

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

Katedra biologických a lékařských věd

DIPLOMOVÁ PRÁCE

APOPTÓZA ZÁRODEČNÝCH BUNĚK NAVOZENÁ ARTEFICIÁLNÍM KRYPTORCHISMEM

GERM CELL APOPTOSIS INDUCED BY ARTIFICIAL KRYPTORCHIDISM

Školitel: Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.

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

Hradec Králové, květen 2007

Josef Komrska

Práce byla realizována za podpory interního grantu UK,
registrační číslo 148/204.

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

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

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

Obsah.....	4
Seznam zkratk.....	6
Abstrakt.....	8
1. Cíl diplomové práce.....	10
2. Teoretická část.....	12
2.1. Stavba reprodukčního systému muže.....	13
2.1.1. Morfologie varlete a nadvarlete.....	13
2.1.2. Distální reprodukční trakt.....	14
2.2. Spermatogeneze.....	14
2.3. Cyklus zárodečného epitelu.....	18
2.4. Hormonální aspekty.....	19
2.4.1. Hypotalamus.....	20
2.4.2. Adenohypofýza.....	20
2.4.3. Varlata.....	21
2.5. Hematotestikulární bariéra.....	22
2.5.1. Struktura a funkce.....	22
2.5.2. Sertoliho buňky.....	23
2.5.3. Tight junctions a ostatní spoje.....	23
2.5.4. Bazální membrána a extracelulární matrix semenotvorného kanálku.....	26
2.5.5. Peritubulární myoidní buňky.....	29
2.6. Kryptorchismus a tepelný stres.....	31
2.6.1. Etiologie.....	31
2.6.2. Poškození kryptorchismem.....	32
2.6.3. Apoptóza a zárodečný epitel.....	35
2.6.4. Kryptorchismus a nádorová onemocnění.....	40
2.6.5. Kryptorchismus a proteiny tepelného šoku.....	41
2.6.6. Kryptorchismus a infertilita.....	42
2.6.7. Možnosti léčby kryptorchismu.....	43
2.6.8. Látky ovlivňující varlata.....	43
2.7. MDOCTM.....	45
3. Materiál a metody.....	46
3.1. Pokusná zvířata a navození experimentálního kryptorchismu.....	47
3.2. Odběr materiálu.....	47
3.3. Další materiál určený k analýze.....	48
3.4. Zpracování materiálu pro histologickou analýzu.....	48
3.4.1. Fixace.....	48
3.4.2. Odvodnění, projasnění, prosycení a zalití do parafinu.....	49
3.4.3. Krájení a lepení na podložní sklička.....	50
3.4.4. Barvení.....	51
3.4.5. Zamontování.....	55
3.4.6. Hodnocení.....	55
4. Výsledky.....	56
4.1. Makroskopické hodnocení odebraného materiálu.....	57
4.2. Histologické hodnocení odebraného materiálu.....	57
4.2.1. Kontrolní tkáň.....	57
4.2.2. Interval 1 hodina.....	58
4.2.3. Interval 24 hodin.....	58
4.2.4. Interval 48 hodin.....	59

4.2.5. Interval 6 dnů.....	59
4.2.6. Interval 7 dnů – po aplikaci MDOCTM.....	59
5. Diskuse	62
6. Závěr	67
7. Přílohy.....	70
7.1. Tabulková příloha	71
7.2. Obrazová příloha.....	73
7.2.1. Seznam obrázků.....	73
8. Literatura.....	87

Seznam zkratek:

DNA	deoxyribonukleová kyselina
TRAF	faktory asociované s TNF receptorem
TRAIL	TNF příbuzný ligand způsobující apoptózu
Sg.	spermatogonie
FSH	folikulostimulační hormon
LH	luteinizační hormon
ABP	androgen vážící protein
MIS	Müleriánská inhibiční substance
Tj's	těsné spoje
IGF	růstový faktor podobný insulinu
TGF- α a β	transformující růstový faktor
bFGF	bazický růstový faktor stimulující fibroblasty
IL-1	interleukin 1
SGF	semenotvorný růstový faktor
SGP 1 a 2	sulfatovaný glykoprotein
SSCs	spermatogoniální kmenové buňky
T-SP	vedlejší testikulární buňky
BM	bazální membrána
TNF α	tumor nekrotizující faktor alfa
MMP-9	matrixová metaloproteáza 9
TIMP-1	tkáňový inhibitor metaloproteázy 1
Ig-Cam	imunoglobulin-buněčná adhezivní molekula
FAK	fokální adhezivní kináza
ILK	s integrinem spojená kináza
SCF	faktor podporující růst kmenových buněk
NO	oxid dusný
NOS	oxid dusný syntáza
PARP	enzym katalyzující připojení adeninových polynukleotidů
HSP70-1	protein tepelného šoku 70kDa

hCG	lidský choriogonadotropin
mRNA	messenger ribonukleotidová kyselina
HSF	transkripční faktor proteinů tepelného šoku
GnRH	gonadoliberin

Abstrakt. Studovali jsme vliv experimentálního unilaterálního kryptorchismu na morfologické a histologické ukazatele ve tkáních varlat a nadvarlat skupiny samců potkana Wistar. Doba trvání experimentu byla 7 dnů, přičemž byla do kryptorchických varlat injikována látka MDOC™. Pro histologické hodnocení kratších časových intervalů jsme použili také materiál z jiných srovnatelných pokusů, ale bez MDOC™. Délka a hmotnost kryptorchických varlat byly významně sníženy v porovnání s kontrolami (22,4% a 52,6%). Degenerativní změny byly patrné již v intervalu jedné hodiny (desintegrace zárodečného epitelu). Nezralé zárodečné buňky včetně apoptotických jsme našli v lumen kanálku nadvarlete. 6. den jsme v zárodečném epitelu objevili také mnohojaderné buňky a jeho vakuolizaci. Po sedmi dnech s aplikací MDOC™ jsme našli významnou degeneraci zárodečného epitelu zahrnující mnoho znaků od vakuolizace epitelu po značné množství apoptotických buněk. Také jsme našli velké množství infiltrovaných makrofágů. Nezaznamenali jsme žádné degenerativní znaky u kontralaterálních kontrol, ani u kontroly, kde jsme opět vrátili varle do skrota (shame operated).

Abstract. We had studied morfological and histological changes of Wistar rat germinal epithelium after experimentally induced cryptorchidism. Our experiment had lasted seven days. Cryptorchic testes was injected by solution of MDOC™. We used also tissues which was taken from other comparable studies but without MDOC™ for histological evaluation of shorter time intervals. Both size and weight was significantly reduced in cryptorchid testes compared to contralateral and control testes (22.4% and 52.6% respectively). We recorded degenerative changes of germinal epithelium including epithelial desintegration and release of immature and apoptotic cells, which was found in epydidimal tubules, even in one hour interval. Six days after operation, multinucleated cells and vacuolization of epithlelium also appeared. Seven days after operation (and aplication MDOC™) we found a significant degeneration of germinal epithelium comprising features from vacuoles to apoptotic cells. A large number of macrophages also appeared in this interval. We didn't record any degenerative features in contralateral and control testes.

1. Cíl diplomové práce

Nacházíme se v období, kdy je lidská reprodukce v hledáčku celospolečenského zájmu. Pokud je lékařská věda postavena před problém její léčby, je nezbytně nutné získat co nejvíce informací o jejím poškození. Z hlediska mužské reprodukce je i Česká republika konfrontována s nepříznivými ukazateli.

Jedno z modelových poškození samčího reprodukčního systému studovaných na katedře biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy je experimentálně navozený unilaterální kryptorchismus. Kryptorchické poškození je u mužské části naší populace poměrně častým jevem, přičemž podobné poškození lze pozorovat i díky vlivu jiných faktorů.

Cílem této práce je prokázat a posoudit degenerativní změny zárodečného epitelu, které se odehrávají po navození experimentálního kryptorchismu, a to v několika časových intervalech. Výsledky našeho experimentu je nutné srovnávat s výsledky obsaženými v jiných odborných studiích.

2. Teoretická část

2.1. Stavba reprodukčního systému muže

2.1.1. Morfologie varlete a nadvarlete

Varle (testis, orchis) je párový orgán elipsoidního tvaru uložený v šourku (scrotum). Varle je umístěno ve svislé poloze a na jeho zadní stranu přiléhá protáhlé nadvarle. Ve svislém směru měří varle 4-5 cm. Jeho hmotnost se pohybuje mezi osmnácti a dvaceti pěti centimetry, přičemž levé varle bývá větší a těžší. Varle je spolu s částí nadvarlete pokryto serózní membránou, zvanou tunica vaginalis. Zadní okraj varlete není touto membránou krytý. Vnitřní část tuniky se nazývá epiorchium a je v kontaktu s varlem. Vnější část tuniky, periorchium, vystýlá dutinu skrota, v níž je varle uloženo. Povrch varlete je tvořen lesklou tuhou membránou (tunica albuginea).

Od tunica albuginea se směrem k zadní straně sbíhají vazivové přepážky (septula testis), které neúplně rozdělují varle na lalůčky (lobuli testis). Ty směřují k hilu varlete, což je místo výstupu a vstupu cév a výstupu vývodných kanálků. V lobuli testis se nacházejí stočené semenotvorné kanálky (tubuli seminiferi contorti, které se při hrotu lalůčky sbíhají v jeden kanálek - tubulus seminifer rectus). Tyto kanálky tvoří v hilu varlete navzájem propojenou síť (rete testis). Z rete testis vystupují vývodné kanálky (ductuli efferentes testis), které vedou do hlavy nadvarlete.

Nadvarle (epididymis) je protáhlého tvaru a přisedá na zadní stranu varlete. Anatomicky je členěno na hlavu, tělo a ohon (caput, corpus, cauda). Cauda přechází do chámovodu (ductus deferens). Z ductuli efferentes testis, které vstupují do caput epididymidis, vzniká 10-12 kanálků tvořících lalůčky nadvarlete. Každý takový lalůček obsahuje stočený kanálek. Tyto stočené kanálky se ze strany

napojují na ductus epididymidis, který na konci cauda navazuje na ductus deferens.^{1, 29}

2.1.2. Distální reprodukční trakt

Z nadvarlete vychází chámovod a postupuje skrotem směrem kraniálně. Prochází tříselným kanálem, dále pod peritoneem pánve dozadu podél močového měchýře, za nímž se stáčí kaudálně a mediálně směrem k prostatě. Před prostatou se rozšiřuje jako ampula ductus deferentis. Pravý i levý ductus deferens se zanořují do zadního horního okraje prostaty, kde se spojují s vývody semených váčků (vesiculae seminales). Od spojení s vývodem semeného váčku se ductus deferens nazývá ductus ejaculatorius. Ten prochází prostatou a vstupuje do močové trubice. Močová trubice končí jako ostium urethrae externum (zevní ústí) na vrcholu žaludu (glans penis).¹

2.2. Spermatogeneze

Spermatogeneze probíhá ve stěně stočených kanálků. Zevně kanálky obklopuje tunica propria, která se skládá z lymfatického endotelu, myoidních buněk, které jsou podobné buňkám hladkého svalstva, dále vrstvy kolagenózního vaziva (kolagen typu 1) a konečně bazální membrány (lamina basalis) na níž nasedá zárodečný (semenotvorný) epitel. Epitel se skládá z vlastních zárodečných buněk, které podstupují sérii dělení a podpůrných Sertoliho buněk. Prostory mezi kanálky vyplňuje řídké fibrilární vazivo, v němž nalézáme nervy a lymfatické a krevní cévy. Vazivo je bohaté na fibroblasty, žírné buňky a makrofágy. V tomto prostoru se po pubertě nacházejí Leydigovy buňky, jež obsahují enzymy pro tvorbu testosteronu.^{1, 3, 19}

Zárodečné buňky procházejí od puberty trvale dějem označovaným jako spermatogeneze, při níž za současného dělení postupují směrem od lamina basalis k lumen tubulu. Spermatogeneze je tedy proces, při kterém spermatogoniální kmenové buňky (spermatogonie) dávají vzniknout samčím gametám (spermie). Spermatogenezi můžeme rozdělit na tři hlavní fáze: proliferaci a diferenciaci spermatogonií, meiózu (redukční dělení) a spermiogenezi.

Buněčná populace spermatogonií prochází mitotickým dělením za vzniku nové populace kmenových buněk a za vzniku spermatogonií, jež následně podstupují meiotické procesy. Spermatogonie (SSCs) měří v průměru asi 12 μm a dělíme je do určitých typů. Tato klasifikace je závislá na jejich jaderných znacích. Avšak známe málo specifických morfologických (povrchové znaky) a biochemických markerů pro jejich přesnou identifikaci. Rozlišujeme spermatogonie typu A, ty se vyznačují nevýrazným barvením jaderného chromatinu a spermatogonie typu B, které vykazují výrazná hrubá seskupení chromatinu blíže k jaderné membráně. Spermatogonie typu A se u mnoha savců dále dělí na několik podtypů lišících se stupněm proliferace a progresu, a to směrem ke spermatogoniím typu B. U člověka je pak spermatogonie označována jako Ap považována za pravou kmenovou buňku v testis. Spermatogonie typu B se mitoticky nedělí, ale pomalu rostou až na dvojnásobnou velikost a dávají tak vznik primárním spermatocytům, které následně podstupují meiosis. Dále byl identifikován další typ buněk mající pravděpodobně určité znaky a funkce podobné spermatogoniálním kmenovým buňkám. Označují se jako T-SP. Jsou určeny jistým molekulárním znakem společným pro několik typů kmenových buněk, který se projeví speciálním typem barvení.

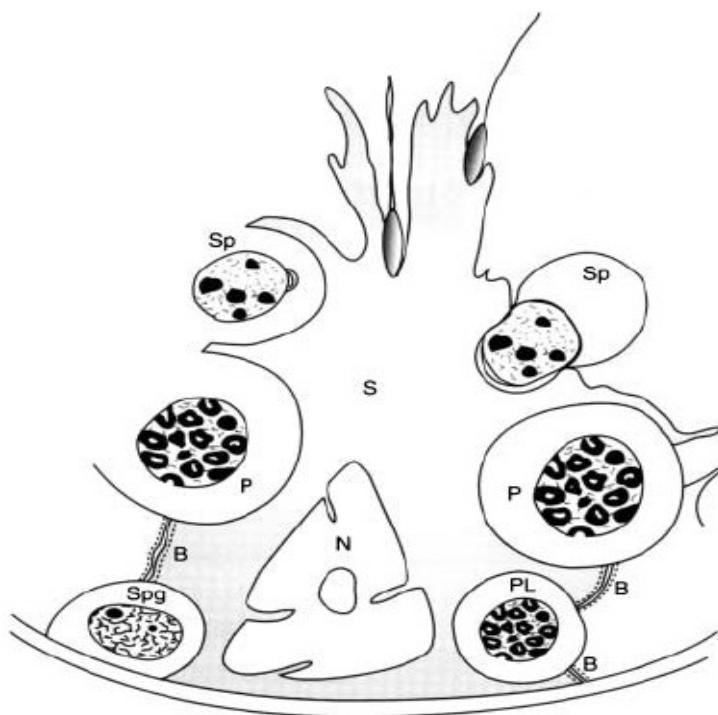
Proces meiosis začíná, když spermatogonie typu B ztratí fyzický kontakt s bazální membránou a vytvoří preleptotenní primární spermatocyt. Ten obsahuje na začátku meiosis 46 chromozómů a DNA ve čtyřech kopiích ($4N$). Primární spermatocyty jsou největšími buňkami spermatogenní linie a jejich jádra jsou charakterizována přítomností chromozómů v různých fázích spiralizace. Meiosa probíhá ve dvou děleních: I. a II. I. dělení má čtyři fáze: profáze, metafáze, anafáze a telofáze. U profáze rozlišujeme pět stádií: leptotene, zygotene, pachytene, diplotene a diakineze. V zygotenním stádiu se k sobě přikládají homologní chromozómy, aby si v pachytenním vyměnily části chromatid (crossing over), čímž dojde k rekombinaci genetického materiálu. V anafázi se na každém pólu buňky seskupí jedna sada chromozómů = haploidní počet. Výsledkem prvního redukčního dělení jsou sekundární spermatocyty. Mají haploidní počet chromozómů (23), které obsahují DNA ve dvou kopiích ($2N$). Ty velmi rychle podstupují druhé redukční dělení, jež je shodné s průběhem mitózy, ale nedochází k syntéze DNA. V průběhu anafáze zde dochází k podélnému štěpení centromer a k rozchodu jednochromatidových dceřiných chromozómů. Výsledkem druhého redukčního dělení jsou kulové spermatidy (haploidní počet chromozómů, DNA pouze v jedné kopii - $1N$). Ty můžeme rozpoznat podle malých rozměrů ($7-8\text{ }\mu\text{m}$) a jader s kondenzovaným chromatinem. Meióza stejně jako celý proces spermatogeneze probíhá v záhybech Sertoliho buněk. Doba trvání meiotického dělení je u člověka 24 dnů a jeho zvláštností existence plasmatických můstků mezi kulovými spermatidami, které hrají důležitou informační úlohu v jejich dozrávání.

Spermioogeneze je transformace kulové spermatidy ve zralou spermii, při níž se neuplatňuje žádné další buněčné dělení. Základní stadia tohoto procesu (Golgiho fáze, akrozomální fáze a maturační fáze) jsou shodná u všech živočišných druhů a zahrnují utvoření akrozómu, jaderné změny, vznik bičíku, reorganizaci (a ztrátu)

cytoplasmy a buněčných organel. Poslední proces je uvolnění spermie do lumen kanálku od Sertoliho buňky a nazývá se spermiace.^{1,3, 29, 45}

Proces spermatogeneze trvá u člověka asi 70 dní a jeho výsledkem je zralá spermie tvořená hlavičkou (obsahuje kondenzovaný jaderný chromatin), krčkem a bičíkem. Většina hlavičky je kryta akrozómem, který obsahuje proteolytické enzymy jako je hyaluronidáza či akrosin, které umožňují průnik do vajíčka.^{2,3}

Teplota je důležitým faktorem regulace spermatogeneze, jež probíhá pouze při hodnotách nižších než 37°C. Teplota ve varleti se pohybuje kolem 35°C a je řízena pomocí několika mechanismů. Bohatá venózní pleteň (plexus pampiniformis) opřádající obě testikulární arterie plní funkci protiproudového tepelného výměníku. Dalšími faktory je pak odpařování potu z povrchu skrota, což přispívá k tepelným ztrátám, a kontrakce musculus cremaster, jenž zatahuje varlata do inguinálního kanálu, kde se naopak zahřívají.³



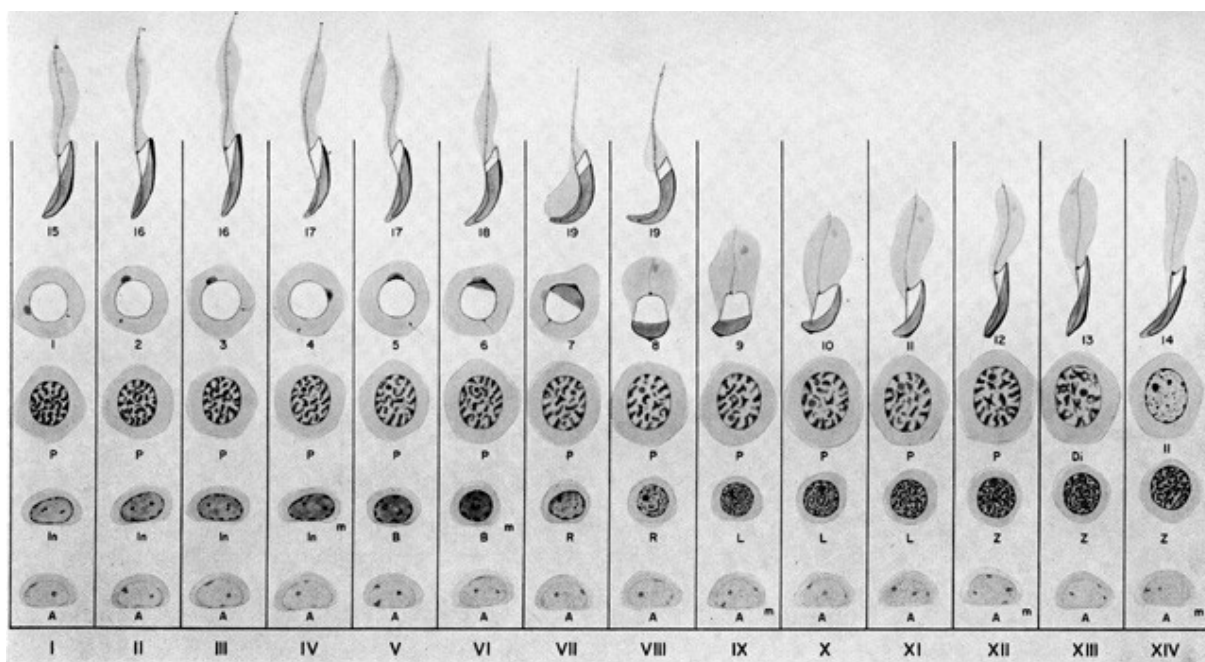
Obrázek: Struktura zárodečného epitelu. (Fujisawa, 2006)¹⁸

B – hematotestikulární bariéra, N – jádro, P – pachytenní spermatocyt, PL – preleptotenní spermatocyt, S – sertoliho buňka, Sp – spermatida, Spg – spermatogonie

2.3. Cyklus zárodečného epitelu

Spermatogeneze neprobíhá ve všech semenotvorných kanálcích synchronizovaně, nýbrž ve vlnách. Zárodečné buňky jsou v zárodečném epitelu organizovány tak, že tvoří několik tzv. buněčných asociací (stádií zárodečného epitelu). Určitá buněčná asociace obsahuje určité typy zárodečných buněk, zvláště ji určují typy spermatogonií. Zárodečný epitel se tak nachází v určitém stádiu. Semenotvorný kanálek je podélně rozdělen dle těchto stádií. Cyklus zárodečného epitelu definovali Le Blond a Clermont jako sérii změn na daném místě semenotvorného tubulu mezi objevením se dvou stejných stádií. Definovali u potkana 14 stádií cyklu a trvání každého stádia. Než se ze spermatogonie typu A přemění ve zralou spermii,

specifická část kanálku prodělá všech 14 stádií 4krát. U člověka existuje 6 stádií.^{3, 29}



Obrázek: Stádia zárodečného epitelu u potkana. (Clermond, Leblond, Perey, 1967)²⁸

I-XIV – stádia zárodečného epitelu, A – spermatogonie typu A, In-mezistádium sg., B – sg. typu B, R – tzv. odpočívající sg., m-mitotické stádium sg., L – leptotene, Z – zygotene, P – pachytene, Di – diakineze, II – sekundární spermatocyt, 1-19 – fáze spermiogeneze.

