečná chaperonová funkce prohibitinu (Nijtmans et al. 2002). V poškozené buňce pak přestávají fungovat proteiny dýchacího řetězce a buňka postupně ztrácí energii pro další život. S postupnou obnovou spermatogeneze se opět aktivita PHB v mitochondriích nových zárodečných buněk i v Sertoliho buňkách vrací k fyziologickému stavu. Zároveň ale může snížení exprese PHB znamenat, že se poškozená buňka snaží přežít. Proto snižuje expresi molekul s antiproliferativní aktivitou jakou u PHB předpokládají Wang et al. (1999). Proti antiproliferativní teorii hraje zase fakt, že exprese PHB v Sertoliho buňkách, které se již více nedělí a jsou v G_0 fázi, byla mnohem slabší než exprese PHB ve spermatogoniích a spermatocytech. Nicméně, pozorování buněk s velmi silně pozitivním jádrem a zároveň s TUNEL pozitivitou opět ukazuje i na možnou antiproliferativní funkci PHB, tj. PHB se nachází také v jádru buněk, kde se váže s Rb proteinem a potlačuje transkripční aktivitu E2F proteinů, jak dokazují Wang et al. (1999a). Je tedy možné, že prohibitin hraje skutečně obě dvě role v buňkách jednak v různých kompartmentech – v mitochondriích a v jádrech, a podruhé také za různých podmínek – fyziologický stav a poškození buněk.

ZÁVĚR

Cílem této dizertační práce bylo posoudit vliv modelového xenobiotika (busulfanu) a vliv operativně navozeného jednostranného kryptorchismu na morfologický obraz tkáně varlete potkana kmene Wistar (stav zárodečného epitelu i intersticiální tkáně mezi semenotvornými kanálky), na spermatogenezi a posoudit případné změny v nadvarlatech. Změny odehrávající se ve varleti na úrovni cytoskeletárních vláken a změny v expresi proteinů specializovaných mezibuněčných spojení mezi jednotlivými populacemi testikulárních buněk jsme hodnotili pomocí histologických a imunohistochemických metod. Dále jsme porovnávali proliferační aktivitu testikulárních buněk s rozsahem jejich poškození.

Jako pokusný model ke sledování účinku busulfanu na zárodečnou tkáň varlete jsme použili dospělé samce laboratorního potkana kmene Wistar o hmotnosti 200 – 250 g. Jedincům byla aplikována jedna dávka busulfanu (10 mg / kg nebo 40 mg / kg hmotnosti zvířete) nebo dvě dávky busulfanu (10 mg / kg hmotnosti zvířete v časovém odstupu 21 dnů - 1. a 21. den). Poté byla zvířata usmrcena v různých intervalech od 7 do 70 dnů po podání busulfanu. Jednostranný kryptorchismus byl u pokusných zvířat navozen operačním zásahem na dobu od 6 hodin až po 121 dnů.

Výsledky lze shrnout do následující odstavců.

A. První změny jsme v zárodečném epitelu semenotvorných kanálek **kryptorchizovaných** varlat pozorovali v intervalech 2 a 3 dny. Nejprve došlo k odlučování spermatid z epitelu, následovaly spermatocyty a spermatogonie. V průběhu odlučování zárodečných buněk jsme pozorovali splývání těchto buněk do vícejaderných útvarů. Kanálky nadvarlat byly vyplněny tekutinou obsahující různě vyztřelé buňky zárodečné linie. Poškození spermatogeneze rezultovalo také ve snížení průměrné hmotnosti kryptorchických varlat u operovaných zvířat, které jsme zaznamenali již pátý den po operaci. V intervalech 22 až 121 dnů dosahovala hmotnost operovaného varlete cca 40-50% hmotnosti neoperovaného varlete a zárodečný epitel obsahoval pouze Sertoliho buňky, mezi nimiž byly přítomny zbylé spermatogonie. Hmotnost varlat operovaných kontrol, stejně jako hmotnost kontralaterálních skrotálních varlat, se v průběhu pokusu výrazně nezměnila.

B. Histologická analýza na úrovni světelného mikroskopu ukázala, že tkáň varlete je citlivá k aplikaci **busulfanu**. Nejvýraznější patologické změny byly patrné

v intervalech 21 – 42 dní po dvou dávkách xenobiotika, kdy došlo k rozsáhlé destrukci zárodečného epitelu, k vakuolizaci Sertoliho buněk, k zániku spermatogeneze a ke zmnožení Leydigových buněk v intersticiu. Cílem toxického účinku busulfanu byly mitoticky se dělicí spermatogonie. Na rozdíl od kryptorchických zvířat došlo po odeznění účinku busulfanu v posledních časových intervalech (28, 42 a 70 dní po druhé dávce busulfanu) k postupné obnově morfologie zárodečného epitelu a spermatogeneze. Poškození spermatogeneze se projevilo také ve snížení hmotnosti varlat a následná obnova byla provázena hmotnostním vzestupem.

C. Oběma experimentálními přístupy došlo k výrazným změnám v uspořádání **cytoskeletárních vláken**, především aktinových a vimentinových, v zárodečném epitelu varlete. U kryptorchizovaných zvířat i po podání busulfanu došlo k prvním změnám v expresi aktinu a vimentinu v intervalech, kdy se ze zárodečného epitelu začaly odlučovat spermatidy a spermatocyty (od 2. - 3. dne trvání kryptorchismu a 7., resp. 14. den po podání druhé dávky busulfanu). Došlo ke kolapsu vimentinových vláken z apikálních výběžků Sertoliho buněk směrem k jádru a ke snížení exprese aktinu v adlumínálních částech zárodečného epitelu. Kryptorchismus ani podání busulfanu neovlivnilo expresi tubulinu v Sertoliho buňkách. Poškození aktinových a vimentinových vláken může způsobit poškození několika typů adherentních mezibuněčných spojení. Rozpad těchto filament a mezibuněčných spojení může buď předcházet odlučování zárodečných buněk z epitelu, nebo probíhat současně s ním.

D. Sledovali jsme vliv podání busulfanu a vliv navozeného kryptorchismu na expresi **proteinů mezibuněčných spojení**. Změny v expresi P-cadherinu v zárodečném epitelu operovaného varlete jsme pozorovali již po dvou dnech kryptorchismu. Po podání busulfanu došlo ke ztrátě exprese P-cadherinu v semenotvorných kanálcích až v okamžiku vymizení spermatid z epitelu (od 14. dne po podání druhé dávky busulfanu) Zda je odlučování spermatid důsledkem poškození AJ, nebo poškození spermatid postupně progreduje i v poškození membránových struktur včetně AJ je otázka, která zůstává v naší práci nezodpovězena. Svoji roli zde hraje také poškození proteinů adherentních spojení a cytoskeletárních vláken ze strany Sertoliho buněk. Expese E-cadherinu (přítomného především v intersticiální tkáni) se během experimentů výrazně neměnila. Změny v expresi connexinu 43 byly závislé na přítomnosti spermatocytů. Proto v kryptorchizovaných varlatech došlo k vymizení exprese connexinu 43 od 3. až 5. dne kryptorchismu a u zvířat, jimž byl aplikován busulfan, od 7. až 14. dne po podání druhé dávky. S obnovou spermatogeneze se

exprese P-cadherinu i connexinu 43 obnovila do uspořádání v závislosti na spermatogenním cyklu zárodečného epitelu.

E. Porovnáním výsledků metody TUNEL (pro zjištění fragmentace DNA poškozených buněk) a aktivity PCNA (proliferačního markeru) jsme odhalili různost mechanismů poškození v obou modelech. U kryptorchických varlat nastalo od 3. dne masivní odumírání zárodečných buněk dokumentované TUNEL pozitivitou. Zůstala však zachována PCNA aktivita v odloučených i v epitelu zbylých buňkách. U busulfanem ovlivněných zvířat jsme TUNEL pozitivní buňky téměř nepozorovali s výjimkou spermatogonií, ale došlo k rychlému poklesu PCNA aktivity v semenotvorných kanálcích.

