

aktivitou jakou u PHB předpokládají Wang et al (1999). Proti antiproliferativní teorii hraje zase fakt, že exprese PHB v Sertolho buňkách, které se již více nedělí a jsou v G0 fázi, byla mnohem slabší než exprese PHB ve spermatogoniích a spermatocytech. Nicméně, pozorování buněk s velmi silně pozitivním jádrem a zároven 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 prohlubina 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**

Člen této dizertační práce bylo posoudit vlivy modelového xenobiotika (busulfanu) a vliv operativně navozeného jednostranného kryptorchismu na morfologický obraz tkáně varlete potkana Wistar (stav zárodečného epitelu i intersticiální tkáň mezi semenotvornými kanálky), na spermatogenezi. Jako pokusný model ke sledování vlivu 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 (operací) na dobu od 6 hodin až po 121 dnů.

Výsledky lze shrnout do následující odstavci.

A. První změny jsme v zárodečném epitelu semenotvorných kanálků 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 splyvání těchto buněk do vícejaderných útvarů. Kanálky nadvarlat byly vyplněny tekutinou obsahující různé vyzrálé buňky zárodečné linie. Poškození spermatogeneze rezultovalo také ve snížení přiměné hmotnosti kryptorchizických varlat u operovaných zvířat, které jsme zaznamenali již pátý den po operaci. 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 a k vakolizaci Sertolliho buněk, zániku spermatogeneze a zmožení Leydigových buněk v intersticiu a. Cílem toxického účinku busulfanu byly mitoticky se dělící 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 provržena hmotnostním zvesupem.

C. Oběma experimentálními přístupy došlo k výrazným změnám v uspořádání cytoskeletárních vláken, především aktinových a vimentinových, v zárodečných buňkách. 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 spermaticy a spermaticy (od 2. - 3. dne trvání kryptorchismu a 7., resp. 14. den po podání druhé dávky busulfanu). Došlo ke kolapsu vimentinových vláken z apikálních výběžků Sertolliho buněk směrem k jádru a ke snížení exprese aktinu v adlumínálních částech zárodečného epitelu. Kryptorchismus ani podání busulfanu neovlivnilo expresi tubulinu v Sertolliho 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 varlate jsme pozorovali již po dvou dnech kryptorchismu. Po podání busulfanu došlo ke ztrátě exprese P-cadherinu v sementotromných kanálcích až v okamžiku vymizení spermaticid z epitelu (od 14. dne po podání druhé dávky busulfanu). Zda je odlučování spermaticid důsledkem poškození AJ, nebo poškození spermaticid postupně progreduje i v poškození membránových struktur včetně AJ, je otázka, která zůstává v naší práci nezdopovězena. Svoji roli zde hraje také poškození proteinů adherentních spojení a cytoskeletárních vláken ze strany Sertolliho buněk. Exprese E-cadherinu (přirodného především v intersticiální tkáni) se během experimentů výrazně nemění. 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, jímž 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 (proliferace markeru) jsme odhalili různé mechanismy poškození v obou modelech. U kryptorchických varlat nastalo od 3. dne masivní odumírání zárodečných buněk doloženo TUNEL pozitivitou. Zůstala však zachována PCNA aktivita v odloučených i v epitelu zbývajících buňkách. U busulfanem ovlivněných zvířat jsme TUNEL pozitivní buňky téměř nepozorovali s výjimkou spermatocytů, ale došlo k rychlému poklesu PCNA aktivity v sementotromných 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 spermaticytů s nezměněnou nebo sníženou expresí PHB objevovaly také velmi silně PHB pozitivní spermaticy s pozitivitou v jádrech (Tyto buňky byly TUNEL pozitivní). Na základě těchto výsledků a porovnání s výsledky analýzy exprese 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 portkana kmene Wistar) demonstrované v této práci jsou vhodné modely pro studium dílčích mechanismů poškození zárodečného epitelu varlate portkana.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- 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, příprava MYLERAN. 2004
- 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
- Albard, 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