2.4. Hormonální aspekty

Zahájení spermatogeneze, tvorba primárních spermatocytů a meiotické dělení až do profáze prvního dělení, probíhá v embryonálním období. Tyto děje nejsou primárně ovlivněny hormony. Dokončení spermatogeneze se děje až v pubertě a od té

doby platí, že pro úspěšnou spermatogenezi jsou důležité hormony FSH, LH a testosteron.

2.4.1. Hypotalamus

Buňky produkující deka-peptid GnRH (gonadoliberin) jsou koncentrovány zejména v mediobazální části hypotalamu. Gonadoliberin se uvolňuje pulzně a řídí tvorbu a sekreci FSH a LH v adenohypofýze. Testosteron způsobuje negativní zpětnou vazbu snížení frekvence uvolňování gonadoliberinu.

2.4.2. Adenohypofýza

V adenohypofýze jsou tvořeny a do krve vyplavovány dva gonadotropiny – FSH a LH. LH působí na receptory Leydigových buněk. Jeho sekrece vyvolá během třiceti až šedesáti minut sekreci testosteronu. U potkanů je odezva téměř okamžitá. Mutace LH receptoru může způsobit jak pseudohermafroditismus, tak předčasnou pubertu. Receptory pro FSH jsou na Sertoliho a peritubulárních myoidních buňkách. Oba typy receptorů jsou spojeny s G proteiny. Úloha FSH spočívá ve stimulaci proliferace Sertoliho buněk. U potkanů s produkcí abnormálního receptoru pro FSH dochází ke snížení počtu a metabolické kapacity Sertoliho buněk, přičemž toho poškození neznamena sterilitu. U lidí způsobuje stejná porucha azoospermii. Obecně platí, že hormony produkované Sertoliho a Leydigovými buňkami vykonávají negativní zpětnou vazbu na produkci gonadotropinů a kastrovaný živočich vykazuje vysoké hladiny FSH a LH. Sekrece LH je pak specificky inhibována testosteronem, estradiolem a dihydrotestosteronem. FSH je inhibován pomocí inhibinu a naopak jeho sekreci stimuluje aktivin. Zajímavé je, že aktivin působí na adenohypofýzu i parakrinně.

2.4.3. Varlata

Leydigovy buňky představující 20% buněčné populace testes produkují několik androgenů, z nichž je nejdůležitější testosteron. Produkce lidských varlat činí asi 7 mg za den. Pod vlivem LH dochází k odblokování genů, které kódují enzymy steroidogeneze. Prolongovaná expozice LH vede k hyperplazii Leydigových buněk. Hladiny testosteronu jsou v testes asi 100krát vyšší než na periférii. Testosteron se v testes váže na jaderný receptor Sertoliho buněk a podporuje spermatogenezi. Například tlumí apoptózu spermatocytů během meiosis. Snížení hladin testosteronu způsobuje odpojování nezralých spermatid od Sertoliho buněk, a to díky ztrátě buněčně adhezivních molekul tvořících spojovací komplex mezi nimi. Je ale zajímavé, že testosteron nemá pozitivní vliv na proliferaci spermatogonií, ty jsou stimulovány spíše FSH. Testosteron je také pomocí ABP transportován do lumen tubulu, pro něhož jsou specifické jeho vysoké koncentrace. Testosteron se může pomocí enzymu 5 α reduktázy přeměňovat na účinnější dihydrotestosteron, možná je také přeměna v estradiol.

Sertoliho buňky vlastní receptory pro FSH a testosteron (působení FSH a testosteronu na spermatogenezi je synergistické). FSH zde například podporuje produkci laktátu, který je zde specifickým zdrojem energie. Sertoliho buňky produkují estradiol, SCF, ABP a glykopeptidy aktivin, inhibin aj. (viz níže). Inhibin dále dělíme na A a B. Kromě zpětnovazebného působení zvyšuje odpověď Leydigových buněk na působení LH. Aktivin je také produkován Leydigovými a peritubulárními myoidními buňkami. Díky svým receptorům přímo na Sertoliho buňkách podporuje jejich proliferaci. Tato proliferace je důležitá již v časném prepubertálním životě savců a v souladu s touto tezí byla objevena izoforma receptoru pro aktivin (ActRII) na Sertoliho buňkách potkanů. Jedná se o specifickou a dočasnou expresi mezi sedmým a devátým dnem po narození.

Aktivin má své receptory i na primárních spermatocytech, spermatidách a podporuje také mitózu spermatogonií. Spermatogonie jsou navíc stimulovány pomocí SCF.

Důležitá je produkce glykoproteinu MIS (v embryonálním období), čímž je zabráněno vytvoření vejcovodů, placenty a části pochvy ze zárodečných tkání díky regresi Müllerových vývodů.^{2,3, 29, 36}

2.5. Hematotestikulární bariéra

2.5.1. Struktura a funkce

Morfologický základ hematotestikulární bariéry je tvořen ze specializovaných těsných spojů (tight junctions) mezi sousedními Sertoliho buňkami. HTB je u člověka kompletní až v období puberty, u potkana je to mezi patnáctým a osmnáctým dnem věku. Semenotvorný kanálek je od té doby rozdělen pomocí TJ's na bazální a adluminální kompartment. Některé zdroje hovoří navíc o tzv. intermediálním (tranzitním) kompartmentu. Při spermatogenezi se musí přesunout preleptotenní a leptotenní spermatocyty z bazálního do adluminálního kompartmentu. To znamená, že zygotenní spermatocyty dokončují meiózu již za HTB. Funkcí HTB je tedy izolovat oba kompartmenty, a to především před buňkami imunitního systému. Ten totiž haploidní spermatogenní buňky nezná a začal by proti nim reagovat. Můžeme říci, že extracelulární prostředí adluminálního kompartmentu je složeno výhradně ze sekretů Sertoliho buněk.

2.5.2. Sertoliho buňky

Jedná se o vysoké štíhlé buňky s jádrem při jejich bazi a s nápadným jadérkem. Zajišťují jak mechanickou, tak metabolickou podporu zárodečným buňkám. Jejich sekreční činnost je nezbytná pro meiózu a spermiogenezi zárodečných buněk. Jedná se o produkci růstových faktorů, cytokinů a hormonů. Jmenovitě to jsou například: MIS, aktivin, inhibin, IGF, TGF- α a β , bFGF, IL-1, SGF a estrogeny. Pro energetický metabolismus je důležitá produkce laktátu a pyruvátu (zárodečné buňky nejsou schopny využít glukózu). Dále Sertoliho buňky tvoří proteázy a proteázové inhibitory (jako například aktivátor plazminogenu), které nacházející uplatnění v tkáňové remodelaci nutné k pohybu zárodečných buněk přes HTB. Patří sem i cyklický protein Z, jenž má na starost uvolnění zralé spermie.

Další skupinu tvoří transportní proteiny. Jedná se o ABP, ceruloplasmin, transferin, či SGP 1 a 2. Transferin je součástí transportního systému dopravujícího ionty železa mezi komplexy tight junctions a je esenciální pro spermatogenezi. SGP působí jako přenašeč lipidů.

2.5.3. Tight junctions a ostatní spoje

Tight junctions ovšem zdaleka nejsou jedinnými spoji v zárodečné epitelu. Existují další spojující jak Sertoliho buňky navzájem, tak Sertoliho a zárodečné. Patří sem adherentní spoje (AJs), ektooplazmatické specializace (ES), gap junction (GJs), tubulobulbární komplex (TBC), desmozómy a hemidesmozómy. Spoje mezi buněčným epitelem a extracelulární matrix jsou známy jako fokální kontakty.

Při přesunu spermatocytů z bazálního do adluminalního kompartmentu dochází ke kontinuálnímu smontování a

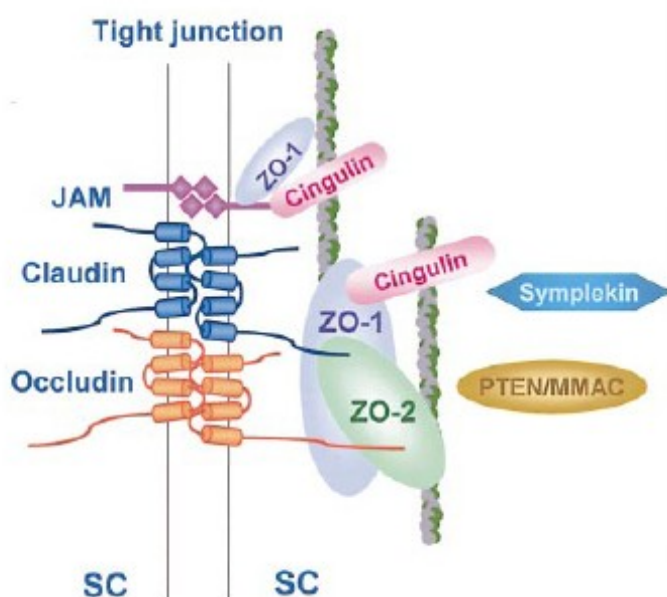
rozmontovávání jak spojů mezi Sertoliho a zárodečnými buňkami, tak k rozpadu a znovuoobnovování tight junctions.

Podívejme se teď na vlastní tight junctions. Jsou to jediné známé okluzivní spoje v savčích epitelech a endotelech. Těsně uzavírají mezibuněčné prostory. V jejich blízkosti jsou umístěny AJ's (spoje založené na aktinu, kadherinu, aj.) a desmozómy (založené na intermediálních filamentech). Tyto tři typy spojů tvoří dohromady tzv. junkční komplex. Co se týče struktury a molekulárního složení těsných spojů u potkana, byly nalezeny 3 třídy integrálních membránových proteinů: okludiny, klaudiny a JAM's (junkční adhezivní molekuly). Také bylo identifikováno několik periferních membránových proteinů. Jedná se o zonula occludens 1 a 2 (ZO-1, 2), cingulin, symplekin a další. Navíc jsou zde proteiny vesikulárního transportu (např. PTEN), které mají za úkol doplňovat příslušné proteiny těsných spojů.

Struktura okludinu je dobře známa. Jedná se o 65 kDa protein. Je svými čtyřmi transmembránovými doménami zabudován do Sertoliho buňky, jeho 2 extracelulární smyčky zajišťují kotvící funkci. Celkem víme o dvou typech okludinu. Exprese okludinu je stimulována testosteronem a inhibována TGF- β 3. Lidská testes okludin neobsahují, ale u potkanů vyvolá jeho absence ztrátu zárodečných buněk.

Také rodina klaudinů je klíčová pro správnou funkci TJ's, nejdůležitější se zdá být klaudin 11. Interagují přímo s dalšími komponentami spojů, jako je ZO 1 a 2, nepřímo s s-afadinem a cingulinem.

Posledními spojovateli jsou JAM's. Existují typy 1, 2 a 3, patří do nadrodiny imunoglobulinů. Každá molekula je složena z extracelulární domény, která zahrnuje 2 imunoglobulinové smyčky, dále z jedné transmembránové domény a jedné cytoplazmatické intracelulární domény. JAM's jsou také spřaženy s dalšími proteiny asociovanými s TJ's.



Obrázek: Struktura těsných spojů. (Lui, Mruk, Lee, Cheng, 2003)²¹

SC – Sertoliho buňka

O důležitosti těsných spojů nám mnoho vypovídají metody studia jejich dynamiky pomocí modelů, ve kterých dochází k jejich poškození. Při poškození zárodečného epitelu kadmiem dochází ke ztrátě ZO-1 ze struktur HTB a ke ztrátě proteinových komplexů kadherin/katenin a nectin/afadin ze struktur AJ's. Následuje ztráta zárodečných buněk. Toto je doprovázeno přechodnou indukci TGF- β 3 a p38 mitogen aktivovanou protein kinázou (p38 MAP kináza). Pokud zablokujeme p38 MAP kinázu jejím specifickým inhibitorem, k poškození nedojde. Tyto výsledky ukazují, že TGF- β 3/p38 MAP kináza signální kaskáda je užita k regulaci TJ a AJ dynamiky v testis.

Další model spočívá v podání synteticky vyrobené části okludinu do varlat potkana. Dochází k interakcím mezi smyčkami okludinu, následuje poškození bariéry a ztráta zárodečných buněk. Po eliminaci

syntetické části okludinu dochází k znovunastolení bariéry, což je provázeno snížením hladin TGF- β 3 (aniž by byly předtím zvýšeny).

Při použití experimentálního kryptorchismu (viz dále) bylo zjištěno poškození HTB snížením počtu TJ's. Disruptivní změny v bariéře jsou pravděpodobně sekundární a vyplývají z poruchy funkce bazální membrány, která je kryptorchismem poškozena.

Je zajímavé sledovat změnu v kompetenci HTB s postupujícím věkem. Sleduje se její propustnost pro radioizotopově značenou sůl lathanu. Výsledkem je pozvolná ztráta funkce HTB v závislosti na věku, což se projevuje sníženou efektivitou spermatogeneze.

Z uvedených a dalších modelů (také in vitro) vyplývá, že regulace dynamiky těsných spojů se účastní TGF- β 3, a to cestou p38 MAP kinázy, jejíž inhibitor SB202190 by mohl být použit časem v terapii. TGF- β 3 působí negativně na expresi okludinů, ZO-1 a také kladudinů 11. Do regulace bariéry výrazně promlouvá také fosforylace jejích proteinů enzymem tyrozinkinázou. Ta má své specifické inhibitory a její aktivita závisí také na hladině kalcia. Nadměrná, či nedostatečná fosforylace má za následek poškození bariéry. Neméně důležitá je také úloha proteinkináz A a C. Ve varlatech je také exprimováno velké množství proteáz a inhibitorů proteáz.^{1, 7, 18, 19, 21, 44}

2.5.4. Bazální membrána a extracelulární matrix semenotvorného kanálku

Bazální membrána přímo sousedí s bazální částí Sertoliho buněk (navzájem jsou poutány hemidesmozómy), jedná se o modifikovanou formu extracelulárního matrix (ECM). Pro pohyb zárodečných buněk přes hematotestikulární bariéru je velmi důležitá, protože od ní odvozené proteiny (proteiny ECM) regulují dynamiku

HTB. Děje se tak interakcemi mezi kolageny, proteázami a inhibitory proteáz, které jsou regulovány cytokiny.

V testes potkana je tunica propria obklopující každý semenotvorný kanálek složena z nebuněčných (kolagen typu 1, bazální membrána) a buněčných (peritubulární myoidní buňky, fibroblasty, a lymfatické endoteliální buňky) komponent. Bazální membrána je ve fyzickém kontaktu s bazí Sertoliho buněk a spermatogonií. Je asi 0,15 μm silná a skládá se z proteinů ECM jako kolagen typu IV, laminin, proteoglykany heparan sulfátu, entactin, fibulin, fibronectin.

BM vykazuje podpůrné a signalizační funkce. Diferenciace a buněčný růst Sertoliho buněk je závislý na substrátu na kterém jsou uchyceny, ECM působí na morfologii a chování Sertoliho buněk, stejně jako působí na proliferaci Leydigových buněk a produkci testosteronu. Důležitost BM byla u potkanů testována pomocí protilátek proti jejím strukturám, což mělo za následek ohnisková rozrušení semenotvorného epitelu. Laminin vytváří funkční vazbu mezi ECM a intracelulárním cytoskeletem a reguluje tak HTB, protilátky proti lamininu také poškozují spermatogenezi. Abnormální BM s imunokomplexy je občas detekovaná u infertilních mužů. Ztluštěnou ji nacházíme při kryptorchismu, vasektomii a varikokele.

Kolagen IV je hlavní komponenta v BM. Vytváří síťovitou strukturu složenou z monomerů, které jsou tvořeny třemi řetězci α ve formě trojitě helikální struktury. Existuje šest typů řetězců (1–6, z toho 1 a 2 jsou ubikvitérní) a 56 izoform monomeru. U potkana kulminuje exprese řetězce $\alpha 3$ při ustavování HTB. Kolageny se účastní signálních transdukcí svými interakcemi s integriny, což jsou transmembránové receptory. Interakce probíhají pomocí fyziologicky aktivních fragmentů (NC1 doména). NC1 doména kolagenu IV hraje důležitou roli v regulaci adheze, proliferaci a apoptóze mnoha typů buněk, kolageny také zvyšují nepropustnost těsných spojů. Pro HTB

má kolagen IV zásadní význam. Uplatňuje se zde složitá signální kaskáda mezi kolagenem IV, TNF α , MMP-9 a TIMP-1. Funkce HTB (propouštět migrující zárodečné buňky) je regulována synchronizovanou aktivitou mezi proteázami (MMP's) a inhibitory proteáz (TIMP's), které jsou známy jako regulátoři tkáňové restrukturalizace.

Úloha proteolýzy v junkční dynamice spočívá v regulaci adheze mezibuněčných a ECM struktur, v aktivaci, či inaktivaci signálních molekul a v aktivaci, či inaktivaci povrchových buněčných receptorů. Ukazuje se, že MMP's jsou rozhodující pro dynamiku ektoplazmatických specializací. Ektoplazmatická specializace je mezibuněčná spojovací jednotka založená na aktinu a vyskytuje se pouze ve varleti. Další molekulou hrající roli v pohybu zárodečných buněk a také při spermiaci je u-PA (urokinázový aktivátor plazminogenu), který přes plazmin aktivuje MMP.

Proteiny ECM a také MMP's a TIMP's jsou regulovány cytokiny jako např. TGF β 1 a TNF- α . TNF- α produkovaný ve varlatech testikulárními makrofágy a Sertoliho buňkami má velký význam v junkční dynamice. Pokud je experimentálně podáván potkanům, způsobuje masivní ztrátu zárodečných buněk, zvláště spermatocytů a spermatid, ale ne spermatogonií. Testikulární váha poklesne a taktéž plazmatický testosteron. Poškození HTB je způsobeno down-regulací integrálních membránových proteinů těsných spojů a též dalších jako E-cadherin a β -catenin. Poškození HTB je spojeno s indukcí MMP-9, která štěpí kolagen IV, přičemž produkty toho štěpení indukují tvorbu kolagenu IV a TIMP-1.