F. Posledním markerem, který jsme v rámci této práce studovali, byl protein **prohibitin (PHB)**. Od 3. dne kryptorchismu a již 21. dní po první dávce busulfanu se v zárodečném epitelu vedle primárních spermatocytů s nezměněnou nebo sníženou expresí PHB objevovaly také velmi silně PHB pozitivní spermatocyty s pozitivitou v jádrech (Tyto buňky byly TUNEL pozitivní.). Na základě těchto výsledků a porovnání s PCNA a TUNEL není přesto zatím možné rozhodnout, zda má prohibitin spíše antiproliferativní nebo chaperonovou funkci. Je dokonce možné, že prohibitin hraje obě dvě role v buňkách, jednak v různých kompartmentech – v mitochondriích a v jádru, a podruhé také za různých podmínek – fyziologický stav versus poškození buněk.

Lze tedy uzavřít, že oba dva experimentální přístupy (podání busulfanu a navození jednostranného kryptorchismu u potkana kmene Wistar) demonstrované v této práci jsou vhodné modely pro studium dílčích mechanismů poškození zárodečného epitelu varlete potkana.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Ahotupa, M. and Huhtaniemi, I.: Impaired detoxification of reactive oxygen and consequent oxidative stress in experimentally cryptorchid rat testis. *Biol Reprod* 46: 1114-8, 1992
- Aich, S. and Manna, C. K.: Histophysiological changes of the testicular tissue due to busulphan administration in the wild Indian house rat (*Rattus rattus*). *Acta Biol Hung* 52: 105-16, 2001
- AISLP: SPC, přípravku MYLERAN. 2004
- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P.: *Základy buněčné biologie*, pp. 609-612, Espero Publishing, Ústí nad Labem, 1997
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P.: *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition. Garland Science, Taylor & Francis Group, New York, 2002
- Allard, E. K., Johnson, K. J., and Boekelheide, K.: Colchicine disrupts the cytoskeleton of rat testis seminiferous epithelium in a stage-dependent manner. *Biol Reprod* 48: 143-53, 1993
- Amlani, S. and Vogl, A. W.: Changes in the distribution of microtubules and intermediate filaments in mammalian Sertoli cells during spermatogenesis. *Anat Rec* 220: 143-60, 1988
- Andersson, A. M., Edvardsen, K., and Skakkebaek, N. E.: Expression and localization of N- and E-cadherin in the human testis and epididymis. *Int J Androl* 17: 174-80, 1994
- Andersson, B. S., Kashyap, A., Gian, V., Wingard, J. R., Fernandez, H., Cagnoni, P. J., Jones, R. B., Tarantolo, S., Hu, W. W., Blume, K. G., Forman, S. J., and Champlin, R. E.: Conditioning therapy with intravenous busulfan and cyclophosphamide (IV BuCy2) for hematologic malignancies prior to allogeneic stem cell transplantation: a phase II study. *Biol Blood Marrow Transplant* 8: 145-54, 2002
- Anton, E.: Arrested apoptosis without nuclear fragmentation produced by efferent duct ligation in round spermatids and multinucleated giant cells of rat testis. *Reproduction* 125: 879-87, 2003
- Antonetti, D. A., Wolpert, E. B., DeMaio, L., Harhaj, N. S., and Scaduto, R. C., Jr.: Hydrocortisone decreases retinal endothelial cell water and solute flux coincident with increased content and decreased phosphorylation of occludin. *J Neurochem* 80: 667-77, 2002
- Ashkenazi, A. and Dixit, V. M.: Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol* 11: 255-60, 1999
- Aumuller, G., Hartmann, K., Giers, U., and Schenck, B.: Fine structure of the Sertoli cells of the rat testis in experimental unilateral cryptorchidism. *Int J Androl* 3: 301-11, 1980
- Aumuller, G. and Seitz, J.: Immunocytochemical localization of actin and tubulin in rat testis and spermatozoa. *Histochemistry* 89: 261-7, 1988

- Aumuller, G., Schulze, C., and Viebahn, C.: Intermediate filaments in Sertoli cells. *Microsc Res Tech* 20: 50-72, 1992
- Aurrand-Lions, M., Duncan, L., Ballestrem, C., and Imhof, B. A.: JAM-2, a novel immunoglobulin superfamily molecule, expressed by endothelial and lymphatic cells. *J Biol Chem* 276: 2733-41, 2001a
- Aurrand-Lions, M., Johnson-Leger, C., Wong, C., Du Pasquier, L., and Imhof, B. A.: Heterogeneity of endothelial junctions is reflected by differential expression and specific subcellular localization of the three JAM family members. *Blood* 98: 3699-707, 2001b
- Baker, H., Garrett, C., Clarke, G., Stewart, T., Brown, E., Venn, A., Mizvo, M., and Farley, T.: Feasibility of surveillance of changes in human fertility and semen quality. *Int J Androl* 23: 47, 2000
- Balda, M. S. and Matter, K.: Transmembrane proteins of tight junctions. *Semin Cell Dev Biol* 11: 281-9, 2000
- Barqawi, A., Trummer, H., and Meacham, R.: Effect of prolonged cryptorchidism on germ cell apoptosis and testicular sperm count. *Asian J Androl* 6: 47-51, 2004
- Bar-Shira Maymon, B., Paz, G., Elliott, D. J., Hammel, I., Kleiman, S. E., Yogev, L., Hauser, R., Botchan, A., and Yavetz, H.: Maturation phenotype of Sertoli cells in testicular biopsies of azoospermic men. *Hum Reprod* 15: 1537-42, 2000
- Bart, J., Groen, H. J., van der Graaf, W. T., Hollema, H., Hendrikse, N. H., Vaalburg, W., Sleijfer, D. T., and de Vries, E. G.: An oncological view on the blood-testis barrier. *Lancet Oncol* 3: 357-63, 2002
- Bartlett, J. M., Kerr, J. B., and Sharpe, R. M.: The effect of selective destruction and regeneration of rat Leydig cells on the intratesticular distribution of testosterone and morphology of the seminiferous epithelium. *J Androl* 7: 240-53, 1986
- Batias, C., Defamie, N., Lablack, A., Thepot, D., Fenichel, P., Segretain, D., and Pointis, G.: Modified expression of testicular gap-junction connexin 43 during normal spermatogenic cycle and in altered spermatogenesis. *Cell Tissue Res* 298: 113-21, 1999
- Batias, C., Siffroi, J. P., Fenichel, P., Pointis, G., and Segretain, D.: Connexin43 gene expression and regulation in the rodent seminiferous epithelium. *J Histochem Cytochem* 48: 793-805, 2000
- Beach, S. F. and Vogl, A. W.: Spermatid translocation in the rat seminiferous epithelium: coupling membrane trafficking machinery to a junction plaque. *Biol Reprod* 60: 1036-46, 1999
- Beumer, T. L., Kiyokawa, H., Roepers-Gajadien, H. L., van den Bos, L. A., Lock, T. M., Gademan, I. S., Rutgers, D. H., Koff, A., and de Rooij, D. G.: Regulatory role of p27kip1 in the mouse and human testis. *Endocrinology* 140: 1834-40, 1999
- Bhagwatwar, H. P., Phadungpojna, S., Chow, D. S., and Andersson, B. S.: Formulation and stability of busulfan for intravenous administration in high-dose chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 37: 401-8, 1996
- Bolton, S. J., Anthony, D. C., and Perry, V. H.: Loss of the tight junction proteins occludin and zonula occludens-1 from cerebral vascular endothelium during neutrophil-induced blood-brain barrier breakdown in vivo. *Neuroscience* 86: 1245-57, 1998