Dále TNF- α působí přes signální kaskádu založenou na β -1 integrinu, jenž redukuje produkci okludinu. Pokud je ovšem tato kaskáda uměle přerušena, dochází k poruše spermatogeneze, protože je zastaven pohyb spermatocytů. Pokud se týče přímého působení na

zárodečné buňky, TNF- α snižuje hladiny Fas ligandu, který je proapoptotický faktor.

Buněčnou adhezi a signalizaci zprostředkovávají glykoproteinové receptory nazvané integriny (spolu s dalšími receptory buněčné adheze jako cadheriny, selektiny a Ig-CAM). Integriny "integrují" proteiny ECM nebo receptorové součásti sousedních buněk a intracelulární cytoskelet. Nejvíce studovaný integrin $\alpha 6\beta 1$ je v potkaních varlatech lokalizován ve strukturách ektooplazmatických specializací řídících adhezi Sertoliho buněk a prodlužujících se a prodloužených spermatid. Co se týče signalizační funkce, integriny řídí signály jdoucí přes buněčnou membránu v obou směrech. Mezi jejich ligandy patří např. kolageny a laminin, s integriny spřažené signální molekuly jsou např. FAK, či ILK. FAK je lokalizována zejména v bazálním kompartmentu a zprostředkovává buněčnou adhezi a migraci.

Jako další protein ECM lze jmenovat vinkulin, který interaguje s řadou junkčních komplexů buněčných spojů v testis a má tak vliv na motilitu zárodečných buněk.

Výše uvedené poznatky o proteinech ECM potažmo bazální membrány ukazují, že mají důležitou strukturní a signalizační úlohu v regulaci testikulárních spojů, a že se tak děje interakcemi s cytokiny, proteázami a inhibitory proteáz.¹⁹

2.5.5. Peritubulární myoidní buňky

Spolu s fibroblasty tvoří myofibroblastové vrstvy (fibroblasty vně), které jsou buněčnou součástí tunica propria. Tyto vrstvy se několikrát střídají s vrstvami nebuněčnými – kolagenózními. Myoidní buňky jsou protáhlého tvaru o šířce asi 4,5 μm a jejich funkcí je podporovat svými kontrakcemi transport spermií semenotvorným

kanálkem. Buňky se podobají hladkému svalu. Jejich jádro je vřetenovitého tvaru, perinukleární cytoplazma obsahuje cisterny hrubého endoplasmatického retikula a ovoidní mitochondrie. Blízko buněčné membrány se nacházejí nápadné intercelulární svazečky jemných filament. Nedaleko plazmalemy jsou také shluky vezikul. Pro jejich správné uspořádání je důležitá neporušená osa hypofýza – varle, proto při hypogonadotrofickém hypogonadismu nalézáme peritubulární myoidní buňky dezorganizovány. Tato dezorganizace se odstraní podáváním FSH a LH.

Podívejme se na skladbu cytoskeletu lidských a potkaních myoidních buněk. Je zde přítomen desmin, jedná se o svalový typ intermediálních filament, dále je zde vimentin, který patří k intermediálním filamentům fibroblastů a různých dalších typů mezenchymálních buněk. Vrstva myoidních buněk je identifikována již u právě narozených potkanů, desmin je dokonce přítomen už ve fetálním období. Když se přiblíží puberta, procházejí myoidní buňky dramatickými změnami v cytoarchitektuře, které zahrnují zplošťování a expanzi cytoplazmy, což se projeví ve zvětšení peritubulárního povrchu. Adultní peritubulární myoidní buňky člověka a potkana vykazují též přítomnost myosinu. In vitro studie prokázala, že dokáží secernovat inhibiny, aktivin a izoformu receptoru pro aktivin (ActRII). U mužů s oligospermií a azoospermií je peritubulární tkáň dezorganizována, nalézáme velkou akumulaci kolagenu nebo shluky eozinofilních částic.^{53, 54, 55, 56, 57, 58}

2.6. Kryptorchismus a tepelný stres

2.6.1. Etiologie

Varle s nadvarletem se během embryonálního vývoje zakládají vysoko při zadní stěně břišní dutiny ve výši bederních obratlů $L_1 - L_2$. Během vývoje se pak přesouvají kaudálně do fossa iliaca, až nakonec sestoupí tříselným kanálem do skrota. Děje se tak pomocí vazivového pruhu (gubernaculum testis), který se táhne od dolního pólu varlete do základu skrota. Gubernaculum se zkracuje a táhne varle dolů, navíc zde působí diferencovaný růst břišní stěny, nitrobřišní tlak a kontrakce svalů břišní stěny. Sestup je pod hormonální kontrolou.

Kryptorchismus značí stav, při kterém není varle sestouplé v šourku. Může se jednat o unilaterální (jedno varle), nebo bilaterální (obě). Také rozlišujeme dle polohy nesestouplého varlete na abdominální, inguinální a ektopické varle. Kryptorchismus je způsoben závadou v sestupu varlete a jedná se u člověka o poměrně častou poruchu. U předčasně narozených chlapců je incidence až 30%, u včas narozených 3 – 5%, přičemž ve 3 měsících postnatálního života se sníží na 0,8 procent a toto procento přetrvává až do puberty. Matky kryptorchických chlapců mívají lehké hypofyzární poškození, které se manifestuje dlouhou 1. menstruací, další jsou naopak krátké. Kryptorchismus můžeme mít původ genetický, hormonální (defekt v androgenním působení), či anatomický (deformity gubernakula)^{1, 12, 23, 46, 47}

2.6.2. Poškození kryptorchismem

Teplota ve skrotu je u většiny savců o několik stupňů nižší než v břišní dutině. Snížení teploty je pro normální spermatogenezi nezbytné. Pro zkoumání poškození spermatogeneze se používá model experimentálního kryptorchismu (unilaterální či bilaterální). Všechny hlavní buněčné typy v testis jsou pravděpodobně zasaženy vzrůstem testikulární teploty indukované kryptorchismem. Detailní zkoumání kryptorchických testes dospělých krys ukázala, že nejčasnější celulární změny jsou zaregistrovány ve stádiu časného pachytenu spermatocytů a ranných spermatid. Kryptorchismus je příčinou testikulární atrofie a také rozvoje neoplazmat.^{12, 22, 23,}

Podívejme se nejprve na histologické souvislosti poškození kryptorchismem. Rozsah změn je závislý na čase, což je důležité pro případnou ochridopexii. Jones a kol. ve své studii pozorovali histologické změny související s bilaterálním experimentálním kryptorchismem v časových intervalech. Zjistili se, že po 24 hodinách od zákroku jsou formovány mnohoaderné spermatidy a toto je spojeno s rozšiřováním intercelulárních cytoplasmatických můstků. Tyto změny korelují s desorganizací mikrotubulárního systému ve spermatidách, zkroucením jádra a deorganizací chromatinu. Spermatidy ve všech stupních vývoje procházejí degenerací a všechny buněčné pochody vedoucí ke zrání spermií se zdají zastaveny. 5 dní po operaci jsou hlavními rysy tubulů mnohoaderné spermatidy, pozdní spermatidy se často nacházejí u baze Sertoliho buněk.

U 21denních kryptorchických testes jsou pozorovány 3 typy semenotvorných tubulů. 1. typ má dilatován lumen ohraničený rozvětvenými Sertoliho buňkami, kde se nachází malý počet spermatogonií. U druhého typu lze pozorovat zárodečné buňky v mnoha stádiích zrání až do sekundárních spermatocytů, spermatidy

jsou poškozeny, Sertoliho buňky obsahují velké množství lipidů. 3. typ se liší množstvím lipidů, také zde nejsou spermatidy. 36 dní po operaci vykazují semenotvorné tubuly známky pokročilé degenerace. Velká depozita lipidů jsou uvnitř Sertoliho buněk a v těch zárodečných buňkách, které dospěly do stádia spermatocytů.

Po 64 dnech jsou všechny semenotvorné kanálky omezeny v průměru a nedrží žádný spermatocyt, či spermatidu. Lipidy v Sertoliho buňkách jsou redukovány. Stěna semenotvorného kanálku je ztlustěna, některé semenotvorné tubuly jsou kompletně uzavřeny mineralizovaným materiálem. Některé tubuly obsahují normální spermatogonie.⁸

Dalším morfologickým rysem při tomto poškození je také vakuolizace epitelu.³⁹

U degenerujících semenotvorných tubulů dochází ke ztlustění bazální membrány (velká kolagenizace) a k vymizení peribubulárních buněk.⁵⁵

Dalším zajímavým aspektem kryptorchického poškození je několikanásobné zvětšení počtu spermatogoniálních kmenových buněk.³¹

Zaměřme se nyní na mechanismy vedoucí k takovému poškození.

Dochází ke změnám v expresi proteinů tepelného šoku, což s dalšími procesy vede k apoptóze zárodečných buněk (viz níže).

Dále je kryptorchické varle vystaveno oxidačnímu stresu, který se manifestuje vysokou hladinou peroxidace lipidů. Způsobují jej volné radikály, což jsou normální produkty buněčného metabolismu. Při vyšší teplotě je metabolismus rychlejší a volných radikálů více. Ty způsobují testikulární degeneraci poškozením proteinů a DNA a mohou mít na svědomí maligní transformace.²⁰

Jiná studie ukázala expresi endoteliální NOS v cytoplazmě degenerujících zárodečných buněk při kryptorchismu. NOS je enzym

produkující volný radikál NO. Degenerace byla hodnocena fragmentací DNA, která je markerem apoptózy.⁴¹

Při umělém kryptorchismu dochází také k redukci v koncentraci a aktivitě enzymu PARP. Ten má na starosti opravu DNA poškozenou genotoxickými agens, působí v průběhu replikace. Zde dochází k potlačení exprese PARP v souvislosti se ztrátou meiotických spermatocytů během kryptorchismu.⁴²

Při kryptorchismu je redukována produkce ABP v porovnání se skrotálním varletem, děje se zřejmě díky úbytku Sertoliho buněk. Také klesají hladiny testosteronu a DHT, snižuje se hmotnost prostaty a semenných váčků. V důsledku ztráty zpětné vazby dochází k elevaci hladiny plazmatického FSH. Stimulace kryptorchického varlete pomocí hCG má za následek abnormální zvýšení hladin sérového testosteronu.²⁷

Také můžeme simulovat stav podobný kryptorchismu pomocí navození experimentální hypertermie. Dvacetiminutová expozice skrota potkana médiem o teplotě 39°C nemá ještě škodlivý vliv. Pokud zvýšíme teplotu na 43°C nastává poškození. Už po 8 hodinách hovoří Rockett a kol. o vakuolizaci tubulů, mnoho zárodečných buněk má jádra obsahující kondenzovaný chromatin, některá jádra se rozpadají v pyknotická tělíska. Za 16 hodin obsahuje mnoho tubulů obří degenerující buňky, původem spermatocyty. Také v tomto čase nenašli v lumen tubulů žádné spermie ani spermatidy. Díky teplu je přerušen meiotický cyklus spermatocytů.

V této studii byla pozorována snížená exprese určitého počtu genů souvisejících s eliminací oxidačního stresu, jedná se o geny participující na opravách poškozené DNA. Ovšem jiné geny, jejichž produkty opravují DNA byly exprimovány. V odpověď na tepelný šok došlo dále ke zvýšení exprese genu receptoru pro laminin. Zajímavé je zjištění, že prekoitální zahřívání testes nejenže redukuje počet

úspěšných spáření, ale také produkuje přechodné retardace v růstu embrya, a dokonce jeho degenerace.²⁴

2.6.3. Apoptóza a zárodečný epitel

Apoptóza je programovaná buněčná smrt, k níž dochází jak fyziologicky, tak patologicky. Signální dráhy programované smrti se dělí na mitochondriální a mimomitochondriální, jsou však vzájemně propojeny. Hlavními iniciátory mimomitochondriální apoptotické dráhy jsou tzv. receptory smrti (death receptors, např. Fas), které patří do nadrodiny receptorů TNF. Přenos signálu dále do buňky probíhá přes adaptérové proteiny TRAF a proteiny s doménami smrti (death domains). Adaptéry mají efektorovou doménu, pomocí níž váží iniciační kaspázy 2, 8 a 10, jež se následně samy rožštěpí a tím aktivují. Poté svou proteolytickou aktivitou spouští další proteiny, zejména pak efektorové kaspázy 3, 6 a 7. Bílkoviny štěpící tyto kaspázy jimi aktivují sfingomyelinázu, která odštěpuje ze sfingomyelinu ceramid. Ceramid aktivuje proteiny jako Ras a Rac. Díky nim dochází k tvorbě O_2 a poškození mitochondrií. Dále ceramid aktivuje tyrozinkinázu, která tlumí K^+ kanály a stimuluje Cl^- kanály čímž se buňka acidifikuje.

Nejdůležitějšími členy mitochondriální dráhy jsou proteiny rodiny Bcl-2. Mezi proapoptotické činitele zde patří zejména Bax, Bak, Bcl- X_s a další. Jejich funkcí je narušovat celistvost mitochondriální membrány tvorbou pórů. Mezi antiapoptotické proteiny mitochondriální dráhy patří například Bcl-2, Bcl- X_L , apod. Tyto tvoří s proapoptotickými činiteli nefunkční dimery, a tak je neutralizují. K nejznámějším výstupům z apoptotických mitochondriálních procesů patří uvolnění cytochromu C, jež vede k utvoření mitochondriálního apoptozómu. I zde je důležitá úloha kaspáz, konkrétně kaspázy 8 a 9.

O apoptotické smrti buňky rozhoduje mnoho faktorů a mnoho procesů se na ní podílí. Je to např. kaskáda MAPK, cytosolová koncentrace Ca^{2+} , aktivace různých genů (bcl family), přítomnost spouštěčů apoptózy – TNF α , TRAIL (Apo2-I), Fasl, glukokortikoidy. Důležité je obsazení proapoptotického receptoru Fas jeho ligandem Fasl. Jejich vzájemná interakce je hlavním mechanismem vedoucím k apoptóze mnoha buněk včetně samčích zárodečných. Zde je dokonce Fasl velmi důležitým činitelem, který propůjčuje zárodečnému epitelu imunitně-privilegovaný status tím, že je schopen eliminovat aktivované lymfocyty nesoucí na svém povrchu receptor Fas.

Apoptotickou smrt také spouští odejmutí růstových faktorů. Důležité je též působení proteinu p53, který kontroluje DNA a případně ji likviduje, je to antionkogen. Ve finálním stádiu dochází k aktivaci endonukleáz, jež vede k fragmentaci DNA. Typická je také ztráta elektrolytů a organických osmolytů, což vyústí ke svrašťení buňky. Na rozdíl od nekrózy zůstává buněčná membrána a buněčné orgány dlouho neporušeny. Zato dochází ke kondensaci chromatinu (pyknóza jádra – jádro je více barvitelné) a jeho následnému rozpadu (fragmentace). Cytoplazma vykazuje silnou eozinofilii. Buňka se svrašťuje a rozpadá za vzniku apoptotických tělísek, která jsou následně fagocytována makrofágy, aniž by vyvolala zánět.

Testikulární zárodečné buňky se stále prolifерují a diferencují, aby dodávaly velké množství zralých spermatozoí. Během tohoto procesu podstupuje 75% potenciálních spermatozoí apoptosu. Apoptosa testikulárních zárodečných buněk má 2 maxima. První je u krysích testes mezi desátým a čtrnáctým dnem po narození a postihuje spermatocyty. Další apoptotické děje jsou vázány na určité typy buněk: A_2 , A_3 a A_4 spermatogonie v stádiích I a XII – XIV zárodečného epitelu. Záleží na kapacitě Sertoliho buněk. Poměr

Sertoliho buněk a různých druhů zárodečných buněk zůstává konstantní.

Apoptóza hraje významnou úlohu a nese částečnou zodpovědnost za mužskou infertilitu způsobenou zvýšenou teplotou, potažmo tepelným šokem, toxiny jako 2,5-hexadion a mono-(ethylhexyl)ftalát, radiací, chemoterapií, hormonální deplecí a torzí. Lze říci, že vlivy prostředí vedou k apoptóze zárodečných buněk, která je také zprostředkována Sertoliho buňkami.

Nejprve se podívejme, jak vede poškození Sertoliho buněk k apoptóze zárodečných. Názorně to ukazuje model androgenní deprivace. Spermatogeneze je závislá jak na obou gonadotropinech hypofýzy, tak na testosteronu. Sertoliho buňky, které mají intracelulární androgenní receptory, stejně jako membránové FSH receptory, modulují tyto trofické vstupy a podporují spermatogenezi pomocí produkce parakrinních faktorů. Po hypofyzektomii dochází u potkana k degeneraci spermatogenních buněk, při níž ztratí testes až 80% své hmotnosti v šesti dnech. Apoptotická fragmentace DNA se vztahuje pouze na zárodečné buňky. Hormonální terapií je docíleno poklesu DNA fragmentace.

Dále byla androgenní deprivace zkoumána pomocí selektivní destrukce Leydigových buněk chemickou látkou EDS. Po ní dochází k poklesu všech hladin testosteronu na nedetekovatelné hodnoty a k úbytku hmotnosti varlat o 50%. Zde se ukazuje, že ne všechny stádia zárodečného epitelu jsou stejně citlivá na nedostatek testosteronu. Největší škody napáchal EDS na epitelu ve stádiích VII a VIII, kde je také největší koncentrace androgenních receptorů. Také degenerativní změny u EDS modelu byly charakterizovány jako apoptotické. Jedna cesta jak zkoumat nepřímo molekulární mechanismy apoptózy navozené úbytkem androgenů je sledovat expresi s apoptózou příbuzných genů, která doprovází aplikaci EDS. Pozorujeme nárůst exprese proapoptotického proteinu Bax. Naproti tomu stoupají hladiny antiapoptotického proteinu Bcl-2 jako

záchranného mechanismu. Apoptóza zde také koreluje s expresí receptoru Fas.

Dále je zajímavé zkoumat expozici ftaláty coby model proapoptotické aktivace. Ftaláty jsou nejstudovanějšími testikulárními toxikanty a Sertoliho buňky jsou jejich primárním terčem. Jeden z nejvíce účinných a studovaných ftalátů je mono-(2-ethylhexyl) ftalát. Pozorování jsou limitována na stádia XI-XV a I-II zárodečného epitelu, která jsou vysoce citlivá k FSH. A skutečně se ukázalo, že studovaný ftalát inhibuje FSH stimulovanou akumulaci druhého posla – cAMP. Ovšem FSH signální transdukce se nejeví jako klíčový bod ftalátového poškození z důvodů nižší důležitosti FSH pro testikulární funkce u dospělých samců. Větší pozornost je věnována alteracím v signálním systému membránového receptoru Fas v souvislosti se změnami v cytoskeletu. Změny v cytoskeletu jsou reprezentovány kolapsem vimentinových filament po expozici ftalátem. To způsobí odpojení zárodečných buněk od membrány Sertoliho buněk. Takovéto odpojení paradoxně způsobí pokles frekvence apoptózy zárodečných buněk pod fyziologicky obvyklou úroveň tím, že je zamezeno interakci FasI přítomného na membráně Sertoliho buněk s jeho receptorem (Fas) na membráně zárodečných buněk. Vzápětí však dochází k odštěpení Faslu od membrány Sertoliho buněk, vzniká tak rozpustný s-Fasl, který způsobí následnou masivní apoptózu zárodečných buněk. Teze o klíčové roli Fas systému je podpořena výsledky pokusu na FasI deficientních myších. Tito jedinci vykazovali sníženou hladinu apoptózy po expozici ftaláty.^{4, 5, 6, 9, 35, 40, 48}

Yin a kol. se ve své studii zaměřili na časové hledisko indukce apoptózy pomocí p53 a Fas. Byl použit kryptorchický model s dvojité mutantními myši, které měly vyřazen gen pro p53 a Fas. Zjistilo se, že p53 dependentní apoptotická cesta je zodpovědná za iniciální fázi ztráty zárodečných buněk od 7 do 9 dne při experimentálním kryptorchismu, a že následující ztráta buněk je p53

independentní. Od desátého dne po zákroku rapidně stoupá exprese genu pro Fas, což je doprovázeno poklesem hmotnosti varlat. Zvýšená exprese fas je také v přímé korelaci se snížením hladin testosteronu, radiací a expozicí toxikantům Sertoliho buněk.⁹

Erkkilä a kol. sledovali efekt laktátu na tkáňové kultuře varlat. Objevili, že laktát dokáže suprimovat apoptózu indukovanou cestou Fas. Tato suprese je dávkově závislá a autoři vyslovují hypotézu, že by jev mohl být použit k optimalizaci in vitro metod pro asistovanou reprodukci.³⁸

Shikone a kol. demonstrují, že kryptorchismem indukovaná testikulární degenerace je asociována s apoptotickou fragmentací DNA v zárodečných buňkách. Rozpad DNA je zde zaznamenán již v intervalu 2-4 dny po zákroku, přičemž jsou zasaženy zejména primární spermatocyty. Kryptorchismus tady také indukoval pokles LH receptorů v Leydigových buňkách, efekt byl patrný po 7 dnech. Histologicky zjištěná ztráta zárodečných buněk je spojena s obvyklými jevy, jako je přítomnost obřích mnohojaderných buněk a vakuolizace epitelu.

Pokles sérových gonadotropinů buď po hypofyzeektomii, nebo po užívání silných antagonistů GnRH indukuje apoptotickou DNA fragmentaci, zatímco užívání FSH, hCG nebo testosteronu působí proti tomuto efektu.

V Shikoneho studii se také hovoří o vystavení testes tepelnému šoku (srov. výše). Při expozici teplem (43°C po 30 minut ponořením skrota do vody) podstupují spermatogonie a preleptotení primární spermatocyty apoptosu, zatímco ostatní spermatocyty podstupují nekrózu.^{12, 39}

Nedávno byly identifikovány proteiny HtrA, což jsou serinové proteázy. Savčí HtrA2 je všudypřítomný protein, přestože byly objeveny tkáňově specifické či spojené formy. Je lokalizován v mitochondriích, odkud je při indukci apoptózy uvolněn do

cytoplazmy, kde se váže na inhibitor apoptózy spojený s X chromozomem, což rezultuje v aktivaci kaspázy 9. Také může indukovat díky své proteolytické aktivitě apoptózu přes kaspáza-independentní dráhu. Bylo zjištěno, že po navození experimentálního bilaterálního kryptorchismu u potkana, vzrostou hladiny mRNA HtrA2, a to s maximem ve dnech 1 a 7 po operaci, přičemž tyto vysoké hladiny se nacházely zejména ve spermatocytech. Vlastní HtrA2 (protein) dosahoval nejvyšších hladin 2. a 28. den. Aktivita kaspázy 9 byla maximální 2. den. Proteolytická aktivita HtrA2 byla nejvyšší 28. den. Tyto výsledky ukazují dvojí úlohu tohoto proteinu. První maximum hraje důležitou roli jako apoptotický faktor, u druhého zůstává otázkou, zda je protein použit pro další destrukci zárodečného epithelu, či pomáhá odstraňovat denaturované proteiny a zamezuje většímu poškození.¹⁰

2.6.4. Kryptorchismus a nádorová onemocnění

Některé zdroje hovoří až o 40krát vyšším výskytu nádorů v kryptorchickém varleti v porovnání se skrotálním. Při unilaterálním kryptorchismu se rovněž vyskytují častěji nádory u kontralaterálně sestouplého varlete. Objevují se nejčastěji ve věku mezi 15 až 34 roky. V 95% jde o nádory ze zárodečných buněk, přičemž převažují maligní. Nejčastěji se jedná o seminom a teratom, incidence tohoto onemocnění je na vzestupu.

Lui a kol. ve své studii zkoumají pomocí imunohistochemie zvýšenou expresi genu p53 u potkanů po experimentálně navozeném kryptorchismu a vyslovují tezi o souvislosti s nádory zárodečných buněk. Normálně se vyskytující protein p53 je imunohistochemicky nedetekovatelný díky krátkému poločasu rozpadu. Pozitivní nález p53 byl detekován u většiny kryptorchických potkanů a jednalo se tedy o abnormální p53, jež neplní svou funkci ochrany DNA. Takto nefunkční

p53 bývá inaktivován ve své DNA vážící doméně. Zvýšená exprese genu pro p53 (normálního i mutovaného) se vyskytuje u 84% nádorů zárodečných buněk a zůstává otázkou, čím je přesně iniciována.^{5, 14, 22}

2.6.5. Kryptorchismus a proteiny tepelného šoku

Proteiny tepelného šoku (HSP's) chrání buňky před mnoha formami stresem indukovaného poškození. Můžeme říci, že fungují jako molekulové chaperony, které usnadňují syntézu proteinů a jejich správné poskládání, váží se na denaturované proteiny, usnadňují renaturaci, a dokonce umí rozvolňovat agregáty. Odpověď na stres (tepelný, oxidační, nízké pH, některá léčiva) je indukce exprese jejich genů, pravděpodobně odpovídá buňka na nesprávně složené proteiny. Stresové faktory mají aditivní charakter. Odpověď je regulována pomocí HSF (3 izoformy). HSF chrání buňky proti mnoha druhům stresu jednak transkripcí specifického HS genu a dále neznámým mechanismem nezávisle na aktivaci těchto genů. HSP's i HSF jsou zkoumány v souvislosti s kryptorchismem.

Kontrola kvality při spermatogenezi je důležitá pro eliminaci poškozených nebo abnormálních buněk, přičemž víme, že zvýšená teplota takovéto buňky vytváří. HSF1 umí eliminovat zárodečné buňky trpící tepelným stresem apoptotickým mechanismem. Studie kryptorchického modelu s mutantními potkany ukázala dvojí působení HSF1 na zárodečný epitel. Zatímco tepelně nejcitlivější pachytenní spermatocyt nutí k apoptóze, spermatogonie naopak před zánikem chrání.

Exprese genů mnoha HSP's zahrnující testikulárně specifické izoformy, je fyziologicky udržována na určitých hladinách. Existuje polemika, zda jsou HSP geny ve varleti aktivovány tepelným stresem, či ne. Co se týče HSP 70, byla nalezena jeho up-regulace v zárodečném epitelu při tepelném šoku po 4 hodinách, v jiné studii zaznamenali jeho zmizení po experimentálním kryptorchismu za 2

dny od zákroku. Izu a kol. zaznamenali vysokou indukci několika HSP's (včetně HSP 70) v Leydigových buňkách po působení tepla (43°C, 15 min) na potkaní varlata, zatímco v semenotvorném tubulu nebyly HSP's detekovatelné.

Rockett a kol. uvádějí snížení exprese genu pro HSP 86, který je normálně hojně exprimován v zárodečných buňkách testes, po tepelném stresu varlat. Zároveň uvádí zvýšení exprese HSP 25.

HSP 105 je testikulárně specifický, jeho množství se zvyšuje při tepelném stresu. Vyskytuje se převážně v cytoplazmě zárodečných buněk, ale při kryptorchismu se přesouvá do jádra. Tento protein umí vázat p53, ale jen při skrotální teplotě. Jakmile teplota přesáhne 37°C, komplex HSP-105 p53 se rozpadne, což ukazuje na jeho roli v apoptóze při tepelném stresu.^{11, 14, 15, 16, 17, 23}

2.6.6. Kryptorchismus a infertilita

Incidence kryptorchismu u infertilních mužů se pohybuje okolo 5%, azoospermie má svůj původ v kryptorchismu u 20% případů. Fertilita u mužů trpících bilaterálním kryptorchismem je velice nízká. Názory na poškození plodnosti unilaterálním kryptorchismem nejsou jednotné, minimálně však dochází k poškození kvality spermatu. Dokonce ani po včasné orchidopexii není fertilita vždy zajištěna, hovoří se o redukci počtu zárodečných buněk.^{22, 49, 50, 51}

Mnoho studií se zabývá změnami v kontralaterálním skrotálním varletu, avšak jejich výsledky nejsou jednotné. Shärli uvádí pokles spermatogeneze u zvířecího kryptorchického modelu ve skrotálním varletu po několika dnech od zákroku.²⁶

Watts a kol. zkoumali unilaterální kryptorchismu pomocí tří potkaních druhů, z nichž je jeden od narození kryptorchický. Nebyly nalezeny žádné změny v kontralaterálním varletu, ovšem u druhu s vrozeným kryptorchismem byla nižší plodnost.²⁵

Zajímavým modelem je endokrinologické navození unilaterálního kryptorchismu podáním flutamidu pregnantním samicím potkana. Ten byl následně porovnáván s postnatálním navozením kryptorchismu. Endokrinologická deprivace způsobila další malformace reprodukčního systému, negativně působila na osu hypothalamus-hypofýza-testes. Tito potkani byli zcela neplodní a neprobíhal u nich normální vývoj skrotálního varlete. Naproti tomu potkani s experimentálně navozenou poruchou byli jen o něco méně málo plodní než kontrolní zvířata. Je otázkou, jak účinkují faktory, které způsobily poruchu v sestupu jednoho varlete u mužů na skrotální varle postnatálně.¹³

2.6.7. Možnosti léčby kryptorchismu

Léčba kryptorchismu může být hormonální, chirurgická, nebo kombinace obou. Degenerace zárodečných buněk spolu s nesprávnou hormonální produkcí vztahující se k nesestouplým varlatům napovídá, že intervence musí být zahájena velmi brzy. Hormonální terapie může sama o sobě vyvolat sestup varlat. Je doporučeno, aby předcházela chirurgickému zákroku. Používá se GnRH a hCG, k nežádoucím účinkům patří zvětšení penisu a varlat, růst pubického ochlupení a agresivní chování. Chirurgickým zákrokem je orchidopexie (svedení varlat do skrota). Je doporučeno provádět ji již mezi 12. a 16. měsícem věku, protože platí, že počet spermatogonií je nepřímo úměrný věku při operaci. Nejzávažnější komplikací po tomto zákroku je testikulární atrofie, kterou zapříčiňuje možné přetětí testikulárních cév a/nebo postoperační otok a zánět. Další komplikace jsou zpětný vzestup, infekce a krvácení.^{26, 47}

2.6.8. Látky ovlivňující varlata

Mnoho enviromentálních polutantů je potenciálně nebezpečných pro samčí zárodečný epitel. O vlivu široce používaných ftalátů (měkčidla PVC) a kadmia bylo pojednáno výše. Monsees a kol. zkoumali řadu látek za použití aktivity mitochondriální dehydrogenázy jako indikátoru viability Sertoliho buněk. Ta nebyla ovlivněna po 24h expozici lindanem, DDT, ethynilestradiolem, a ani bisfenolem A. V kontrastu k tomu rtuť a cisplatina indukovaly cytotoxický efekt. S výjimkou DDT vykazují všechny zkoumané chemikálie signifikantní dávkově závislý vzrůst produkce laktátu po 24 hodinách expozici v Sertoliho buňkách. Pesticid lindan (ale ne DDT) a estrogen znatelně zvýšily produkci inhibinu B bez zasažení buněčné životaschopnosti. V kontrastu k tomu rtuť a cisplatina znatelně snížily hladiny inhibinu B, a to v koncentracích, jež mírně snížily viabilitu Sertoliho buněk.³⁷

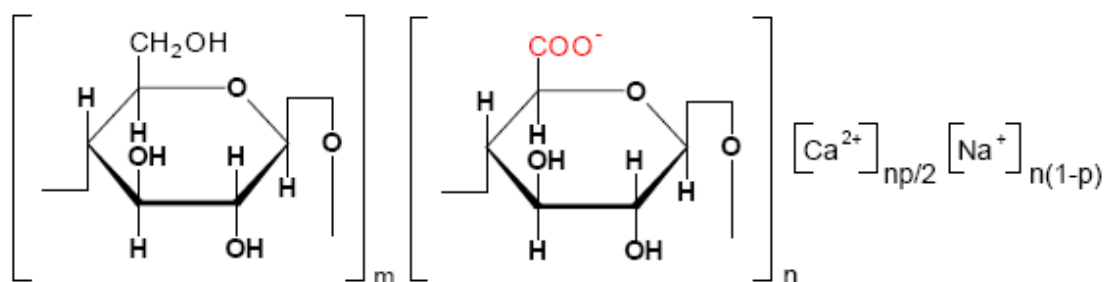
Silvestroni ve své studii píše o lindanu, který je široce používaným insekticidem, jakožto o polutantu poškozujícím molekulární dynamiku fosfolipidové dvojvrstvy membrány spermií. Množství lindanu, která byla nalezena v ženském pohlavním traktu inhibují citlivost spermií na progesteron (stimuluje nástup akrozomálních reakcí), což může způsobit infertilitu.³³

V další studii byl zkoumán vliv exogenního glukokortikoidu dexametasonu na apoptózu testikulárních zárodečných buněk potkana. Procento apoptotických tubulů a apoptotických zárodečných buněk ve skupině potkanů vystavených dexametasonu bylo asi 7krát vyšší než u kontroly.³⁴

Ion chromu Cr^{5+} vzniká redukcí uvnitř buněk z Cr^{6+} , který je všudypřítomným polutantem. Potkani, jimž byla podávána fyziologicky stabilní sloučenina Cr^{5+} , vykazovali abnormality semenotvorného epitelu jako vakuolizaci a degeneraci Sertoliho buněk, spermatocytů a spermatid. Také bylo pozorováno předčasné uvolnění spermatozoí do lumen kanálku a redukce akrozomální integrity. Motilita a koncentrace spermatu nebyly zasaženy.⁵²

2.7. MDOC™

MDOC™ je obchodní název pro látku mající imunomodulační účinky. Jedná se o mikrodispergovanou oxixelulosu, chemicky 1,4 β-D-polyanhydroglukuronovou kyselinu, ta se používá ve formě sodno-vápenaté soli. MDOC™ je vyráběn společností Alltracel Pharma se sídlem v Dublinu (Irsko). Jeho molekulová hmotnost je 200 kD a jedná se o bílý amorfnní prášek bez výrazného zápachu, ve vodě tvoří koloidní disperze. Při aplikaci na rány vykazuje adstringentní působení. In vitro stimuluje tato látka buňky imunitního systému, pravděpodobně také stimulací produkce TNF-α. In vivo aplikace způsobí stimulaci buněk kostní dřeně a zvýšení počtu monocytů a lymfocytů B.



Obrázek: Chemická struktura MDOC™. Náhodný kopolymer polyanhydroglukózy a polyanhydroglukuronové kyseliny ve formě soli.^{43, 59}

3. Materiál a metody

3.1. Pokusná zvířata a navození experimentálního kryptorchismu

Experiment byl proveden na samcích laboratorních potkanů Wistar. Skupina čítala 5 zvířat přijatých dne 19. 9. 2005 a byla chována za standardních podmínek ve viváriu FaF UK.

Navození experimentálního kryptorchismu jsme provedli 8. 11. 2005 za použití celkového anestetika Narkamon Spofa 1% inj.sol. Množství podaného roztoku jsme určili z hmotnosti zvířat a jejich individuální odpovědi (podrobně viz tabulka). Anestetikum bylo aplikováno intraperitoneálně. Operaci podstoupila všechna pokusná zvířata, z toho jedno bylo operováno slepě. Navození kryptorchismu spočívalo v rozříznutí kůže a svaloviny dutiny břišní cca 2 cm, vytlačení varlete ze skrota a jeho relokace do dutiny břišní. Zpětnému návratu do skrota jsme zamezili přestřižením gubernakula. Zvířata podstoupila intratestikulární injikaci operovaného varlete roztokem MDOC™ v určitém množství. Po aplikaci MDOC™ jsme oblast peritonea (3-4 stehy Cutgut) a podkoží (3-4 stehy hedvábí) zašili. U slepě operovaného jedince jsme pouze provedli řez svaloviny a dutiny břišní, vyjmutí a navrácení varlete do skrota. Po operaci jsme sledovali jejich zdravotní stav. Potkan označený jako H uhynul. Experiment proveden dne 8. 11. 2005. (Tabulka 1).

3.2. Odběr materiálu

Usmrcení zvířat jsme provedli inhalačním anestetikem Ether pro narcosi v exsikátoru. Pak jsme zvířata otevřeli a vyňali varlata a nadvarlata. Zaznamenávali jsme délku varlat pomocí měřítka s přesností na milimetry a jejich hmotnost na elektronických vahách Soehnle s přesností na desetiny gramu. Poté jsme odebraný materiál

ponořili do Bouinova roztoku a část do formalínu. Odběr proveden dne 15. 11. 2005 jako pokus číslo 1531 (Tabulka 2).

3.3. Další materiál určený k analýze

Pro potřeby naší práce jsme použili již fixovaný materiál z dalších dvou pokusů. Jednalo se opět o experimentální unilaterální kryptorchismy analogické k našemu pokusu. Nebyl zde však použit MDOC™. Na těchto pokusech jsme zaznamenávali kryptorchické změny v intervalech kratších než 1 týden. Jednalo se o pokus č. 1360 ze dne 21. – 23. 1. 2002 a č. 1559 ze dne 30. 5. 2006.

3.4. Zpracování materiálu pro histologickou analýzu

1. FIXACE
2. ODVODNĚNÍ
3. PROJASNĚNÍ
4. PROSYCENÍ A ZALITÍ DO PARAFINU
5. KRÁJENÍ, LEPENÍ NA PODLOŽNÍ SKLÍČKA
6. BARVENÍ
7. ZAMONTOVÁNÍ
8. HODNOCENÍ

3.4.1. Fixace

Fixace je rychlé vysrážení (denaturace) bílkovin protoplazmy buněk a tkání fixačními prostředky. Cílem této procedury je zabránit samovolnému rozkladu tkáně (autolýze), která je podmíněna působením enzymů. Autolýza vede ke změnám protoplazmy a až k úplnému rozkladu buněk a tkání. Fixace musí být schopna zachovat

původní strukturu tkáně, její barvitelnost a musí do tkáně rychle pronikat. Tkáň je nutno vložit do fixační tekutiny co nejrychleji po odebrání. Fixovali jsme v Bouinově roztoku a ve formalínu.

3.4.2. Odvodnění, projasnění, prosycení a zalití do parafinu

Odvodnění se provádí pomocí vzestupné alkoholové řady nebo acetonem. Projasnění znamená odstranění ethanolu ze tkáně rozpouštědlem parafinu (xylen, benzen nebo toluen). Následuje prosycení parafinem (teplota parafinu nesmí překročit 58°C) a vlastní zalití vzorků do zkvalitněného parafinu za vzniku tkáňových bločků.

Postup:

Fixace v Bouinově roztoku:

Bouinův roztok	3 dny
80% ethanol	1 hodina
aceton	3krát během 24 hodin
xylen	2krát během 10 minut
parafin	2krát během 24 hodin
zalití do parafinu	

Složení roztoků:

Bouinův roztok	
Nasycený roztok kyselina pikrové	300 ml
Formol neutrální	100 ml
Před použitím se přidá 3 ml kyseliny octové ledové na 100 ml roztoku	

Formol neutrální
10% formol (obsahuje 4% formaldehydu)

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

Parafin

Tuhý parafin zkvalitněný 3 -5 % bílého včelího vosku.

Fixace ve 4% formalínu:

Formalín	48h
70% ethanol	½ hodiny
70% ethanol	½ hodiny
80% ethanol	3 hodiny
90% ethanol	2 hodiny
96% ethanol	přes noc
aceton	½ hodiny
aceton	½ hodiny
xylén	2 hodiny
xylén	4 hodiny
parafin	přes noc
parafin	přes noc
zalití do parafinu.	

3.4.3. Krájení a lepení na podložní sklíčka

Materiál (parafinové bločky) jsme krájeli na sáňkovém mikrotomu Leitz na řezy o tloušťce 7µm. Přichycení na podložní sklíčka jsme prováděli pomocí glycerinu s bílkem.

3.4.4. Barvení

Barvení Hematoxylin & eosin (H&E)

odparafinování:	3krát xylen	5min
	96% ethanol	5min
	70% ethanol	5min
	destilovaná voda	5min
	otření sklíček	
barvení:	hematoxylin	6-8 min
	pramenitá voda	10 min (modření)
	otření sklíček	
	eosin	2 min
	destilovaná voda	opláchnutí
odvodnění:	2krát 96% ethanol	opláchnutí
	ethanol-xylen (2:1)	3 min
	ethanol-xylen (1:2)	3min
projasnění:	3krát xylen	3min
	otření sklíček	

Roztoky:

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	40,0 ml

Eozin

1% roztok eosinu v destilované vodě

Výsledek barvení:

Jádra buněk se zbarví modře, kolagenní vazivo růžově, svalstvo červeně.