- Bravo-Moreno, J. F., Diaz-Sanchez, V., Montoya-Flores, J. G., Lamoyi, E., Saez, J. C., and Perez-Armendariz, E. M.: Expression of connexin43 in mouse Leydig, Sertoli, and germinal cells at different stages of postnatal development. *Anat Rec* 264: 13-24, 2001
- Brehm, R., Marks, A., Rey, R., Kliesch, S., Bergmann, M., and Steger, K.: Altered expression of connexins 26 and 43 in Sertoli cells in seminiferous tubules infiltrated with carcinoma-in-situ or seminoma. *J Pathol* 197: 647-53, 2002
- Brinster, C. J., Ryu, B. Y., Avarbock, M. R., Karagenc, L., Brinster, R. L., and Orwig, K. E.: Restoration of fertility by germ cell transplantation requires effective recipient preparation. *Biol Reprod* 69: 412-20, 2003
- Bucci, L. R. and Meistrich, M. L.: Effects of busulfan on murine spermatogenesis: cytotoxicity, sterility, sperm abnormalities, and dominant lethal mutations. *Mutat Res* 176: 259-68, 1987
- Buxton, R. S. and Magee, A. I.: Structure and interactions of desmosomal and other cadherins. *Semin Cell Biol* 3: 157-67, 1992
- Byers, S., Graham, R., Dai, H. N., and Hoxter, B.: Development of Sertoli cell junctional specializations and the distribution of the tight-junction-associated protein ZO-1 in the mouse testis. *Am J Anat* 191: 35-47, 1991
- Byers, S. W., Sujarit, S., Jegou, B., Butz, S., Hoschutzky, H., Herrenknecht, K., MacCalman, C., and Blaschuk, O. W.: Cadherins and cadherin-associated molecules in the developing and maturing rat testis. *Endocrinology* 134: 630-9, 1994
- Callard, G. V., Jorgensen, J. C., and Redding, J. M.: Biochemical analysis of programmed cell death during premeiotic stages of spermatogenesis in vivo and in vitro. *Dev Genet* 16: 140-7, 1995
- Cavicchia, J. C. and Sacerdote, F. L.: Correlation between blood-testis barrier development and onset of the first spermatogenic wave in normal and in busulfan-treated rats: a lanthanum and freeze-fracture study. *Anat Rec* 230: 361-8, 1991
- Cipriano, S. C., Chen, L., Burns, K. H., Koff, A., and Matzuk, M. M.: Inhibin and p27 interact to regulate gonadal tumorigenesis. *Mol Endocrinol* 15: 985-96, 2001
- Citi, S. and Denisenko, N.: Phosphorylation of the tight junction protein cingulin and the effects of protein kinase inhibitors and activators in MDCK epithelial cells. *J Cell Sci* 108 (Pt 8): 2917-26, 1995
- Coates, P. J., Jamieson, D. J., Smart, K., Prescott, A. R., and Hall, P. A.: The prohibitin family of mitochondrial proteins regulate replicative lifespan. *Curr Biol* 7: 607-10, 1997
- Colegio, O. R., Van Itallie, C. M., McCrea, H. J., Rahner, C., and Anderson, J. M.: Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 283: C142-7, 2002
- Courtens, J. L. and Ploen, L.: Improvement of spermatogenesis in adult cryptorchid rat testis by intratesticular infusion of lactate. *Biol Reprod* 61: 154-61, 1999
- Cyr, D. G., Blaschuk, O. W., and Robaire, B.: Identification and developmental regulation of cadherin messenger ribonucleic acids in the rat testis. *Endocrinology* 131: 139-45, 1992

- Cyr, D. G., Hermo, L., Egenberger, N., Mertineit, C., Trasler, J. M., and Laird, D. W.: Cellular immunolocalization of occludin during embryonic and postnatal development of the mouse testis and epididymis. *Endocrinology* 140: 3815-25, 1999
- Čihák, R.: *Anatomie II. 2. doplněné a upravené vydání*, pp. 298-305, Grada Publishing, Praha, 2002
- Dalgaard, M., Hossaini, A., Hougaard, K. S., Hass, U., and Ladefoged, O.: Developmental toxicity of toluene in male rats: effects on semen quality, testis morphology, and apoptotic neurodegeneration. *Arch Toxicol* 75: 103-9, 2001
- De Franca, L. R., Hess, R. A., Cooke, P. S., and Russell, L. D.: Neonatal hypothyroidism causes delayed Sertoli cell maturation in rats treated with propylthiouracil: evidence that the Sertoli cell controls testis growth. *Anat Rec* 242: 57-69, 1995
- De, F. W., Kuan, C. Y., Pinkerton, M., Sheldon, C. A., and Lewis, A. G.: Modulation of Germ Cell Apoptosis with a Nitric Oxide Synthase Inhibitor in a Murine Model of Congenital Cryptorchidism. *J Urol* 172: 1731-1735, 2004
- Defamie, N., Berthaut, I., Mograbi, B., Chevallier, D., Dadoune, J. P., Fenichel, P., Segretain, D., and Pointis, G.: Impaired gap junction connexin43 in Sertoli cells of patients with secretory azoospermia: a marker of undifferentiated Sertoli cells. *Lab Invest* 83: 449-56, 2003
- Defamie, N., Mograbi, B., Roger, C., Cronier, L., Malassine, A., Brucker-Davis, F., Fenichel, P., Segretain, D., and Pointis, G.: Disruption of gap junctional intercellular communication by lindane is associated with aberrant localization of connexin43 and zonula occludens-1 in 42GPA9 Sertoli cells. *Carcinogenesis* 22: 1537-42, 2001
- DeMaio, L., Chang, Y. S., Gardner, T. W., Tarbell, J. M., and Antonetti, D. A.: Shear stress regulates occludin content and phosphorylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H105-13, 2001
- du Manoir, S., Guillaud, P., Camus, E., Seigneurin, D., and Brugal, G.: Ki-67 labeling in postmitotic cells defines different Ki-67 pathways within the 2c compartment. *Cytometry* 12: 455-63, 1991
- Dylevský, I., Druga, R., and Mrázková, O.: *Funkční anatomie člověka*, pp. 383-387, Grada Publishing, Praha, 2000
- Ebnet, K., Schulz, C. U., Meyer Zu Brickwedde, M. K., Pendl, G. G., and Vestweber, D.: Junctional adhesion molecule interacts with the PDZ domain-containing proteins AF-6 and ZO-1. *J Biol Chem* 275: 27979-88, 2000
- Evans, R. M.: Vimentin: the conundrum of the intermediate filament gene family. *Bioessays* 20: 79-86, 1998
- Fanning, A. S., Jameson, B. J., Jesaitis, L. A., and Anderson, J. M.: The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 273: 29745-53, 1998
- Farooqui, S. M., Al-Bagdadi, F., Houslay, M. D., Bolger, G. B., Stout, R., Specian, R. D., Cherry, J. A., Conti, M., and O'Donnell, J. M.: Surgically induced cryptorchidism-related degenerative changes in spermatogonia are associated with loss of cyclic adenosine monophosphate-dependent phosphodiesterases type 4 in abdominal testes of rats. *Biol Reprod* 64: 1583-9, 2001

- Farooqui, S. M., Al-Bagdadi, F., O'Donnell, J. M., and Stout, R.: Degenerative changes in spermatogonia are associated with loss of glucose transporter (Glut 3) in abdominal testis of surgically induced unilateral cryptorchidism in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 236: 407-12, 1997
- Franca, L. R., Silva, V. A., Jr., Chiarini-Garcia, H., Garcia, S. K., and Debeljuk, L.: Cell proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the pig. *Biol Reprod* 63: 1629-36, 2000
- Fujimoto, K., Nagafuchi, A., Tsukita, S., Kuraoka, A., Ohokuma, A., and Shibata, Y.: Dynamics of connexins, E-cadherin and alpha-catenin on cell membranes during gap junction formation. *J Cell Sci* 110 (Pt 3): 311-22, 1997
- Fujisawa, M., Matsumoto, O., Kamidono, S., Hirose, F., Kojima, K., and Yoshida, S.: Changes of enzymes involved in DNA synthesis in the testes of cryptorchid rats. *J Reprod Fertil* 84: 123-30, 1988
- Furuse, M., Hata, M., Furuse, K., Yoshida, Y., Haratake, A., Sugitani, Y., Noda, T., Kubo, A., and Tsukita, S.: Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol* 156: 1099-111, 2002
- Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., and Tsukita, S.: Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 123: 1777-88, 1993
- Furuse, M., Itoh, M., Hirase, T., Nagafuchi, A., Yonemura, S., and Tsukita, S.: Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J Cell Biol* 127: 1617-26, 1994
- Ganong, W.: *Přehled lékařské fyziologie*, H&H, Jinočany, 1997
- Gavrieli, I., Sherman, Y., and Ben-Sasson, S. A.: Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *Journal of Cell Biology* 119: 493-501, 1992
- Giepmans, B. N. and Moolenaar, W. H.: The gap junction protein connexin43 interacts with the second PDZ domain of the zona occludens-1 protein. *Curr Biol* 8: 931-4, 1998
- Goldberg, G. S., Moreno, A. P., and Lampe, P. D.: Gap junctions between cells expressing connexin 43 or 32 show inverse permselectivity to adenosine and ATP. *J Biol Chem* 277: 36725-30, 2002
- Goldberg, G. S., Valiunas, V., and Brink, P. R.: Selective permeability of gap junction channels. *Biochim Biophys Acta* 1662: 96-101, 2004
- Goodenough, D. A., Goliger, J. A., and Paul, D. L.: Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu Rev Biochem* 65: 475-502, 1996
- Gottardi, C. J., Arpin, M., Fanning, A. S., and Louvard, D.: The junction-associated protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 10779-84, 1996
- Gow, A., Southwood, C. M., Li, J. S., Pariali, M., Riordan, G. P., Brodie, S. E., Danias, J., Bronstein, J. M., Kachar, B., and Lazzarini, R. A.: CNS myelin and sertoli cell tight junction strands are absent in Osp/claudin-11 null mice. *Cell* 99: 649-59, 1999