Barvení zelený trichrom (ZT)

1. Řezy odparafinujeme až do vody a podložní sklíčka otřeme.
2. Odparafinované řezy vyprané ve vodě předbarvíme hematoxylinem 3 – 5 min.
3. Opláchneme ve vodě.
4. Oplachem diferencujeme v kyselém alkoholu za kontroly v mikroskopu.
5. Vypíráme 5 min. v tekoucí vodě, otřeme a opláchneme destilovanou vodou.
6. Barvíme kyselý fuchsin-ponceau 3 – 5 min.
7. Opláchneme řezy 1% kyselinou octovou.
8. Diferencujeme roztokem oranže G a kyseliny fosformolybdenové za kontroly v mikroskopu až kolagenní vazivo zůstane téměř bezbarvé (30 min).
9. Opláchneme 1% kyselinou octovou.
10. Dobarvíme roztokem světlé zeleně 3 – 5 min.
11. Opláchneme třemi lázněmi 1% kyseliny octové, tekutinu z řezu odsajeme filtračním papírem.

12.Odvodníme v jedné lázni 96% ethanolu, alkohol-xylenu (2:1) a xylen-alkoholu.

13.Projasníme třemi lázněmi xylenu.

Roztok ponceau–kyselý fuchsin:

roztok A: kyselý fuchsin	1g
destilovaná voda	100 ml
kyselina octová ledová	
roztok B: Ponceau 2R	1g
destilovaná voda	100 ml
kyselina octová ledová	1ml

Roztoky se připraví rozpuštěním barviv ve vařící vodě a přidáním kyseliny octové ledové po zchlazení. Před použitím smísíme 1 díl roztoku A se 2 díly roztoku B.

Roztok oranže G a kyseliny fosformolybdenové:

destilovaná voda	100 ml
kyselina fosformolybdenová	5 g
oranž G	2 g

Roztok světlé zeleně:

destilovaná voda	100 ml
světlá zeleň	0,2 g
kyselina octová ledová	0,5 ml

Výsledek barvení: jádra buněk jsou obarvena modře až hnědočerně, svalstvo červeně, erytrocyty oranžově, kolagenní vazivo zeleně.

Barvení PAS (Periodic Acid Schiff)

1. odparafinované řezy převést až do 70% alkoholu
2. přímo ze 70% alkoholu oxidovat v 1% acidum periodicum (kyselina jodistá) v 70% alkoholu 5 – 7 min.
3. redukce v sirnatanové lázni cca 30 sek.
4. opláchnout v 70% alkoholu
5. opláchnout v destilované vodě
6. barvení v Schiffově reagens 20 – 30 min.
7. Schiffovo reagens slít z preparátu do kyvety s pramenitou vodou a nechat stát asi 5min.
8. práť v tekoucí vodě asi 20 min.
9. jádra dobarvit Gill. Hematoxylinem 2 min.
10. diferencovat kyselým alkoholem, nechat modrat v pramenité vodě

Výsledek barvení:

Oxidace polysacharidů kys. jodistou na aldehydy, které reagují s Schiffovým reagens za vzniku fialově červeného barvení. Polysacharidy, neutrální mukosubstance a glykogen se zbarví karmínově červeně, jádra buněk modře, erytrocyty žlutě.

Příprava roztoku:

Acidum periodicum: 1g kyseliny jodisté do 100 ml 70% alkoholu

Sirnatanová lázeň: Kalium jodatum 10g
Sirnatan sodný 10g
1M HCL 10g
destil. voda 125 ml

1M HCL: 8 ml konc. HCL do 100 ml destilované vody,
žlutozelené zbarvení

Schiffovo reagens:

1 g (1,5 g) krystalického bazického fuchsinu přelijeme 200 ml vařící destilovanou vodou. Za občasného promíchání třepeme při pokojové teplotě do ochlazení roztoku asi na 50 - 60 °C. Opatrně zfiltrujeme do zabroušené lahve (filtrační papír často měníme) a přidáme 20 ml 1M HCl. Po úplném pozvolném zchladnutí na 25°C přidáme 1 g bezvodého kalium metabisulfit (pyridosiřičitan draselný). Baňku s roztokem zazátkujeme (ne zátkou z buničiny) a necháme stát přes noc ve tmě při pokojové teplotě. Správný roztok má slámově žlutou barvu. Uschováme v lednici. Pozor! Roztok ze zásobní láhve nabíráme vždy čistou a suchou pipetou. Zbytek z pipety nikdy nevracíme zpět do lahve. Láhev s roztokem nenecháváme zbytečně stát v teple.

3.4.5. Zamontování

Zamontování jsme u barvení HE a ZT prováděli do kanadského balzámu, u barvení PAS do solakrylu.

3.4.6. Hodnocení

Histologické hodnocení preparátů jsme prováděli pomocí mikroskopu Nikon Elipse E200, mikroskopu Hund Wetzlar V300, digitální kamery PixelINK PL-A642, Vitana Corp. a programu LUCIA ver. 5.0, Laboratory Imaging Praha.

4. Výsledky

4.1. Makroskopické hodnocení odebraného materiálu

Jak ukazuje tabulka 2 dochází k signifikantním makroskopickým změnám kryptorchických varlat po 7 dnech od operace v porovnání s kontralaterálními kontrolami i slepě operovanými testes.

Délka poškozených varlat je menší než délka intaktních, a to v průměru o 22,4%. Pokles hmotnosti operovaných varlat je v procentuelním vyjádření ještě více zřetelnější, naměřili jsme v průměru zmenšení o 52,6%.

Délka a hmotnost varlat slepě operovaných zvířat a kontrol se výrazně neliší, musíme brát v úvahu interindividuální rozdíly.

4.2. Histologické hodnocení odebraného materiálu

Jelikož jsme měli k dispozici 3 typy barvení, lze celý histopatologický proces detailněji sledovat z hlediska různých cytologických komponent. Buněčné struktury, které jsou více zvýrazněny při jednotlivých barveních viz kapitola 3.

Fotodokumentace preparátů je zařazena v obrazové příloze. Popis jednotlivých časových intervalů je zaměřen na degenerativní znaky v tubulech, přičemž nejpodrobněji jsou popsány u intervalu 7 dnů.

4.2.1. Kontrolní tkáň

Vzorky poškozené tkáně jsme porovnávali se vzorky tkáně kontralaterálních kontrol a slepě operovaných zvířat. Mezi těmito dvěma kontrolami nejsou žádné histologické rozdíly. Na obrázku 1 obarveném PAS (kontralaterální kontrola) je zvýrazněno zejména intersticiium a nejdiferencovanější stádia zárodečných buněk. Průměr kanálků se pohybuje kolem 200 μm . Kanálek obsahuje kompletní populaci zárodečných buněk. Výrazně PAS pozitivní jsou pozdní

spermatidy a spermatozoa. Jádra jsou zde také obarvena. Na obrázku 1 lze také pozorovat různá stadia zárodečného epitelu v kanálcích.

Obrázek 2 ukazuje kontrolní slepě operované zvíře. Jsou zde dobře vidět synchronizované populace zárodečných buněk pocházejících ze stejného stadia zárodečného epitelu. Dobře je vidět hlavička spermie (tvar háčku). Mimo normálně vypadajících semenotvorných kanálků s volným lumen jsou zde zachyceny i kanálky sice s normální spermatogenezí, ale s lumen vyplněným shlukem zárodečných buněk v různých stádiích vývoje. Takovýto způsob uvolnění nezralých stádií je popisován jako artefakt spojený s odběrem biologického materiálu.

Zdravé nadvarle – obrázek 4. Lze si všimnout bazálních a sekrečních buněk a také stereocilií po obvodu kanálků. Nadvarle vykazuje normální zralá spermatozoa.

(Obr. 1, 2, 3, 4)

4.2.2. Interval 1 hodina

Ve varleti poškozeném 1hodinovým kryptorchismem jsme pozorovali ložisková zúžení semenotvorných tubulů, včetně desintegrace zárodečného epitelu. Nezralá stadia zárodečných buněk jsme viděli v nadvarleti a to včetně apoptotických (pyknotická jádra, eosinofilie cytoplazmy). Nepozorovali jsme přítomnost mnohojaderných buněk.

(Obr. 5, 6, 7)

4.2.3. Interval 24 hodin

Na obrázku 8 pozorujeme signifikantní rozvolnění zárodečného epitelu. I nezralá stadia zárodečných buněk vidíme uvolněna do centrální části tubulů a odtud odcházejí do vývodných cest

(obrázek 9). V kanálcích nadvarlete je výrazná redukce počtu zralých spermatozoí. Naopak populace nezralých gamet (včetně apoptotických) byly zachyceny ve většině řezů kanálku nadvarlete. (Obr. 8, 9)

4.2.4. Interval 48 hodin

Pro tento interval je charakteristická pokračující dezintegrace zárodečného epitelu, ztráta kontinuity způsobila uvolňování zárodečných buněk (spermatocytů). Apoptotické buňky byly také přítomny. Mnohojaderné buňky nenalezeny (obr. 10 a 11).

4.2.5. Interval 6 dnů

Kromě výše uvedených degenerativních znaků je v šesti dnech patrná narušená stratifikace zárodečného epitelu vakuolizací a přítomností mnohojaderných buněk (obr. 12).

4.2.6. Interval 7 dnů – po aplikaci MDOC™

Obrázek 13 ukazuje výrazně zbarvenou tunica albuginea, pod kterou se nacházejí příčné řezy semenotvornými kanálky. Jejich průměry se výrazně liší mezi těmi, jež téměř neobsahují buňky germinativního epitelu od průřezů, v nichž jsme pozorovali degenerovaná stadia. Jedny mají prázdný lumen a jsou menší, druhé mají větší lumen. Rozměr randomizovaně měřených kanálků se pohyboval od 80 μm do 200 μm .

Obrázek 14 ukazuje semenotvorný kanálek obsahující téměř výhradně Sertoliho buňky, jejichž cytoplazma je výrazně rozvětvena,

takže místy vytváří nepravidelné výběžky (šipka). Hranici tubulu tvoří zvlněná tunica propia bez výrazného ztlustění, komponovaná z plochých buněk. Jádra Sertoliho buněk jsou umístěna v její blízkosti a jen ojediněle jsou přítomny zárodečné buňky. Zárodečné buňky právě podléhají apoptóze, soudě podle eozinofilie, a pyknotických jader.

V intersticiu jsme pozorovali ostrůvky Leydigových buněk v okolí cév.

Obrázek 15. V kanálcích, které obsahují degenerovaná stadia zárodečných buněk, můžeme pozorovat bohatou cytologickou výbavu kanálku. Od bazální membrány (je rovnější, ne tak zvlněná) jsou vidět na bazi jádra spermatogonií, z nichž některé (s tmavými jádry) rovněž podléhají degeneraci.

Další vrstvy adluminálně reprezentují těla a jádra Sertoliho buněk. K tělům jsou přiřazeny další vývojová stadia germinativního epitelu od spermatocytů 1 (časný spermatocyt) po spermatozoa. Všechna tato stadia však jeví znaky degenerací od pyknózy jader po silnou eozinofilii cytoplazmy, které jsou průvodním jevem apoptózy (šipka). V dolní části pozorujeme stádium mnohojaderných buněk, ty představují non-disjunkci jader při mitotickém dělení.

Obrázek 16 ukazuje pokročilejší stádium degenerace tubulu s velkým počtem mnohojaderných buněk v lumen (šipka).

Na obrázku 17 je detail mnohojaderné buňky. Jádra jsou většinou na periferii v počtu 5 – 20. Lze pozorovat jádra, jež mají chromatin rozprostřený, nebo srpkovitý. Jádra jsou uložena v silně eozinofilní cytoplazmě.

Překvapivý byl nález kanálku, kde je kompletně dezintegrována stavba zárodečného epitelu, nejsou zachována těla Sertoliho buněk,

lumen kanálku vyplňují volně uložené buňky jevící výrazně degenerativní apoptotické znaky, tj. opět pyknóza a rozpad jádra, silná eozinofilie cytoplazmy (šipka). Mezi nimi jsou amorfní shluky sférického eozinofilního materiálu (šipka), tento atypický kanálek viz obrázek 18.

Na obrázku 19 je vidět zajímavý jev. Jedná se o ložisko (granulom) z početné populace makrofágů nacházející se těsně pod tunica albuginea. Navíc lze pozorovat výrazně více makrofágů na všech místech řezů. To je zapříčiněno pravděpodobně MDOC™, při umělém kryptorchismu bez jeho aplikace se ve vzorcích makrofágy v takového míře nevyskytují. Šipka označuje náhodný nález pro srovnání monocytu a aktivovaného makrofágu. Na tomto místě vzorku se nacházejí také lymfocyty.

Stejný typ buněk jsme pozorovali v intersticiu ve vztahu ke stěně kanálku i cévám zásobujícím intersticiu (obrázek 21). Barvení PAS také prokázalo ložisko makrofágů pod tunica albuginea (viz obrázek 20).

(Obr. 13 – 25)

5. Diskuse

Kryptorchismus je jednou z nejčastěji se vyskytujících abnormalit postihující až 5% chlapců. Máme k dispozici několik modelů na kterých lze zkoumat kryptorchické poškození zárodečného epitelu. Jedná se o unilaterální, či bilaterální kryptorchismus navozený mechanicky, endokrinologicky (vyvoláním hormonální disbalance v prenatálním období), nebo se může jednat o mutantní pokusná zvířata s vrozeným kryptorchismem.^{13, 25}

Odborná literatura naznačuje několik možných mechanismů poškození kryptorchického varlete, avšak panuje všeobecná shoda, že vyvolávajícím faktorem těchto mechanismů je teplota a jejich vyústěním apoptóza.

Kumagai a kol. popisují termosenzitivitu proteinu HSP 105, který při skrotální teplotě váže pro-apoptotický protein p53 a je lokalizován v cytoplazmě zárodečných buněk. Při nadskrotálních teplotách se naopak přesouvá do jádra a dochází k disociaci vazby na p53.¹⁴

HSF je transkripční faktor HSP genů, ale může sám o sobě také indukovat apoptózu. Při tepelném stresu se váže na DNA a způsobuje apoptotickou smrt primárních spermatocytů, naproti tomu chrání spermatogonie.^{15, 16}

S nadskrotálními teplotami také souvisí vyšší produkce volných radikálů, kterou prokázali Petola a kol. nálezem vysoké hladiny peroxidovaných lipidů v kryptorchickém varleti. Zvýšená produkce volných radikálů může přispívat k degeneraci zárodečného epitelu patrně také apoptotickým mechanismem.²⁰

V odborných studiích je k detekci apoptózy často využívána metoda TUNEL, jedná se o histochemickou metodu značení DNA, přičemž se takto prokazuje její fragmentace. V naší práci jsme neměli

k dispozici takovouto přesnou metodu a apoptotické buňky jsme se snažili identifikovat pomocí histologických znaků: eozinofilii cytoplazmy, pyknózy a rozpadu jádra.

Jak je patrné z makroskopického hodnocení, snížila se v naší studii váha kryptorchického varlete 7 dnů od operace s aplikací MDOC™ v průměru o 52,6%. To je významně více, než naměřili Shikone a kol. ve své studii experimentálního kryptorchismu, jejich údaje hovoří o 24% za 7 dnů.

Histologické barvení kanálků kryptorchického varlete nám v intervalu jedné hodiny neumožnilo pozorovat apoptotické degenerativní změny. V nadvarletí se však již objevují odloučené nezralé buňky vykazující znaky apoptózy (pyknóza jader, eozinofilie cytoplazmy). Histologické znaky apoptózy v semenotvorných kanálcích uvádějí Izu a kol. po 8 hodinách od tepelného stresu varlete (43°C, 15 min.).

Od intervalu 24 hodin jsme v našich preparátech nacházeli zárodečné buňky semenotvorného kanálku vykazující apoptotické znaky. Nedílnou součástí našich pozorování byla také desintegrace zárodečného epitelu a s ní související odlučování nezralých zárodečných buněk do lumen kanálku a od 6. dne také objevení se mnohояderných buněk a vakuolizace epitelu. Průměr některých kanálků byl menší než u kontrol. Bazální membrána nebyla ztluštěná.

Tato pozorování jsou v zásadě ve shodě s literárními zdroji, které se zabývají histologickým hodnocením zárodečného epitelu poškozeného kryptorchismem.^{8, 13, 22, 39}

Lui a kol. hovoří o ztluštění a poškození basální membrány během experimentálního kryptorchismu a považují jej za primární příčinu poškození hematotestikulární bariéry.^{21,}

Analýza DNA fragmentace v Shikoneho studii odhaluje apoptózu zárodečných buněk nejdříve 2. den.¹²

Zajímavé výsledky jsme odečetli na řezech varletem po sedmidenním kryptorchismu s aplikací MDOC™. Nález početné populace makrofágů ve zkoumaném varleti podporuje tezi o MDOC™ jako o imunomodulační látce.

Imunomodulační působení může být zprostředkováno pomocí TNF- α . Jak ukazují Siu a kol., TNF- α působí nepříznivě na junkční dynamiku hematotestikulární bariéry a jeho exogenní přívod způsobuje masivní ztrátu zárodečných buněk ze zárodečného epitelu.^{19, 59}

V intervalu 7 dnů jsme odečetli všechny již výše zmíněné degenerativní znaky od mnohojaderných buněk po apoptotické. Zajímavý a atypický byl nález velmi degenerovaného kanálku, ve kterém se nenacházely Sertoliho buňky. Tento nález vypovídá o až nepřiměřené degeneraci kryptorchického varlete, jež má možná souvislost s aplikací MDOC™.

Fertilita a vývoj kontralaterálního skrotálního varlete u pacientů s kryptorchismem zůstává kontroverzní. V naší práci jsme za použití výše uvedených metod nenalezli žádné histologické ani morfologické rozdíly mezi kontralaterálním varletem a slepě operovaným. Výsledky ostatních odborných studií se ovšem liší.

Ertugrul. a kol. zaznamenali nárůst objemu kontralaterálního skrotálního varlete, tento jev vysvětlují jako kompenzatorní.²²

Schärli vysvětluje sníženou fertilitu pacientů s unilaterálním kryptorchismem úbytkem zárodečných buněk skrotálního varlete apoptotickým mechanismem.²⁶

Watts a kol. oproti tomu nenalezli ve své studii na potkaním modelu žádné změny ve váze kontralaterálního varlete ani v apoptotických ukazatelích v porovnání se zdravou kontrolou.²⁵

Zakaria a kol. ve své studii uvádějí 10% snížení fertility u potkanů s unilaterálním kryptorchismem. V jiné studii uvádí histologické výsledky kontralaterálního skrotálního varlete v čase. Zatímco v intervalu 120 dnů nebyla testikulární váha skrotálního varlete u unilaterálně kryptorchického modelu v porovnání s kontrolou odlišná, za 200 dnů už byla zřetelně snižena. To samé platilo pro průměr tubulů.^{13, 32}

V dalších studiích je snížení kvality kontralaterálního skrotálního varlete připisováno snížení teplotního rozdílu mezi břišní dutinou a skrotem, který je způsoben větším krevním průtokem ve skrotálním varleti. Snížení teplotního rozdílu bylo pozorováno i u pokusných zvířat po orchidopexii.^{23, 30}

Z poznatků uvedených v této práci vyplývá, že bude v budoucnu nezbytné další zkoumání kryptorchického modelu pro pochopení mechanismů degenerativních změn.

6. Závěr

1. Sledovali jsme specifické znaky degenerace zárodečného epitelu na unilaterálně kryptorchickém modelu u potkanů Wistar. Skupina pokusných zvířat čítala 5 jedinců a byla chována za standardních podmínek ve viváriu FaF UK. U čtyř potkanů jsme chirurgicky navodili unilaterální kryptorchismus přestřihnutím gubernakula, přičemž u pátého (kontrolního) zvířete jsme pouze varle vyňali a následně opět vrátili do skrota. Varlata určená jako kryptorchická byla injikována 1% roztokem MDOC™.
2. Sedmý den byla zvířata usmrcena a odebraná varlata a nadvarlata morfolologicky zhodnocena měřením délky a stanovením hmotnosti. Dále byla zpracována pro světelnou mikroskopii konvenční mikroskopickou technikou. K dispozici jsme měli také vzorky z dalších pokusů prováděných za srovnatelných podmínek v kratších časových intervalech bez aplikace MDOC™. Zjistili jsme významné makroskopické změny v sedmi dnech od operace v porovnání s kontralaterálními skrotálními kontrolními varlaty i s varlaty kontrolního zvířete (vyjmutí a opětovné vrácení do skrota). Délka poškozených varlat byla menší než délka intaktních, a to v průměru o 22,4%. Pokles hmotnosti operovaných varlat byl v průměru o 52,6%.
3. Již po jedné hodině kryptorchismu jsme pozorovali desintegraci semenotvorného epitelu a zúžení tubulů. Signifikantní byl nález odloučených nezralých i apoptotických zárodečných buněk v lumen kanálku nadvarlete. Se vzrůstajícím časovým intervalem rostla i progrese degenerace zárodečného epitelu. V intervalu 24 hodin jsme sledovali rozvolnění cytoplazmy a

nezralé gamety odloučené v lumen semenotvorných kanálků. Apoptotické buňky byly také přítomny. Výše popsané znaky progredovaly v intervalu 48 hodin. Po šesti dnech se již v kryptorchickém varleti objevily další znaky degenerace jako mnohojaderné buňky a vakuolizace epitelu. Ve vzorcích tkáně odebrané po 7denním kryptorchismu s aplikací MDOC™ jsme odečetli významnou degeneraci zahrnující dokonce absenci Sertoliho buněk v některých kanálcích semenotvorném epitelu. Zkoumaná tkáň také obsahovala početnou populaci infiltrovaných makrofágů.

7. Přílohy

7.1. Tabulková příloha

Označení zvířete	Hmotnost (g)	Narkamon (ml)	Apl. roztoku 1% Lot. MDOC™
H	385	5	0,5 ml MDOC™ 3 stehy (břišní dutina) 4 stehy (podkoží)
LP	395	5	difuzní krvácení 3 stehy (břišní dutina)
PP	335	5+2	0,4 ml MDOC™
PZ	395	5	0,6 ml MDOC™ difuzní krvácení 4 stehy (břišní dutina) 4 stehy (podkoží)
LZ	375	5+2, 5+2	0,4 ml MDOC™ atypické nepřiměřené krvácení 3 stehy (břišní dutina) 4 stehy (podkoží)

Tabulka 1. Navození experimentálního kryptorchismu a aplikace MDOC™ Písmena H, LP, LZ, PP, PZ jsou barevným označením zvířete pro jejich identifikaci (hlava, levá přední končetina, atd.) 8. 11. 2005.

Označení zvířete	Hmotnost zvířete den před operací (g)	Vzorek odebrané tkáně fixován v (Bouin, Formalín)	Délka a hmotnost skrotálního a kryptorchického varlete - Poznámka
H	-----	-----	-----
1. LZ	365	zdravé abdomin. varle - B kryptorch. varle – F	s: 2,3 cm – 1,6 g k: 1,8 cm – 0,8 g - rána čistá klidná bez stehů
2. LP slepě operován (shame operated)	333	zdravé varle - B zdravé varle – F	s: 2,3 cm – 1,6 g k: 2,3 cm – 1,6 g - kontrolní rána klidná, čistá, stehy zachovány
3. PP	390	zdravé varle - B kryptorchické – F	s: 2,3 cm – 1,8 g k: 1,9 cm – 0,8 g - v místě rány srůst, stehy zachovány, reakce byla větší
4. PZ	401	nadvarle - B kryptorchické - F	s: 2,5 cm – 1,9 g k: 1,8 cm – 1,1 g rána zhojená, klidná a bez stehů

Tabulka 2. Odběry a makroskopická pozorování 15. 11. 2005.

7.2 Obrazová příloha

7.2.1. Seznam obrázků

Obrázek 1 Kontralaterální kontrola, varle, 7dnů, PAS, zvětšeno 100x.

Obrázek 2 Slepě operované varle, ZT, zvětšeno 100x.

Obrázek 3 Kontralaterální kontrola, varle, HE, zvětšeno 100x.

Obrázek 4 Kontrola, nadvarle, HE, zvětšeno 400x.

Obrázek 5 Kryptorchismus, varle, 1 hodina, PAS, zvětšeno 100x.

Obrázek 6 Kryptorchismus, nadvarle, 1hodina, HE, zvětšeno 100x.

Obrázek 7 Kryptorchismus, nadvarle, 1 hodina, HE, zvětšeno 400x.

Obrázek 8 Kryptorchismus, varle, 24h, HE, zvětšeno 100x.

Obrázek 9 Kryptorchismus, nadvarle, 24h, ZT, zvětšeno 200x.

Obrázek 10 Kryptorchismus, varle, 48 h, HE, zvětšeno 100x.

Obrázek 11 Kryptorchismus, varle, 48h, HE, zvětšeno 200x.

Obrázek 12 Kryptorchismus, varle, 6 dnů, HE, zvětšeno 100x.

Obrázek 13 Kryptorchismus, varle, 7dnů, HE, zvětšeno 40x.

Obrázek 14 Kryptorchismus, varle, 7dnů, HE, zvětšeno 200x.

Obrázek 15 Kryptorchismus, varle, 7dnů, HE, zvětšeno 200x.

Obrázek 16 Kryptorchismus, varle, 7dnů, HE, zvětšeno 200x.

Obrázek 17 Kryptorchismus, varle, 7dnů, HE, zvětšeno 400x.

Obrázek 18 Kryptorchismus, varle, 7dnů, HE, zvětšeno 200x.

Obrázek 19 Kryptorchismus, varle, 7dnů, HE, zvětšeno 400x.

Obrázek 20 Kryptorchismus, varle, 7dnů, PAS, zvětšeno 400x.

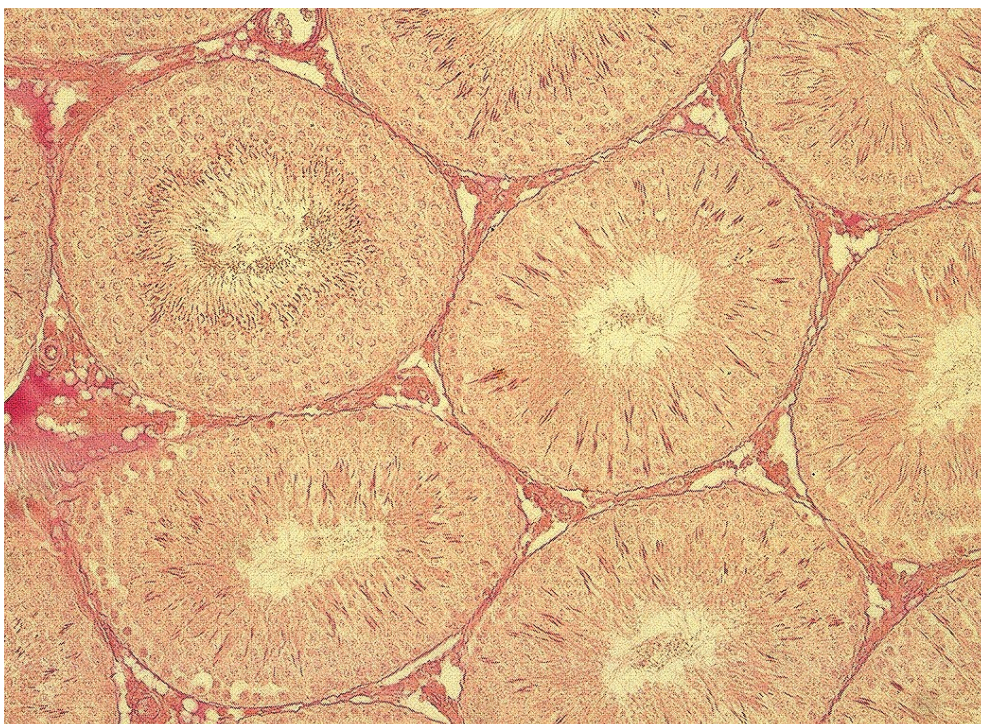
Obrázek 21 Kryptorchismus, varle, 7dnů, HE, zvětšeno 200x.

Obrázek 22 Kryptorchismus, varle, 7dnů, PAS, zvětšeno 400x.

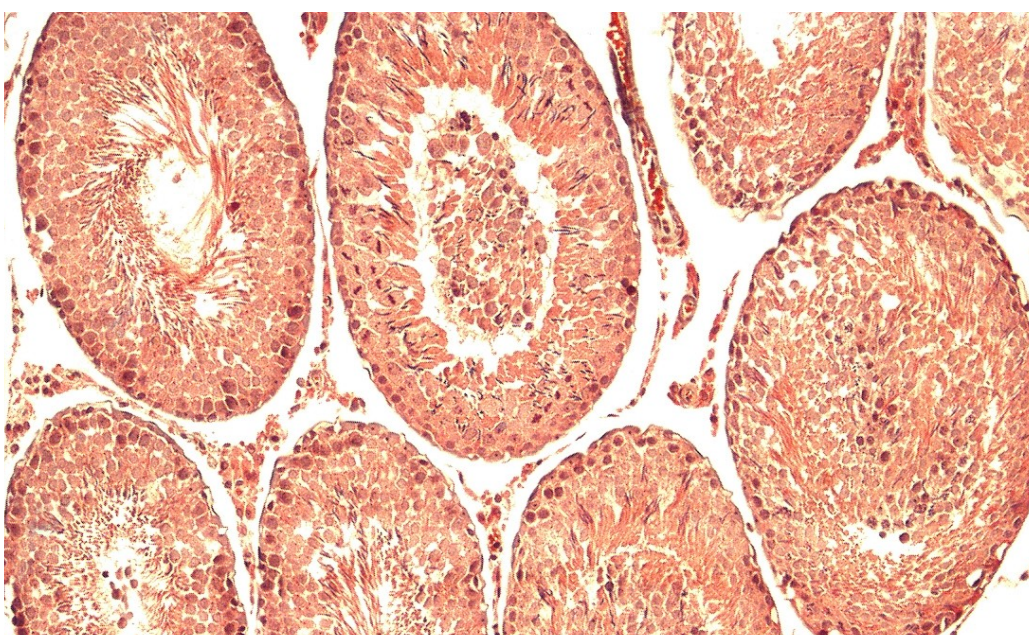
Obrázek 23 Kryptorchismus, varle, 7dnů, ZT, zvětšeno 200x.

Obrázek 24 Kryptorchismus, varle, 7dnů, ZT, zvětšeno 200x.

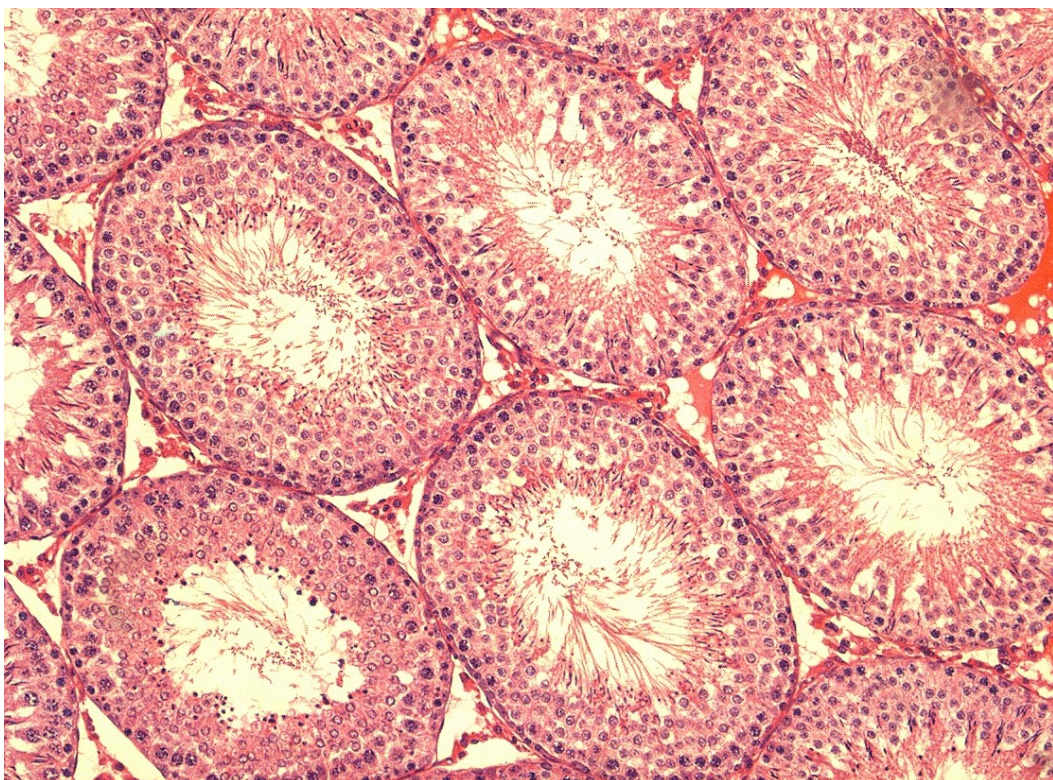
Obrázek 25 Kryptorchismus, varle, 7dnů, ZT, zvětšeno 400x.



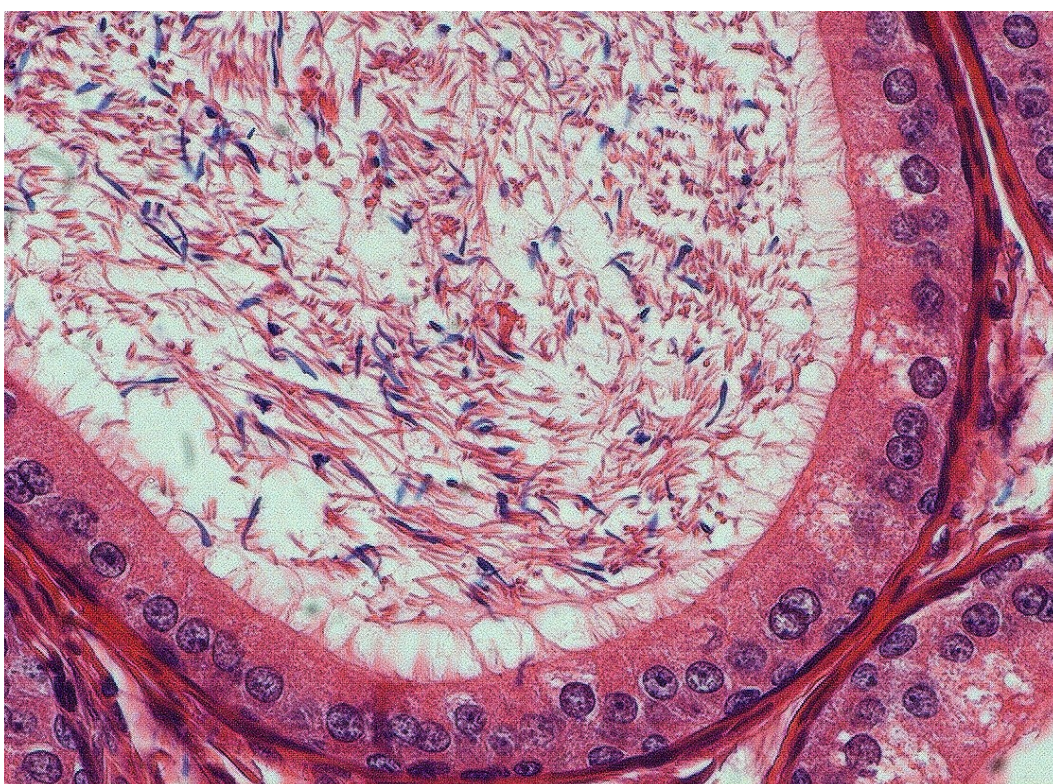
Obr. 1 – Kontralaterální kontrola, varle, 7dnů, PAS, zvětšeno 100x.
Můžeme pozorovat různá stádia zárodečného epitelu v kanálcích.



Obr. 2 – Slepě operované varle, ZT, zvětšeno 100x.
Synchronizované populace zárodečných buněk pocházejí ze stejného stádia zárodečného epitelu. Nezralá stádia uvolněná do lumen kanálku jsou spojena se zpracováním biologického materiálu a označují se jako artefakt.

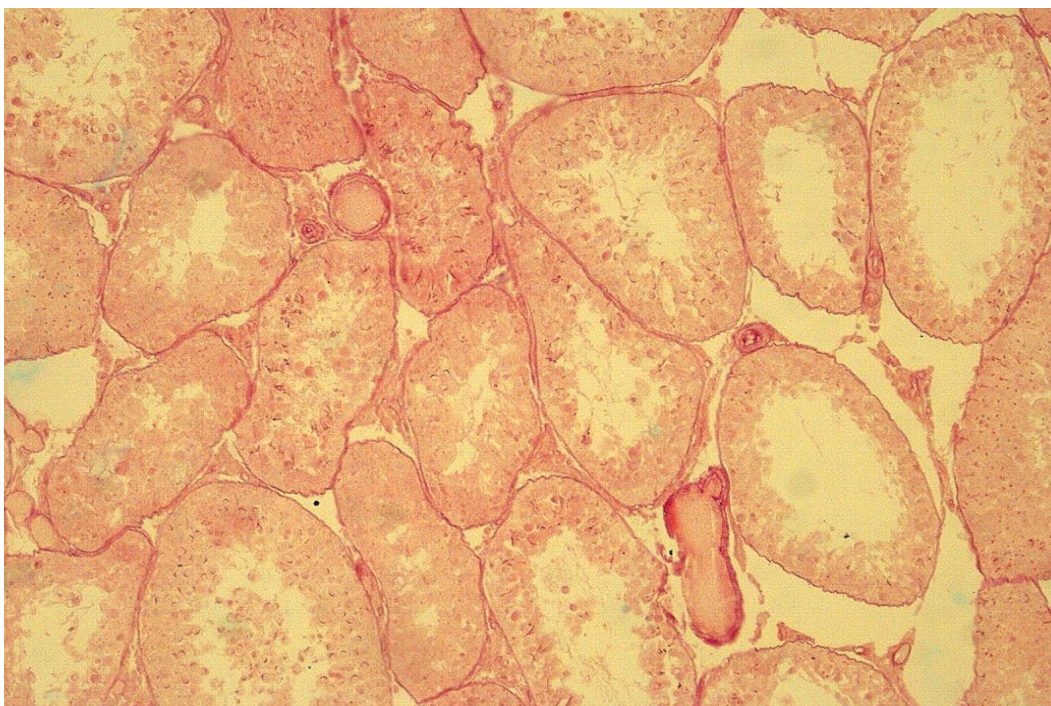


Obr. 3 – Kontralaterální kontrola, varle, HE, zvětšeno 100x.



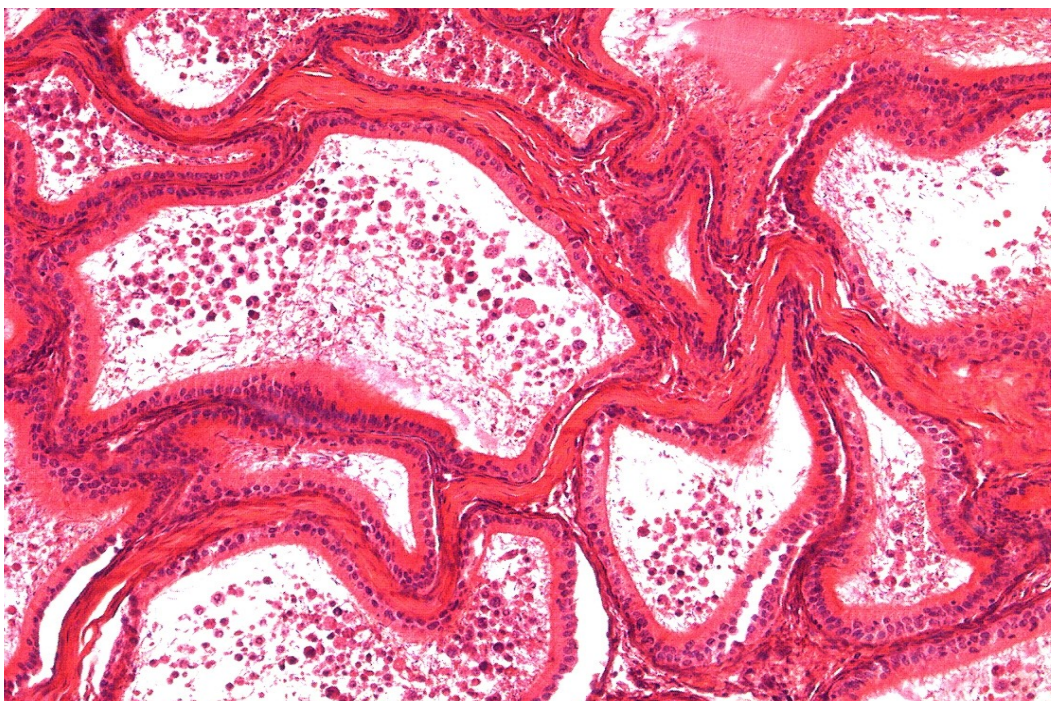
Obr. 4 - Kontrola, nadvarle, HE, zvětšeno 400x.