- Grima, J., Wong, C. C., Zhu, L. J., Zong, S. D., and Cheng, C. Y.: Testin secreted by Sertoli cells is associated with the cell surface, and its expression correlates with the disruption of Sertoli-germ cell junctions but not the inter-Sertoli tight junction. *J Biol Chem* 273: 21040-53, 1998
- Gumbiner, B. M.: Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84: 345-57, 1996
- Guo, C. X., Ma, J., Zhou, X. C., and Liu, Y. X.: Expression of HSP70-2 gene during germ cell apoptosis in rat unilateral cryptorchid testes. *Arch Androl* 46: 109-15, 2001
- Guttman, J. A., Mulholland, D. J., and Vogl, A. W.: Plectin is concentrated at intercellular junctions and at the nuclear surface in morphologically differentiated rat Sertoli cells. *Anat Rec* 254: 418-28, 1999
- Guttman, J. A., Takai, Y., and Vogl, A. W.: Evidence That Tubulobulbar Complexes in the Seminiferous Epithelium Are Involved with Internalization of Adhesion Junctions. *Biol Reprod*, 2004
- Haddad, S., Carvalho, T. L., Anselmo-Franci, J. A., Petenusci, S. O., and Favaretto, A. L.: Ultrasound stimulation of rat testes damaged by busulfan. *Ultrasound Med Biol* 23: 1421-5, 1997
- Hadziselimovic, F.: Cryptorchidism. Ultrastructure of normal and cryptorchid testis development. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 53: 3-71, 1977
- Hadziselimovic, F.: Cryptorchidism, its impact on male fertility. *Eur Urol* 41: 121-3, 2002
- Hall, E. S., Eveleth, J., and Boekelheide, K.: 2,5-Hexanedione exposure alters the rat Sertoli cell cytoskeleton. II. Intermediate filaments and actin. *Toxicol Appl Pharmacol* 111: 443-53, 1991
- Harhaj, N. S. and Antonetti, D. A.: Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 1206-37, 2004
- Hassan, M.: The role of busulfan in bone marrow transplantation. *Med Oncol* 16: 166-76, 1999
- Hassan, M., Nilsson, C., Hassan, Z., Gungor, T., Aschan, J., Winiarski, J., Hentschke, P., Ringden, O., Eber, S., Seger, R., and Ljungman, P.: A phase II trial of liposomal busulphan as an intravenous myeloablative agent prior to stem cell transplantation: 500 mg/m² as a optimal total dose for conditioning. *Bone Marrow Transplant* 30: 833-41, 2002
- Hassan, M., Oberg, G., Bekassy, A. N., Aschan, J., Ehrsson, H., Ljungman, P., Lonnerholm, G., Smedmyr, B., Taube, A., Wallin, I., and et al.: Pharmacokinetics of high-dose busulphan in relation to age and chronopharmacology. *Cancer Chemother Pharmacol* 28: 130-4, 1991
- Hassan, M., Oberg, G., Bjorkholm, M., Wallin, I., and Lindgren, M.: Influence of prophylactic anticonvulsant therapy on high-dose busulphan kinetics. *Cancer Chemother Pharmacol* 33: 181-6, 1993
- Hassan, M., Oberg, G., Ericson, K., Ehrsson, H., Eriksson, L., Ingvar, M., Stone-Elander, S., Thorell, J. O., Smedmyr, B., Warne, N., and et al.: In vivo distribution of

- [11C]-busulfan in cynomolgus monkey and in the brain of a human patient. *Cancer Chemother Pharmacol* 30: 81-5, 1992
- Hassan, Z., Ljungman, P., Ringden, O., Winiarski, J., Nilsson, C., Aschan, J., Whitley, H. R., and Hassan, M.: Pharmacokinetics of liposomal busulphan in man. *Bone Marrow Transplant* 27: 479-85, 2001
- Heiskanen, P., Billig, H., Toppari, J., Kaleva, M., Arsalo, A., Rapola, J., and Dunkel, L.: Apoptotic cell death in the normal and cryptorchid human testis: the effect of human chorionic gonadotropin on testicular cell survival. *Pediatr Res* 40: 351-6, 1996
- Helfand, B. T., Chang, L., and Goldman, R. D.: Intermediate filaments are dynamic and motile elements of cellular architecture. *J Cell Sci* 117: 133-41, 2004
- Hellani, A., Ji, J., Mauduit, C., Deschildre, C., Tabone, E., and Benahmed, M.: Developmental and hormonal regulation of the expression of oligodendrocyte-specific protein/claudin 11 in mouse testis. *Endocrinology* 141: 3012-9, 2000
- Henriksen, K., Hakovirta, H., and Parvinen, M.: In-situ quantification of stage-specific apoptosis in the rat seminiferous epithelium: effects of short-term experimental cryptorchidism. *Int J Androl* 18: 256-62, 1995
- Herve, J. C., Bourmeyster, N., and Sarrouilhe, D.: Diversity in protein-protein interactions of connexins: emerging roles. *Biochim Biophys Acta* 1662: 22-41, 2004
- Hoffmann, A. M., Bergh, A., and Olivecrona, T.: Changes of testicular cholesteryl ester hydrolase activity in experimentally cryptorchid rats. *J Reprod Fertil* 86: 11-8, 1989
- Hough, C. D., Sherman-Baust, C. A., Pizer, E. S., Montz, F. J., Im, D. D., Rosenshein, N. B., Cho, K. R., Riggins, G. J., and Morin, P. J.: Large-scale serial analysis of gene expression reveals genes differentially expressed in ovarian cancer. *Cancer Res* 60: 6281-7, 2000
- Huff, D. S., Hadziselimovic, F., Snyder, H. M., 3rd, Blythe, B., and Duckett, J. W.: Histologic maldevelopment of unilaterally cryptorchid testes and their descended partners. *Eur J Pediatr* 152 Suppl 2: S11-4, 1993
- Hutson, J. M., Hasthorpe, S., and Heyns, C. F.: Anatomical and functional aspects of testicular descent and cryptorchidism. *Endocr Rev* 18: 259-80, 1997
- Chen, Y., Lu, Q., Schneeberger, E. E., and Goodenough, D. A.: Restoration of tight junction structure and barrier function by down-regulation of the mitogen-activated protein kinase pathway in ras-transformed Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell* 11: 849-62, 2000
- Chen, Y., Merzdorf, C., Paul, D. L., and Goodenough, D. A.: COOH terminus of occludin is required for tight junction barrier function in early *Xenopus* embryos. *J Cell Biol* 138: 891-9, 1997
- Cheng, C. Y. and Mruk, D. D.: Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiol Rev* 82: 825-74, 2002
- Chieffi, P., Franco, R., Fulgione, D., and Staibano, S.: PCNA in the testis of the frog, *Rana esculenta*: a molecular marker of the mitotic testicular epithelium proliferation. *Gen Comp Endocrinol* 119: 11-6, 2000

- Choongkittaworn, N. M., Kim, K. H., Danner, D. B., and Griswold, M. D.: Expression of prohibitin in rat seminiferous epithelium. *Biol Reprod* 49: 300-10, 1993
- Chung, N. P. and 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? *Endocrinology* 142: 1878-88, 2001
- Chung, S. S., Mo, M. Y., Silvestrini, B., Lee, W. M., and Cheng, C. Y.: Rat testicular N-cadherin: its complementary deoxyribonucleic acid cloning and regulation. *Endocrinology* 139: 1853-62, 1998
- Iizuka, A., Park, M. K., and Mori, T.: Effects of unilateral cryptorchidism on the expression of gonadotropin receptor mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 221: 290-4, 1996
- Ikeda, M., Kodama, H., Fukuda, J., Shimizu, Y., Murata, M., Kumagai, J., and Tanaka, T.: Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. *Biol Reprod* 61: 393-9, 1999a
- Ikeda, W., Nakanishi, H., Miyoshi, J., Mandai, K., Ishizaki, H., Tanaka, M., Togawa, A., Takahashi, K., Nishioka, H., Yoshida, H., Mizoguchi, A., Nishikawa, S., and Takai, Y.: Afadin: A key molecule essential for structural organization of cell-cell junctions of polarized epithelia during embryogenesis. *J Cell Biol* 146: 1117-32, 1999b
- Ikonen, E., Fiedler, K., Parton, R. G., and Simons, K.: Prohibitin, an antiproliferative protein, is localized to mitochondria. *FEBS Lett* 358: 273-7, 1995
- Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M., and Tsukita, S.: Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol* 147: 1351-63, 1999a
- Itoh, M., Morita, K., and Tsukita, S.: Characterization of ZO-2 as a MAGUK family member associated with tight as well as adherens junctions with a binding affinity to occludin and alpha catenin. *J Biol Chem* 274: 5981-6, 1999b
- Janssens, B., Mohapatra, B., Vatta, M., Goossens, S., Vanpoucke, G., Kools, P., Montoye, T., van Hengel, J., Bowles, N. E., van Roy, F., and Towbin, J. A.: Assessment of the CTNNA3 gene encoding human alpha T-catenin regarding its involvement in dilated cardiomyopathy. *Hum Genet* 112: 227-36, 2003
- Jiang, F. X.: Behaviour of spermatogonia following recovery from busulfan treatment in the rat. *Anat Embryol (Berl)* 198: 53-61, 1998
- Johnson, K. J. and Boekelheide, K.: Dynamic testicular adhesion junctions are immunologically unique. I. Localization of p120 catenin in rat testis. *Biol Reprod* 66: 983-91, 2002
- Johnson, K. J., Patel, S. R., and Boekelheide, K.: Multiple cadherin superfamily members with unique expression profiles are produced in rat testis. *Endocrinology* 141: 675-83, 2000
- Junnqueira, C., Carneiro, J., and Kelley, R.: *Základy histologie*, pp. 63-68, 402-417, H&H, Jinočany, 1999
- Kanatsu-Shinohara, M., Toyokuni, S., Morimoto, T., Matsui, S., Honjo, T., and Shinohara, T.: Functional assessment of self-renewal activity of male germline stem cells following cytotoxic damage and serial transplantation. *Biol Reprod* 68: 1801-7, 2003

- Kausch, I. and Bohle, A.: Molecular aspects of bladder cancer III. Prognostic markers of bladder cancer. *Eur Urol* 41: 15-29, 2002
- Keon, B. H., Schafer, S., Kuhn, C., Grund, C., and Franke, W. W.: Symplekin, a novel type of tight junction plaque protein. *J Cell Biol* 134: 1003-18, 1996
- Kihara, A., Akiyama, Y., and Ito, K.: A protease complex in the Escherichia coli plasma membrane: HflKC (HflA) forms a complex with FtsH (HflB), regulating its proteolytic activity against SecY. *Embo J* 15: 6122-31, 1996
- Kill, I. R.: Localisation of the Ki-67 antigen within the nucleolus. Evidence for a fibrillarin-deficient region of the dense fibrillar component. *J Cell Sci* 109 (Pt 6): 1253-63, 1996
- Klener, P.: Protinádorová chemoterapie, 1. vydání. Galén, Praha, 1996
- Klika, E.: *Embryologie - učebnice pro lékařské fakulty*, pp. 15-20, Avicenum, Praha, 1986
- Klonisch, T., Fowler, P. A., and Hombach-Klonisch, S.: Molecular and genetic regulation of testis descent and external genitalia development. *Dev Biol* 270: 1-18, 2004
- Kocak, I., Dundar, M., Hekimgil, M., and Okyay, P.: Assessment of germ cell apoptosis in cryptorchid rats. *Asian J Androl* 4: 183-6, 2002
- Koch, M., Olson, P. F., A., A., Jin, W., Hunter, D. D., Brunken, W. J., Burgeson, R. E., and Champlaud, M. F.: Characterization and expression of the laminin gamma3-chain: a novel, non-basement membrane-associated, laminin chain. *Curr Opin Cell Biol* 6: 682-687, 1999
- Konrádová, V., Uhlík, J., and Vajner, L.: *Funkční histologie*, pp. 291, H&H, Jinočany, 2000
- Kubiček, V.: Infertility of men and assisted reproduction - part I. *Gynekolog* 6: 185-190, 1997
- Kumagai, A., Kodama, H., Kumagai, J., Fukuda, J., Kawamura, K., Tanikawa, H., Sato, N., and Tanaka, T.: Xanthine oxidase inhibitors suppress testicular germ cell apoptosis induced by experimental cryptorchidism. *Mol Hum Reprod* 8: 118-23, 2002
- Lalouette, A., Lablack, A., Guenet, J. L., Montagutelli, X., and Segretain, D.: Male sterility caused by sperm cell-specific structural abnormalities in ebouiriffe, a new mutation of the house mouse. *Biol Reprod* 55: 355-63, 1996
- Lampe, P. D. and Lau, A. F.: The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 1171-86, 2004
- Laslett, A. L., Li, L. H., Jester, W. F., Jr., and Orth, J. M.: Thyroid hormone down-regulates neural cell adhesion molecule expression and affects attachment of gonocytes in Sertoli cell-gonocyte cocultures. *Endocrinology* 141: 1633-41, 2000
- Leblond, C. and Clermont, Y.: Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann NY Acad Sci* 55: 548-573, 1952
- Lee, N. P., Mruk, D., Lee, W. M., and Cheng, C. Y.: Is the cadherin/catenin complex a functional unit of cell-cell actin-based adherens junctions in the rat testis? *Biol Reprod* 68: 489-508, 2003
- Lee, P. A. and Coughlin, M. T.: Fertility after bilateral cryptorchidism. Evaluation by paternity, hormone, and semen data. *Horm Res* 55: 28-32, 2001

- Leissner, J., Filipas, D., Wolf, H. K., and Fisch, M.: The undescended testis: considerations and impact on fertility. *BJU Int* 83: 885-91; quiz 891-2, 1999
- Li, S. W., Zheng, X. M., Zheng, H., Hu, L. Q., and Zhu, X. S.: [The effect of nitric oxide and total antioxidant capacity on the germ cell apoptosis in the rat cryptorchid]. *Zhonghua Nan Ke Xue* 9: 175-7, 2003
- Liang, J. H., Sankai, T., Yoshida, T., and Yoshikawa, Y.: Immunolocalization of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) testes during postnatal development. *J Med Primatol* 30: 107-11, 2001
- Liao, H., Winkfein, R. J., Mack, G., Rattner, J. B., and Yen, T. J.: CENP-F is a protein of the nuclear matrix that assembles onto kinetochores at late G2 and is rapidly degraded after mitosis. *J Cell Biol* 130: 507-18, 1995
- Lin, L. H. and DePhilip, R. M.: Differential expression of placental (P)-cadherin in sertoli cells and peritubular myoid cells during postnatal development of the mouse testis. *Anat Rec* 244: 155-64, 1996
- Liu, S. C. and Klein-Szanto, A. J.: Markers of proliferation in normal and leukoplakic oral epithelia. *Oral Oncol* 36: 145-51, 2000
- Lui, W. Y., Mruk, D., Lee, W. M., and Cheng, C. Y.: Sertoli cell tight junction dynamics: their regulation during spermatogenesis. *Biol Reprod* 68: 1087-97, 2003
- Lynch, R. D., Tkachuk-Ross, L. J., McCormack, J. M., McCarthy, K. M., Rogers, R. A., and Schneeberger, E. E.: Basolateral but not apical application of protease results in a rapid rise of transepithelial electrical resistance and formation of aberrant tight junction strands in MDCK cells. *Eur J Cell Biol* 66: 257-67, 1995
- Maekawa, M., Kazama, H., Kamimura, K., and Nagano, T.: Changes in the arrangement of actin filaments in myoid cells and Sertoli cells of rat testes during postnatal development and after experimental cryptorchidism. *Anat Rec* 241: 59-69, 1995
- Marek, J. and kol., a.: *Farmakoterapie vnitřních nemocí. 2. přepracované a rozšířené vydání*, pp. 557, Grada Publishing, Praha, 1998
- Martin-Padura, I., Lostaglio, S., Schneemann, M., Williams, L., Romano, M., Fruscella, P., Panzeri, C., Stoppacciaro, A., Ruco, L., Villa, A., Simmons, D., and Dejana, E.: Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* 142: 117-27, 1998
- Mendis-Handagama, S. M., Kerr, J. B., and de Kretser, D. M.: Experimental cryptorchidism in the adult mouse: II. A hormonal study. *J Androl* 11: 548-54, 1990
- Meyer, T. N., Schwesinger, C., and Denker, B. M.: Zonula occludens-1 is a scaffolding protein for signaling molecules. Galpha(12) directly binds to the Src homology 3 domain and regulates paracellular permeability in epithelial cells. *J Biol Chem* 277: 24855-8, 2002
- Miething, A.: Germ-cell death during prespermatogenesis in the testis of the golden hamster. *Cell Tissue Res* 267: 583-90, 1992