Nadvarle obsahuje normální zralá spermatozoa.



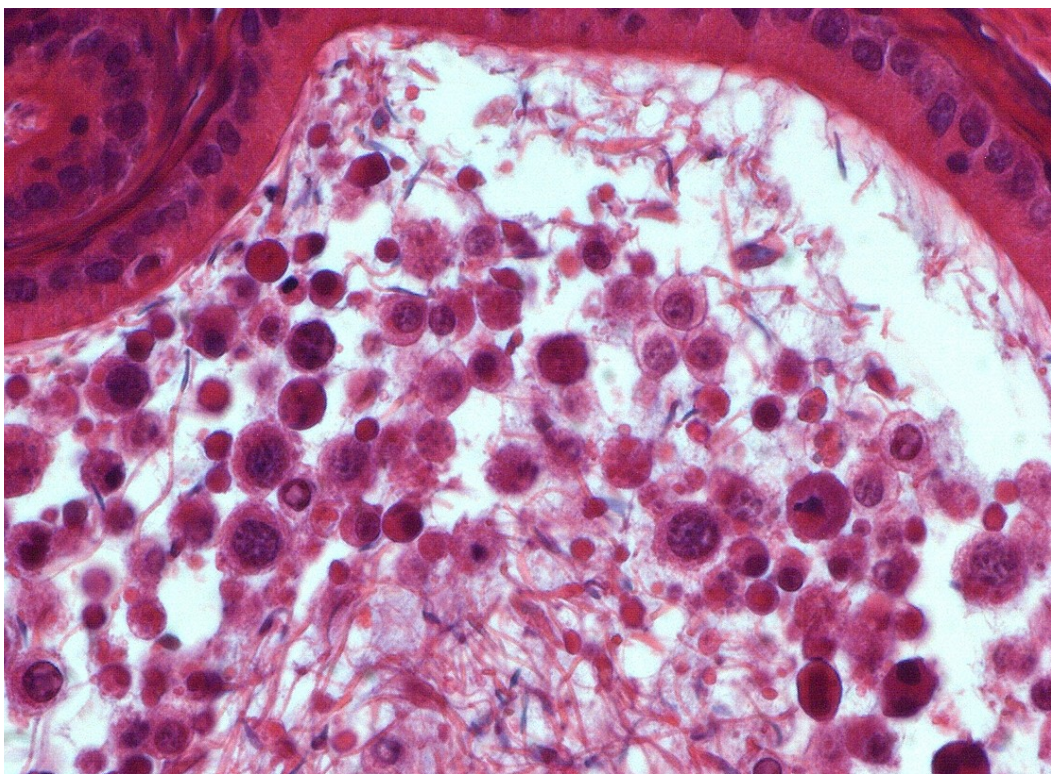
Obr. 5 - Kryptorchismus, varle, 1 hodina, PAS, zvětšeno 100x.

Lze si povšimnout ložiskových zúžení kanálků a desintegrace epitelu.

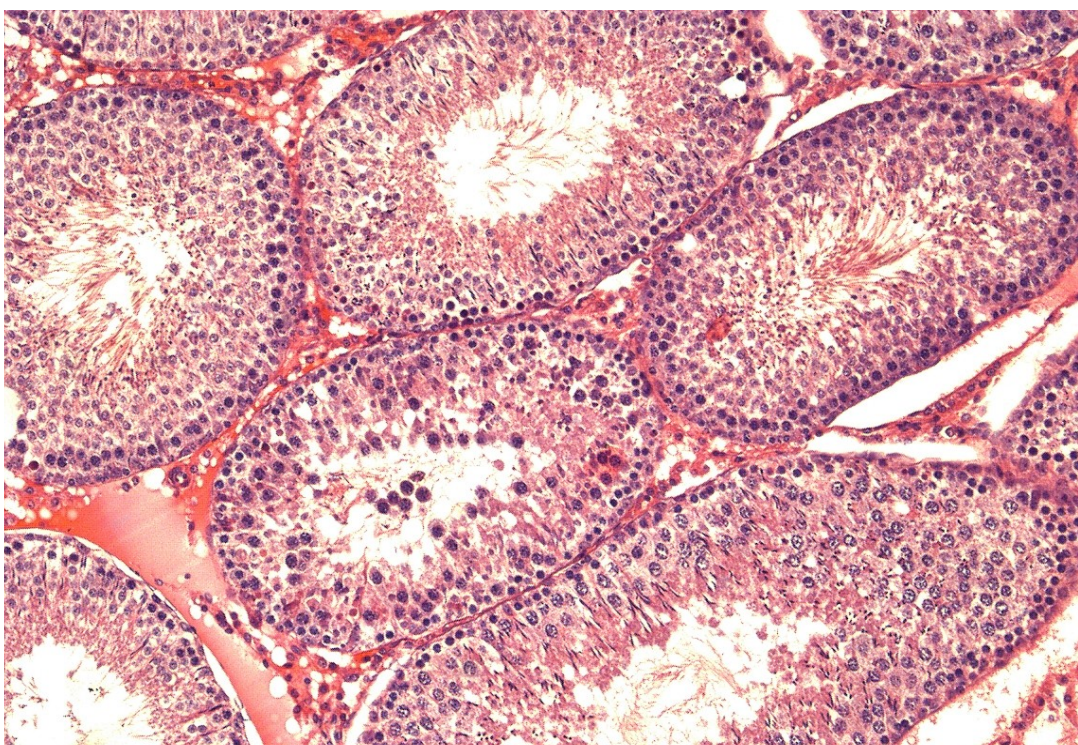


Obr. 6 - Kryptorchismus, nadvarle, 1hodina, HE, zvětšeno 100x.

Lumen kanálku obsahuje nezralá stádia zárodečných buněk. Některé nesou znaky apoptózy.

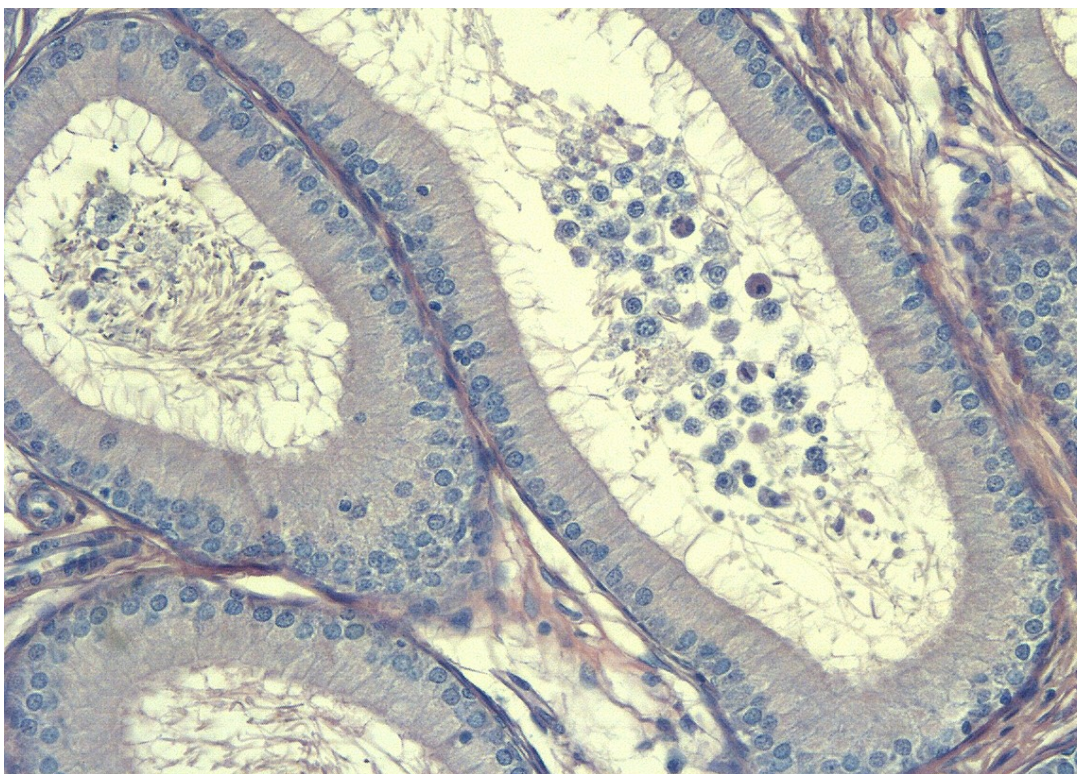


Obr. 7 - Kryptorchismus, nadvarle, 1 hodina, HE, zvětšeno 400x.



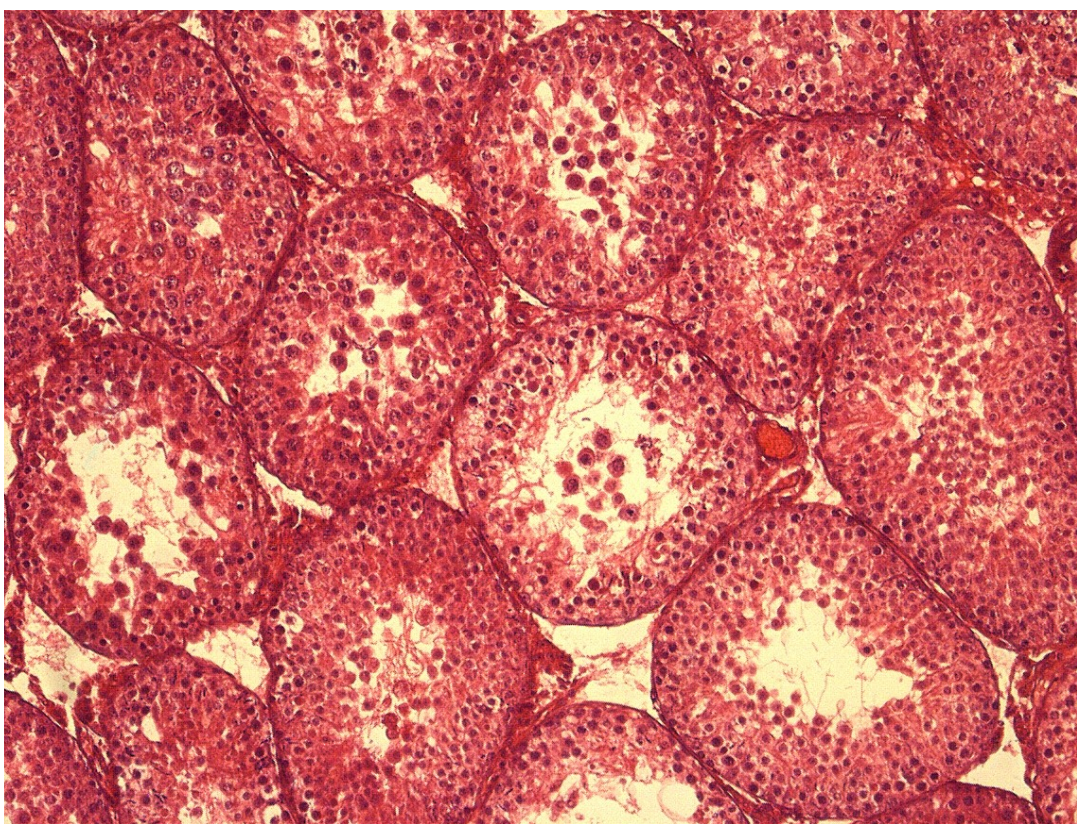
Obr. 8 - Kryptorchismus, varle, 24h, HE, zvětšeno 100x.

Dochází k rozvolnění zárodečného epitelu. Nezralá stádia zárodečných buněk jsou uvolněná v centrální části kanálku. Apoptotické buňky jsou také přítomny.



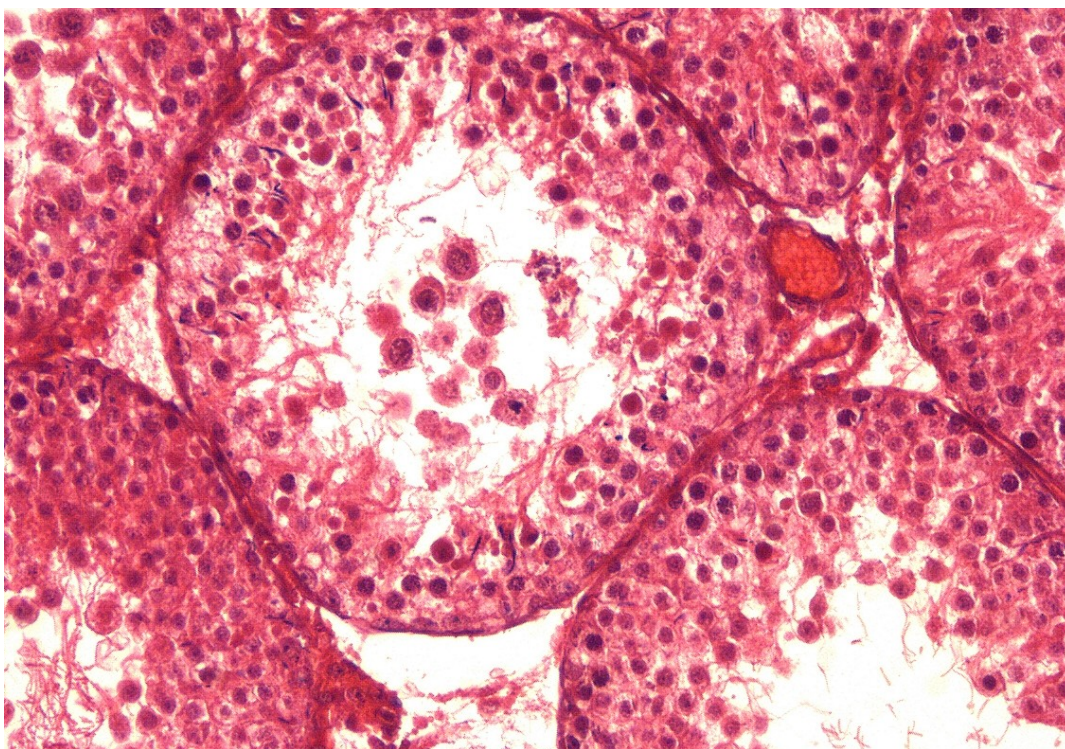
Obr. 9 - Kryptorchismus, nadvarle, 24h, ZT, zvětšeno 200x.

Je patrný nárůst počtu nezralých spermatozoí na úkor zralých gamet.

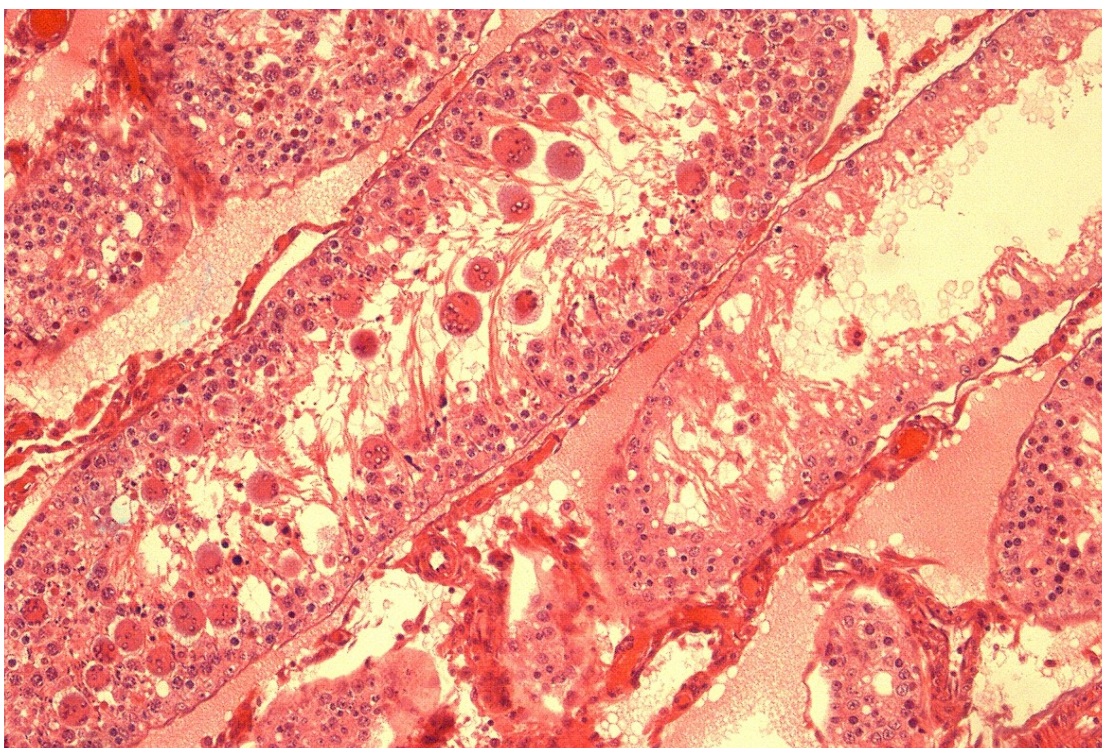


Obr. 10 - Kryptorchismus, varle, 48 h, HE, zvětšeno 100x.

Zde je vidět pokračující degeneraci zárodečného epitelu.

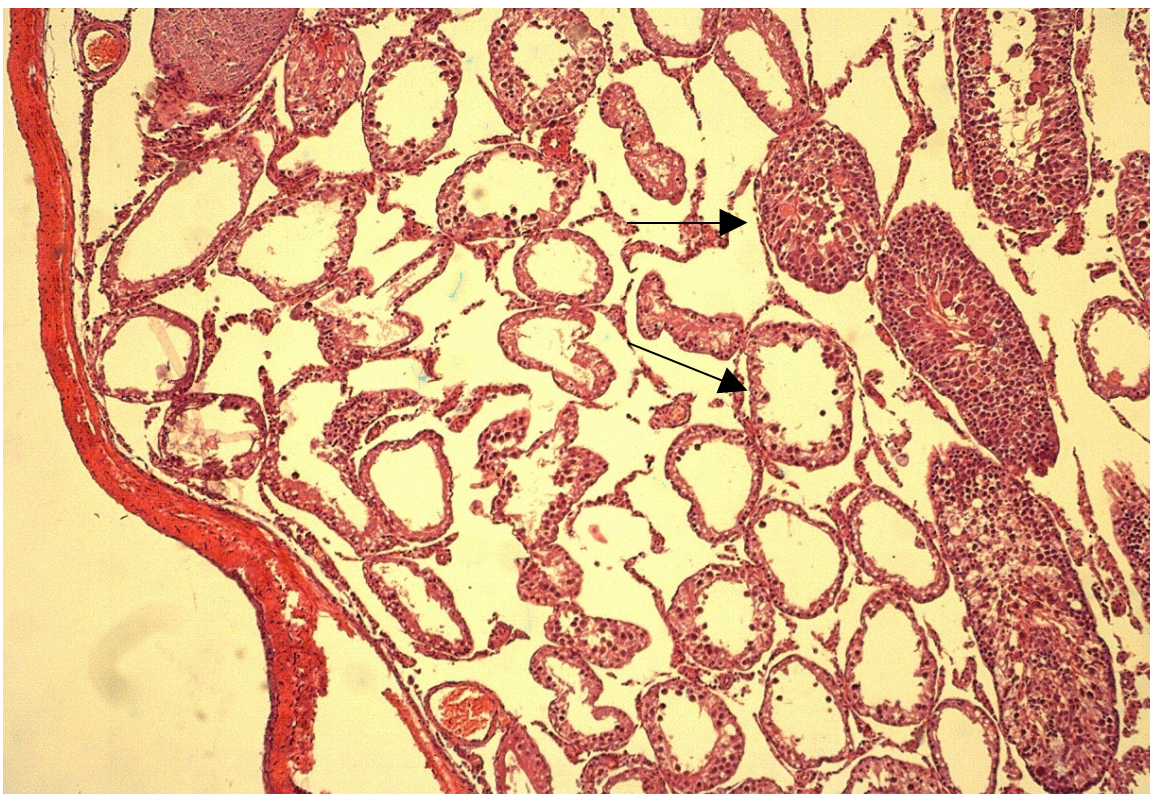


Obr. 11 - Kryptorchismus, varle, 48h, HE, zvětšeno 200x.