- Miwa, N., Furuse, M., Tsukita, S., Niikawa, N., Nakamura, Y., and Furukawa, Y.: Involvement of claudin-1 in the beta-catenin/Tcf signaling pathway and its frequent upregulation in human colorectal cancers. *Oncol Res* 12: 469-76, 2000
- Moisan, A. E., Foster, R. A., Betteridge, K. J., and Hahnel, A. C.: Dose-response of RAG2-/-/gammaC-/- mice to busulfan in preparation for spermatogonial transplantation. *Reproduction* 126: 205-16, 2003
- Mok, B. W., Yeung, W. S., and Luk, J. M.: Differential expression of gap-junction gene connexin 31 in seminiferous epithelium of rat testes. *FEBS Lett* 453: 243-8, 1999
- Montano, M. M., Ekena, K., Delage-Mourroux, R., Chang, W., Martini, P., and Katzenellenbogen, B. S.: An estrogen receptor-selective coregulator that potentiates the effectiveness of antiestrogens and represses the activity of estrogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 6947-52, 1999
- Morita, K., Sasaki, H., Fujimoto, K., Furuse, M., and Tsukita, S.: Claudin-11/OSP-based tight junctions of myelin sheaths in brain and Sertoli cells in testis. *J Cell Biol* 145: 579-88, 1999
- Moroi, S., Saitou, M., Fujimoto, K., Sakakibara, A., Furuse, M., Yoshida, O., and Tsukita, S.: Occludin is concentrated at tight junctions of mouse/rat but not human/guinea pig Sertoli cells in testes. *Am J Physiol* 274: C1708-17, 1998
- Mulholland, D. J., Dedhar, S., and Vogl, A. W.: Rat seminiferous epithelium contains a unique junction (Ectoplasmic specialization) with signaling properties both of cell/cell and cell/matrix junctions. *Biol Reprod* 64: 396-407, 2001
- Munro, S. B. and Blaschuk, O. W.: A comprehensive survey of the cadherins expressed in the testes of fetal, immature, and adult mice utilizing the polymerase chain reaction. *Biol Reprod* 55: 822-7, 1996
- Nachtigal, P., Gojová, A., and Semecký, V.: The role of epithelial and vascular/endothelial cadherin in the differentiation and maintenance of tissue integrity. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 44: 83-87, 2001
- Nakanishi, Y. and Shiratsuchi, A.: Phagocytic removal of apoptotic spermatogenic cells by Sertoli cells: mechanisms and consequences. *Biol Pharm Bull* 27: 13-6, 2004
- Newton, S. C., Blaschuk, O. W., and Millette, C. F.: N-cadherin mediates Sertoli cell-spermatogenic cell adhesion. *Dev Dyn* 197: 1-13, 1993
- Nijtmans, L. G., Artal, S. M., Grivell, L. A., and Coates, P. J.: The mitochondrial PHB complex: roles in mitochondrial respiratory complex assembly, ageing and degenerative disease. *Cell Mol Life Sci* 59: 143-55, 2002
- Nijtmans, L. G., de Jong, L., Artal Sanz, M., Coates, P. J., Berden, J. A., Back, J. W., Muijsers, A. O., van der Spek, H., and Grivell, L. A.: Prohibitins act as a membrane-bound chaperone for the stabilization of mitochondrial proteins. *Embo J* 19: 2444-51, 2000
- Nuell, M. J., Stewart, D. A., Walker, L., Friedman, V., Wood, C. M., Owens, G. A., Smith, J. R., Schneider, E. L., Dell'Orco, R., Lumpkin, C. K., and et al.: Prohibitin, an evolutionarily conserved intracellular protein that blocks DNA synthesis in normal fibroblasts and HeLa cells. *Mol Cell Biol* 11: 1372-81, 1991

- O'Donnell, L., Stanton, P. G., Bartles, J. R., and Robertson, D. M.: Sertoli cell ectoplasmic specializations in the seminiferous epithelium of the testosterone-suppressed adult rat. *Biol Reprod* 63: 99-108, 2000
- Ogi, S., Tanji, N., Yokoyama, M., Takeuchi, M., and Terada, N.: Involvement of Fas in the apoptosis of mouse germ cells induced by experimental cryptorchidism. *Urol Res* 26: 17-21, 1998
- Ohta, H., Aizawa, S., and Nishimune, Y.: Functional analysis of the p53 gene in apoptosis induced by heat stress or loss of stem cell factor signaling in mouse male germ cells. *Biol Reprod* 68: 2249-54, 2003
- Orth, J. M., Gunsalus, G. L., and Lamperti, A. A.: Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology* 122: 787-94, 1988
- Orth, J. M., Jester, W. F., Li, L. H., and Laslett, A. L.: Gonocyte-Sertoli cell interactions during development of the neonatal rodent testis. *Curr Top Dev Biol* 50: 103-24, 2000
- Ozaki, H., Ishii, K., Horiuchi, H., Arai, H., Kawamoto, T., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Kita, T.: Cutting edge: combined treatment of TNF-alpha and IFN-gamma causes redistribution of junctional adhesion molecule in human endothelial cells. *J Immunol* 163: 553-7, 1999
- Ozaki-Kuroda, K., Nakanishi, H., Ohta, K., Tanaka, H., Kurihara, H., Mueller, S., Irie, K., Ikeda, W., Sakai, T., Wimmer, E., Nishimune, Y., and Takai, Y.: Nectin couples cell-cell adhesion and actin scaffold at heterotypic testicular junctions. *Curr Biol* 12: 1145-1150, 2002
- Paramio, J. M. and Jorcano, J. L.: Beyond structure: do intermediate filaments modulate cell signalling? *Bioessays* 24: 836-44, 2002
- Paranko, J., Kallajoki, M., Pelliniemi, L. J., Lehto, V. P., and Virtanen, I.: Transient coexpression of cytokeratin and vimentin in differentiating rat Sertoli cells. *Dev Biol* 117: 35-44, 1986
- Pearson, C., Lamar, P., and Prozialeck, W.: Effects of cadmium on E-cadherin and VE-cadherin in mouse lung. *Life Sci* 72: 1303-1320, 2003
- Pelletier, R. M.: The distribution of connexin 43 is associated with the germ cell differentiation and with the modulation of the Sertoli cell junctional barrier in continual (guinea pig) and seasonal breeders' (mink) testes. *J Androl* 16: 400-9, 1995
- Pelliniemi, L. J. and Frojzman, K.: Structural and regulatory macromolecules in sex differentiation of gonads. *J Exp Zool* 290: 523-8, 2001
- Perez-Armendariz, E. M., Romano, M. C., Luna, J., Miranda, C., Bennett, M. V., and Moreno, A. P.: Characterization of gap junctions between pairs of Leydig cells from mouse testis. *Am J Physiol* 267: C570-80, 1994
- Perryman, K. J., Stanton, P. G., Loveland, K. L., McLachlan, R. I., and Robertson, D. M.: Hormonal dependency of neural cadherin in the binding of round spermatids to Sertoli cells in vitro. *Endocrinology* 137: 3877-83, 1996

- Plum, A., Hallas, G., Magin, T., Dombrowski, F., Hagendorff, A., Schumacher, B., Wolpert, C., Kim, J., Lamers, W. H., Evert, M., Meda, P., Traub, O., and Willecke, K.: Unique and shared functions of different connexins in mice. *Curr Biol* 10: 1083-91, 2000
- Prozialeck, W., Grunwald, G., Dey, P., Reuhl, K., and Parrish, A.: Cadherins and NCAM as potential targets in metal toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 182: 255-265, 2002
- Riccioli, A., Salvati, L., D'Alessio, A., Starace, D., Giampietri, C., De Cesaris, P., Filippini, A., and Ziparo, E.: The Fas system in the seminiferous epithelium and its possible extra-testicular role. *Andrologia* 35: 64-70, 2003
- Richburg, J. H. and Boekelheide, K.: Mono-(2-ethylhexyl) phthalate rapidly alters both Sertoli cell vimentin filaments and germ cell apoptosis in young rat testes. *Toxicol Appl Pharmacol* 137: 42-50, 1996
- Richburg, J. H., Johnson, K. J., Schoenfeld, H. A., Meistrich, M. L., and Dix, D. J.: Defining the cellular and molecular mechanisms of toxicant action in the testis. *Toxicol Lett* 135: 167-83, 2002
- Risley, M. S.: Connexin gene expression in seminiferous tubules of the Sprague-Dawley rat. *Biol Reprod* 62: 748-54, 2000
- Risley, M. S., Tan, I. P., Roy, C., and Saez, J. C.: Cell-, age- and stage-dependent distribution of connexin43 gap junctions in testes. *J Cell Sci* 103 (Pt 1): 81-96, 1992
- Rogatsch, H., Jezek, D., Hittmair, A., Mikuz, G., and Feichtinger, H.: Expression of vimentin, cytokeratin, and desmin in Sertoli cells of human fetal, cryptorchid, and tumour-adjacent testicular tissue. *Virchows Arch* 427: 497-502, 1996
- Roscoe, W. A., Barr, K. J., Mhawi, A. A., Pomerantz, D. K., and Kidder, G. M.: Failure of spermatogenesis in mice lacking connexin43. *Biol Reprod* 65: 829-38, 2001
- Russell, L.: Observations on rat Sertoli ectoplasmic ('junctional') specializations in their association with germ cells of the rat testis. *Tissue Cell* 9: 475-98, 1977
- Saito, S. and Kumamoto, Y.: The number of spermatogonia in various congenital testicular disorders. *J Urol* 141: 1166-8, 1989
- Saitou, M., Fujimoto, K., Doi, Y., Itoh, M., Fujimoto, T., Furuse, M., Takano, H., Noda, T., and Tsukita, S.: Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J Cell Biol* 141: 397-408, 1998
- Saitou, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J. D., Fromm, M., Takano, H., Noda, T., and Tsukita, S.: Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell* 11: 4131-42, 2000
- Santamaria, L., Martin, R., Codesal, J., and Paniagua, R.: Myoid cell proliferation in rat seminiferous tubules after ischaemic testicular atrophy induced by epinephrine. Morphometric and immunohistochemical (bromo-deoxyuridine and PCNA) studies. *Int J Androl* 18: 13-22, 1995
- Santra, K. B. and Manna, C. K.: Antifertility effects of methylmethane sulphonate on male reproductive organs of wild Indian house rat: histological and histochemical characteristics. *Endocr Regul* 36: 123-131, 2002

- Sato, T., Saito, H., Swensen, J., Olifant, A., Wood, C., Danner, D., Sakamoto, T., Takita, K., Kasumi, F., Miki, Y., and et al.: The human prohibitin gene located on chromosome 17q21 is mutated in sporadic breast cancer. *Cancer Res* 52: 1643-6, 1992
- Savill, J. and Fadok, V.: Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407: 784-8, 2000
- Segretain, D. and Falk, M. M.: Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal. *Biochim Biophys Acta* 1662: 3-21, 2004
- Sharpe, R.: Lifestyle and environmental contribution to male infertility. *Br Med Bull* 56: 630, 2000
- Sharpe, R. M., McKinnell, C., Kivlin, C., and Fisher, J. S.: Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* 125: 769-84, 2003
- Sharpe, R. M., Millar, M., and McKinnell, C.: Relative roles of testosterone and the germ cell complement in determining stage-dependent changes in protein secretion by isolated rat seminiferous tubules. *Int J Androl* 16: 71-81, 1993
- Shibata, Y., Kumai, M., Nishii, K., and Nakamura, K.: Diversity and molecular anatomy of gap junctions. *Med Electron Microsc* 34: 153-9, 2001
- Show, M. D., Anway, M. D., Folmer, J. S., and Zirkin, B. R.: Reduced intratesticular testosterone concentration alters the polymerization state of the Sertoli cell intermediate filament cytoskeleton by degradation of vimentin. *Endocrinology* 144: 5530-6, 2003
- Schinkel, A. H.: The roles of P-glycoprotein and MRP1 in the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. *Adv Exp Med Biol* 500: 365-72, 2001
- Schlatt, S. and Weinbauer, G. F.: Immunohistochemical localization of proliferating cell nuclear antigen as a tool to study cell proliferation in rodent and primate testes. *Int J Androl* 17: 214-22, 1994
- Scholzen, T. and Gerdes, J.: The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182: 311-22, 2000
- Schuler, U. S., Renner, U. D., Kroschinsky, F., Johne, C., Jenke, A., Naumann, R., Bornhauser, M., Deeg, H. J., and Ehninger, G.: Intravenous busulphan for conditioning before autologous or allogeneic human blood stem cell transplantation. *Br J Haematol* 114: 944-50, 2001
- Silbernagl, S. and Lang, F.: *Atlas patofyziologie člověka*, pp. 272-273, Grada, Praha, 2001
- Simon, D. B., Lu, Y., Choate, K. A., Velazquez, H., Al-Sabban, E., Praga, M., Casari, G., Bettinelli, A., Colussi, G., Rodriguez-Soriano, J., McCredie, D., Milford, D., Sanjad, S., and Lifton, R. P.: Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption. *Science* 285: 103-6, 1999
- Siu, M. K., Mruk, D. D., Lee, W. M., and Cheng, C. Y.: Adhering junction dynamics in the testis are regulated by an interplay of beta 1-integrin and focal adhesion complex-associated proteins. *Endocrinology* 144: 2141-63, 2003
- Spruill, W. A., Steiner, A. L., Tres, L. L., and Kierszenbaum, A. L.: Follicle-stimulating hormone-dependent phosphorylation of vimentin in cultures of rat Sertoli cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 993-7, 1983

- Steger, K., Aleithe, I., Behre, H., and Bergmann, M.: The proliferation of spermatogonia in normal and pathological human seminiferous epithelium: an immunohistochemical study using monoclonal antibodies against Ki-67 protein and proliferating cell nuclear antigen. *Mol Hum Reprod* 4: 227-33, 1998
- Steger, K., Rey, R., Kliesch, S., Louis, F., Schleicher, G., and Bergmann, M.: Immunohistochemical detection of immature Sertoli cell markers in testicular tissue of infertile adult men: a preliminary study. *Int J Androl* 19: 122-8, 1996
- Stelwagen, K., McFadden, H. A., and Demmer, J.: Prolactin, alone or in combination with glucocorticoids, enhances tight junction formation and expression of the tight junction protein occludin in mammary cells. *Mol Cell Endocrinol* 156: 55-61, 1999
- Suarez-Quian, C. A., Martinez-Garcia, F., Nistal, M., and Regadera, J.: Androgen receptor distribution in adult human testis. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 350-8, 1999
- Suominen, J. S., Linderborg, J., Nikula, H., Hakovirta, H., Parvinen, M., and Toppari, J.: The effects of mono-2-ethylhexyl phthalate, adriamycin and N-ethyl-N-nitrosourea on stage-specific apoptosis and DNA synthesis in the mouse spermatogenesis. *Toxicol Lett* 143: 163-73, 2003
- Suter, L., Koch, E., Bechter, R., and Bobadilla, M.: Three-parameter flow cytometric analysis of rat spermatogenesis. *Cytometry* 27: 161-8, 1997
- Takai, Y. and Nakanishi, H.: Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions. *J Cell Sci* 116: 17-27, 2003
- Tan, I. P., Roy, C., Saez, J. C., Saez, C. G., Paul, D. L., and Risley, M. S.: Regulated assembly of connexin33 and connexin43 into rat Sertoli cell gap junctions. *Biol Reprod* 54: 1300-10, 1996
- Tanaka, H., Fujisawa, M., Okada, H., Arakawa, S., and Kamidono, S.: Assessment of germ-cell kinetics in the testes of patients with varicocele using image analysis of immunostained proliferating cell nuclear antigen. *Br J Urol* 78: 769-71, 1996
- Terashima, M., Kim, K. M., Adachi, T., Nielsen, P. J., Reth, M., Kohler, G., and Lamers, M. C.: The IgM antigen receptor of B lymphocytes is associated with prohibitin and a prohibitin-related protein. *Embo J* 13: 3782-92, 1994
- Tramontano, F., Malanga, M., Farina, B., Jones, R., and Quesada, P.: Heat stress reduces poly(ADPR)polymerase expression in rat testis. *Mol Hum Reprod* 6: 575-81, 2000
- Traweger, A., Fang, D., Liu, Y. C., Stelzhammer, W., Krizbai, I. A., Fresser, F., Bauer, H. C., and Bauer, H.: The tight junction-specific protein occludin is a functional target of the E3 ubiquitin-protein ligase itch. *J Biol Chem* 277: 10201-8, 2002
- Tsukita, S. and Furuse, M.: Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. *J Cell Biol* 149: 13-6, 2000
- Turner, K. J., Macpherson, S., Millar, M. R., McNeilly, A. S., Williams, K., Cranfield, M., Groome, N. P., Sharpe, R. M., Fraser, H. M., and Saunders, P. T.: Development and validation of a new monoclonal antibody to mammalian aromatase. *J Endocrinol* 172: 21-30, 2002
- Vleminckx K, K. R.: Cadherins and tissue formation:integrating adhesion and signalling. *Bioessays* 21: 211-220, 1999

- Wan, H., Winton, H. L., Soeller, C., Tovey, E. R., Gruenert, D. C., Thompson, P. J., Stewart, G. A., Taylor, G. W., Garrod, D. R., Cannell, M. B., and Robinson, C.: Der p 1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions. *J Clin Invest* 104: 123-33, 1999
- Wang, S., Nath, N., Adlam, M., and Chellappan, S.: Prohibitin, a potential tumor suppressor, interacts with RB and regulates E2F function. *Oncogene* 18: 3501-10, 1999a
- Wang, S., Nath, N., Fusaro, G., and Chellappan, S.: Rb and prohibitin target distinct regions of E2F1 for repression and respond to different upstream signals. *Mol Cell Biol* 19: 7447-60, 1999b
- Wang, S., Zhang, B., and Faller, D. V.: Prohibitin requires Brg-1 and Brm for the repression of E2F and cell growth. *Embo J* 21: 3019-28, 2002a
- Wang, Z. Q., Todani, T., Watanabe, Y., Toki, A., Ogura, K., Miyamoto, O., Toyoshima, T., and Itano, T.: Germ-cell degeneration in experimental unilateral cryptorchidism: role of apoptosis. *Pediatr Surg Int* 14: 9-13, 1998
- Wang, Z. Q., Watanabe, Y., Toki, A., and Itano, T.: Altered distribution of Sertoli cell vimentin and increased apoptosis in cryptorchid rats. *J Pediatr Surg* 37: 648-52, 2002b
- Watabe-Uchida, M., Uchida, N., Imamura, Y., Nagafuchi, A., Fujimoto, K., Uemura, T., Vermeulen, S., van Roy, F., Adamson, E. D., and Takeichi, M.: alpha-Catenin-vinculin interaction functions to organize the apical junctional complex in epithelial cells. *J Cell Biol* 142: 847-57, 1998
- Watts, L. M., Hasthorpe, S., Farmer, P. J., and Hutson, J. M.: Apoptotic cell death and fertility in three unilateral cryptorchid rat models. *Urol Res* 28: 332-7, 2000
- Welburn, S. C. and Murphy, N. B.: Prohibitin and RACK homologues are up-regulated in trypanosomes induced to undergo apoptosis and in naturally occurring terminally differentiated forms. *Cell Death Differ* 5: 615-22, 1998
- Wiebe, J. P., Kowalik, A., Gallardi, R. L., Egeler, O., and Clubb, B. H.: Glycerol disrupts tight junction-associated actin microfilaments, occludin, and microtubules in Sertoli cells. *J Androl* 21: 625-35, 2000
- Willecke, K., Eiberger, J., Degen, J., Eckardt, D., Romualdi, A., Guldenagel, M., Deutsch, U., and Sohl, G.: Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem* 383: 725-37, 2002
- Wine, R. and Chapin, R.: Adhesion and signaling proteins spatiotemporally associated with spermiation in rat. *J Androl* 20: 198-213, 1999
- Winters, S.: Seminiferous tubule androgen receptors in experimental cryptorchidism. *J Endocr* 8: 148-154, 1987
- Wistuba, J., Schlatt, S., Cantauw, C., von Schonfeldt, V., Nieschlag, E., and Behr, R.: Transplantation of wild-type spermatogonia leads to complete spermatogenesis in testes of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate response element modulator-deficient mice. *Biol Reprod* 67: 1052-7, 2002
- Wu, J. C., Gregory, C. W., and DePhilip, R. M.: Expression of E-cadherin in immature rat and mouse testis and in rat Sertoli cell cultures. *Biol Reprod* 49: 1353-61, 1993

- Wu, J. C., Tsai, R. Y., and Chung, T. H.: Role of catenins in the development of gap junctions in rat cardiomyocytes. *J Cell Biochem* 88: 823-35, 2003
- Yin, Y., Stahl, B. C., DeWolf, W. C., and Morgentaler, A.: P53 and Fas are sequential mechanisms of testicular germ cell apoptosis. *J Androl* 23: 64-70, 2002
- Yokoyama, K., Tachibana, T., Nakanishi, H., Yamamoto, K., Irie, Y., Mandai, K., Nagafuchi, A., Monden, M., and Takai, Y.: Alpha-catenin-independent recruitment of ZO-1 to nectin-based cell-cell adhesion sites through afadin. *Mol Biol Cell* 12: 1595-1609, 2001
- Yomogida, K., Ohtani, H., Harigae, H., Ito, E., Nishimune, Y., Engel, J. D., and Yamamoto, M.: Developmental stage- and spermatogenic cycle-specific expression of transcription factor GATA-1 in mouse Sertoli cells. *Development* 120: 1759-66, 1994
- Zakaria, O., Shono, T., Imajima, T., and Suita, S.: Comparative studies of fertility and histologic development of contralateral scrotal testes in two rat models of unilateral cryptorchidism. *Pediatr Surg Int* 16: 498-501, 2000
- Zeng, L., Kong, X. T., Su, J. W., Xia, T. L., Na, Y. Q., and Guo, Y. L.: Evaluation of germ-cell kinetics in infertile patients with proliferating cell nuclear antigen proliferating index. *Asian J Androl* 3: 63-6, 2001
- Zhang, Z. H., Jin, X., Zhang, X. S., Hu, Z. Y., Zou, R. J., Han, C. S., and Liu, Y. X.: Bcl-2 and Bax are involved in experimental cryptorchidism-induced testicular germ cell apoptosis in rhesus monkey. *Contraception* 68: 297-301, 2003
- Zhu, L. J., Zong, S. D., Phillips, D. M., Moo-Young, A. J., and Bardin, C. W.: Changes in the distribution of intermediate filaments in rat Sertoli cells during the seminiferous epithelium cycle and postnatal development. *Anat Rec* 248: 391-405, 1997
- Zini, A., Abitbol, J., Schulsinger, D., Goldstein, M., and Schlegel, P. N.: Restoration of spermatogenesis after scrotal replacement of experimentally cryptorchid rat testis: assessment of germ cell apoptosis and eNOS expression. *Urology* 53: 223-7, 1999