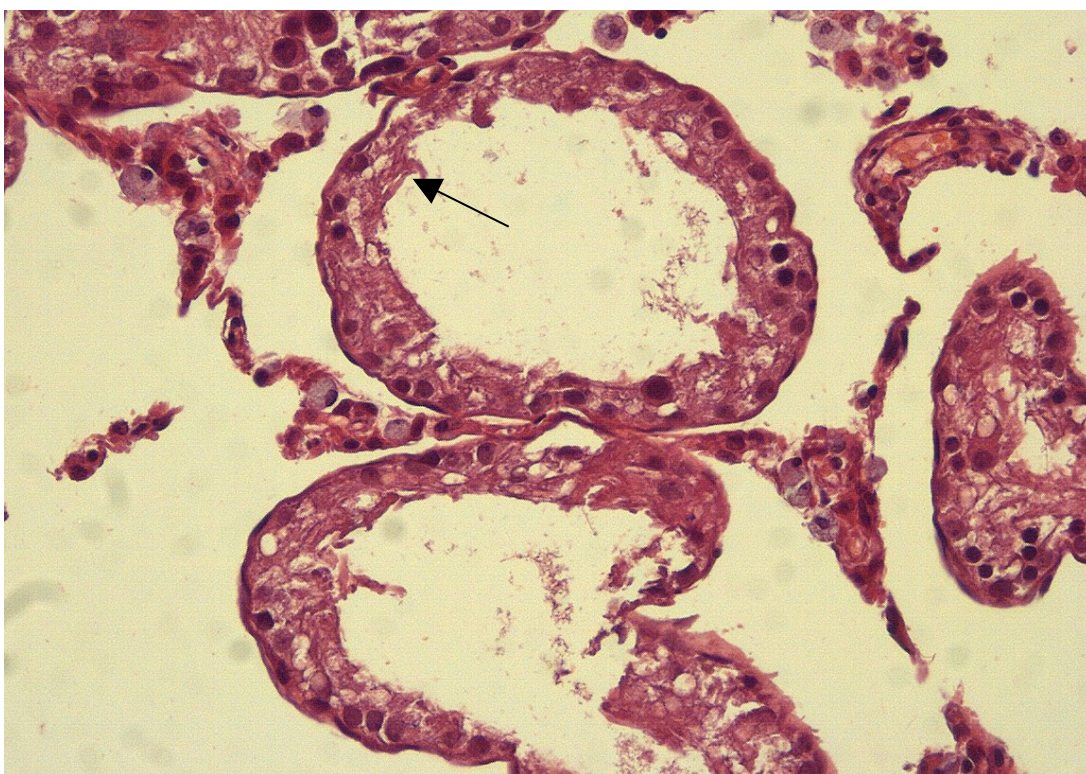


Obr. 12 - Kryptorchismus, varle, 6 dnů, HE, zvětšeno 100x.

Na tomto obrázku je již patrná vakuolizace a přítomnost mnohojaderných buněk.

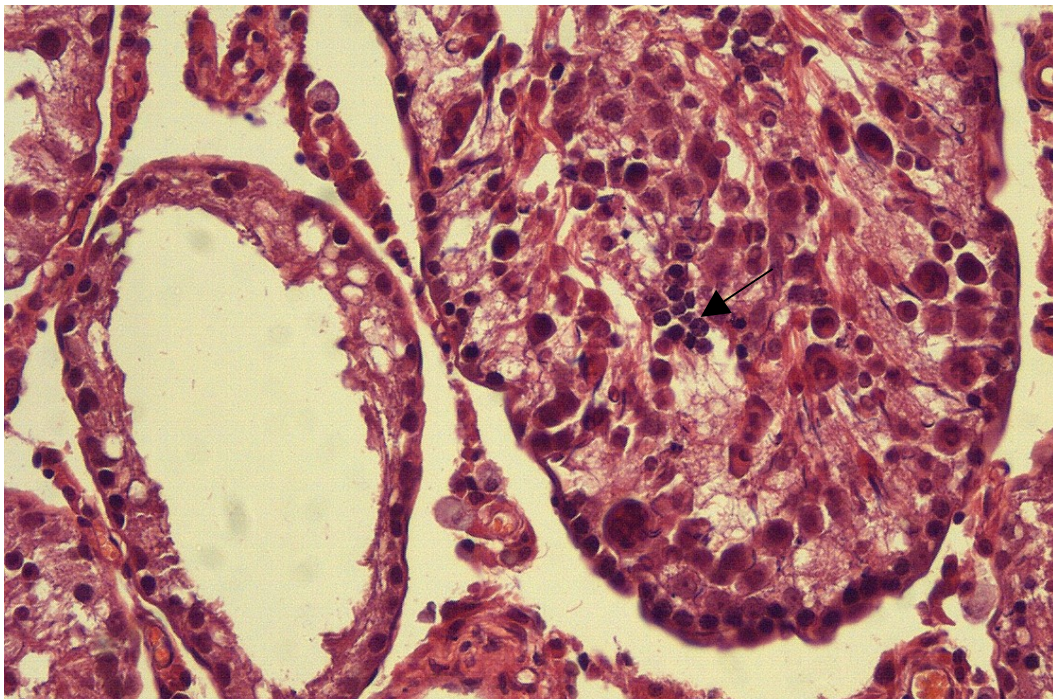


Obr. 13 - Kryptorchismus, varle, 7dnů, HE, zvětšeno 40x.
 Šipky ukazují dva typy degenerovaných kanálků.



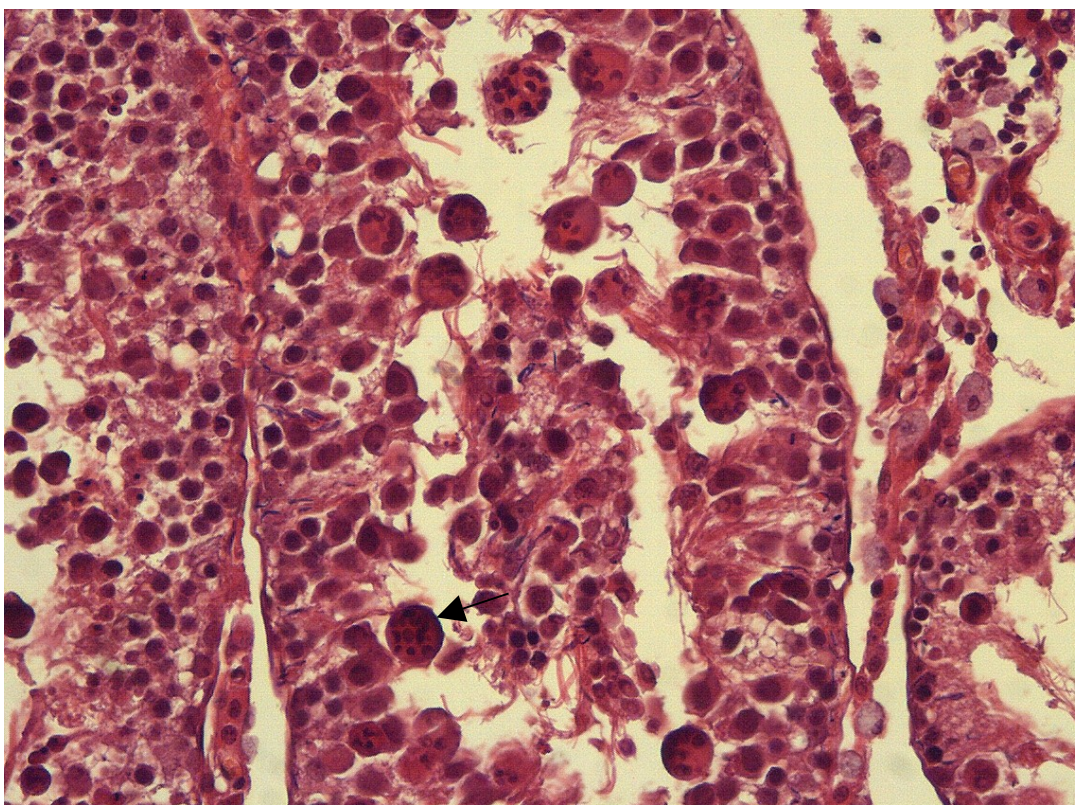
Obr. 14 - Kryptorchismus, varle, 7dnů, HE, zvětšeno 200x.

Kanálek obsahující téměř výhradně Sertoliho buňky, jejichž cytoplazma je výrazně rozvolněna.



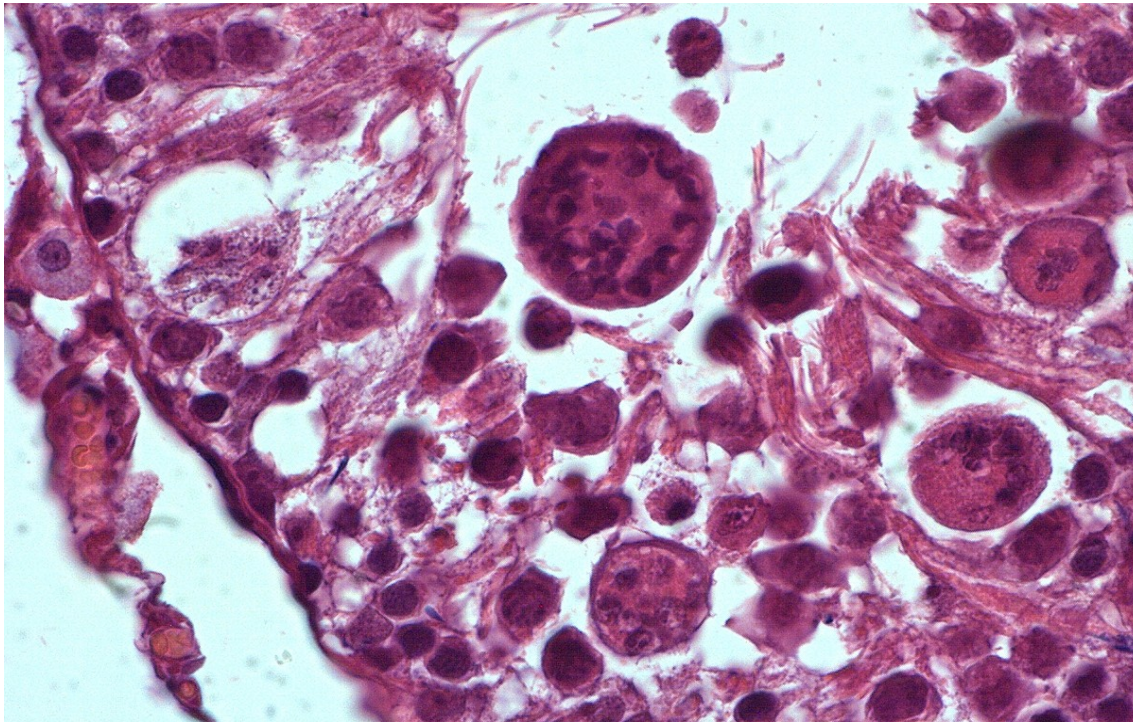
Obr. 15 - Kryptorchismus, varle, 7dnů, HE, zvětšeno 200x.

Buňky s tmavými jádry podléhají degeneraci.



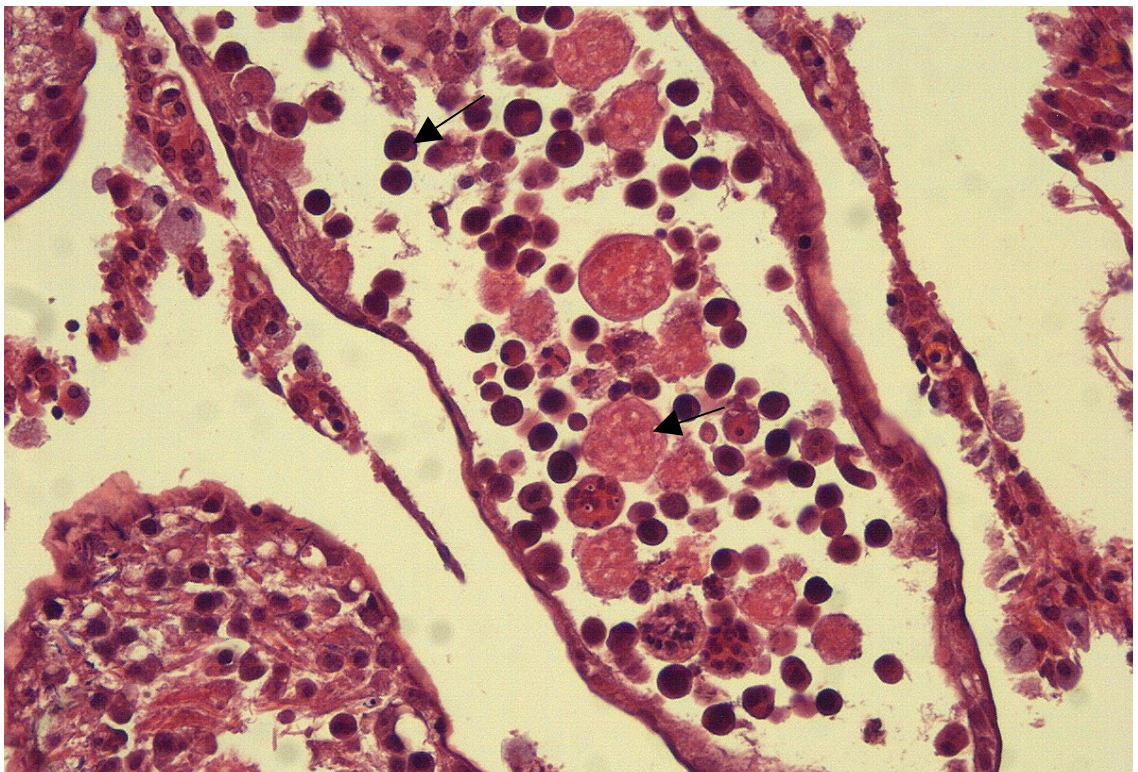
Obr. 16 - Kryptorchismus, varle, 7dnů, HE, zvětšeno 200x.

Zde pozorujeme pokročilejší stádium degenerace tubulu s velkým počtem mnohojaderných buněk.



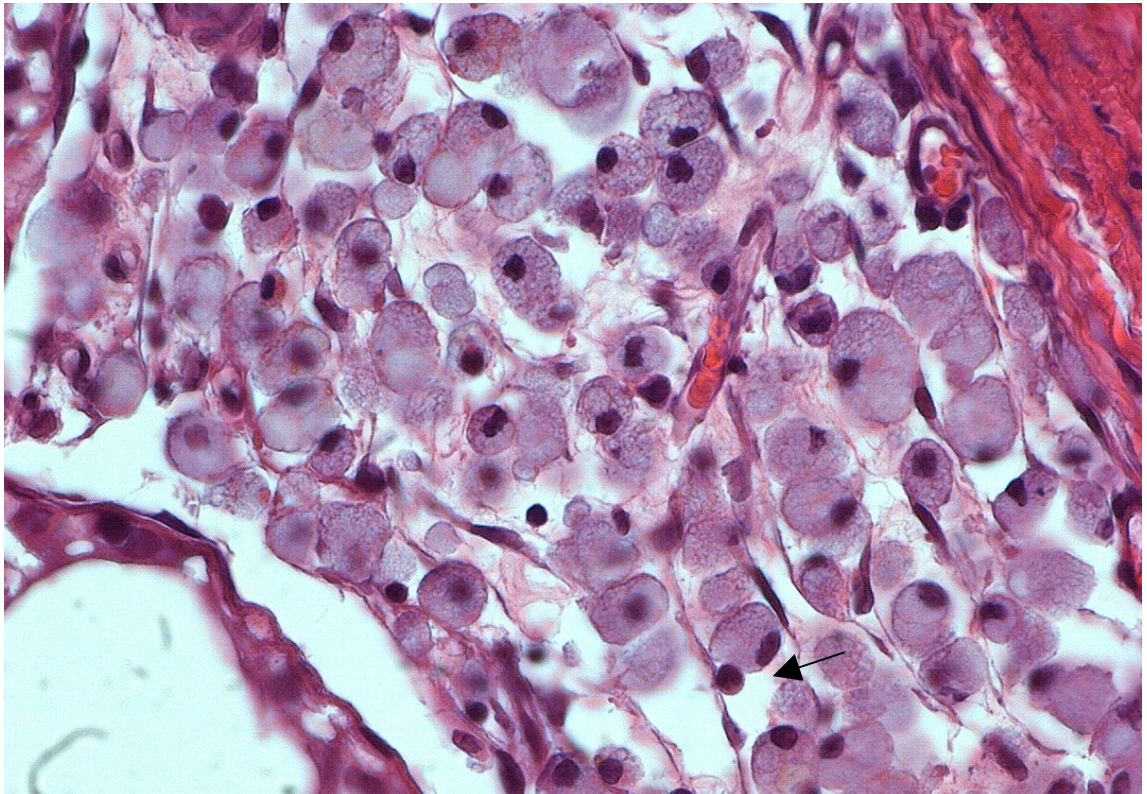
Obr. 17 - Kryptorchismus, varle, 7dnů, HE, zvětšeno 400x.

Jádra mnohojaderných buněk jsou většinou na periferii v počtu 5 – 20. Jejich chromatin je buď rozprostřený, nebo srpkovitý.

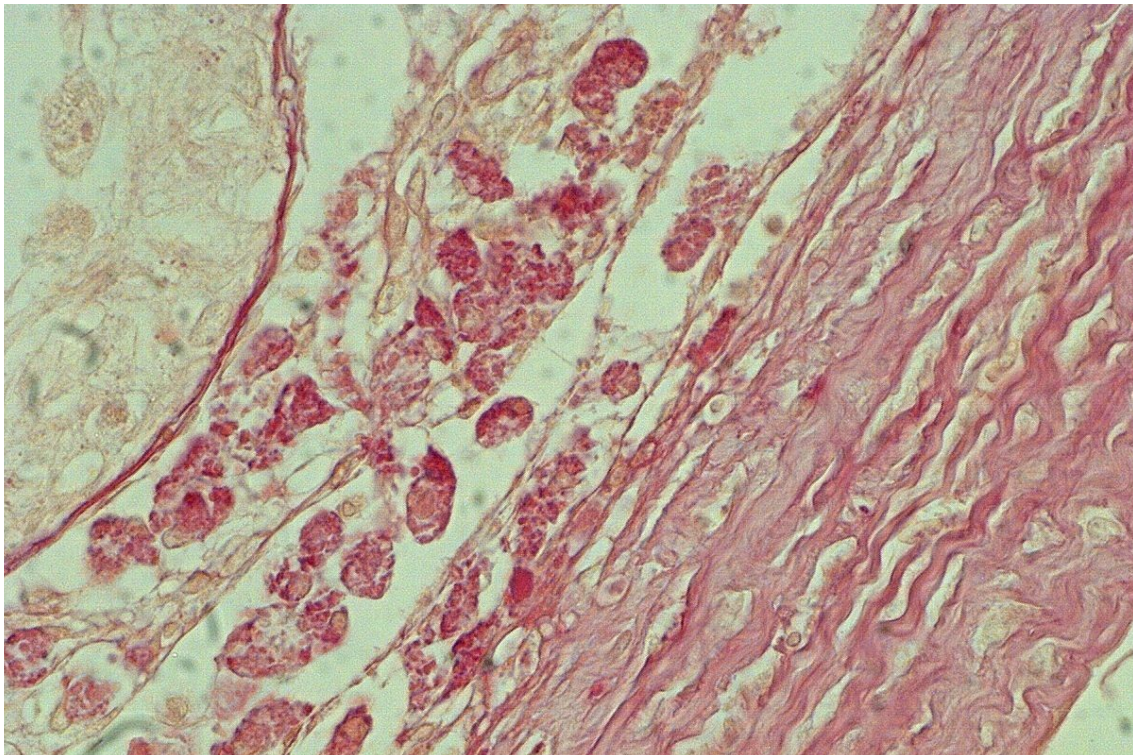


Obr. 18 - Kryptorchismus, varle, 7dnů, HE, zvětšeno 200x.

Pozorovaný kanálek je bez Sertoliho buněk, obsahuje apoptotické buňky (tmavé) a shluky eozinofilního materiálu.

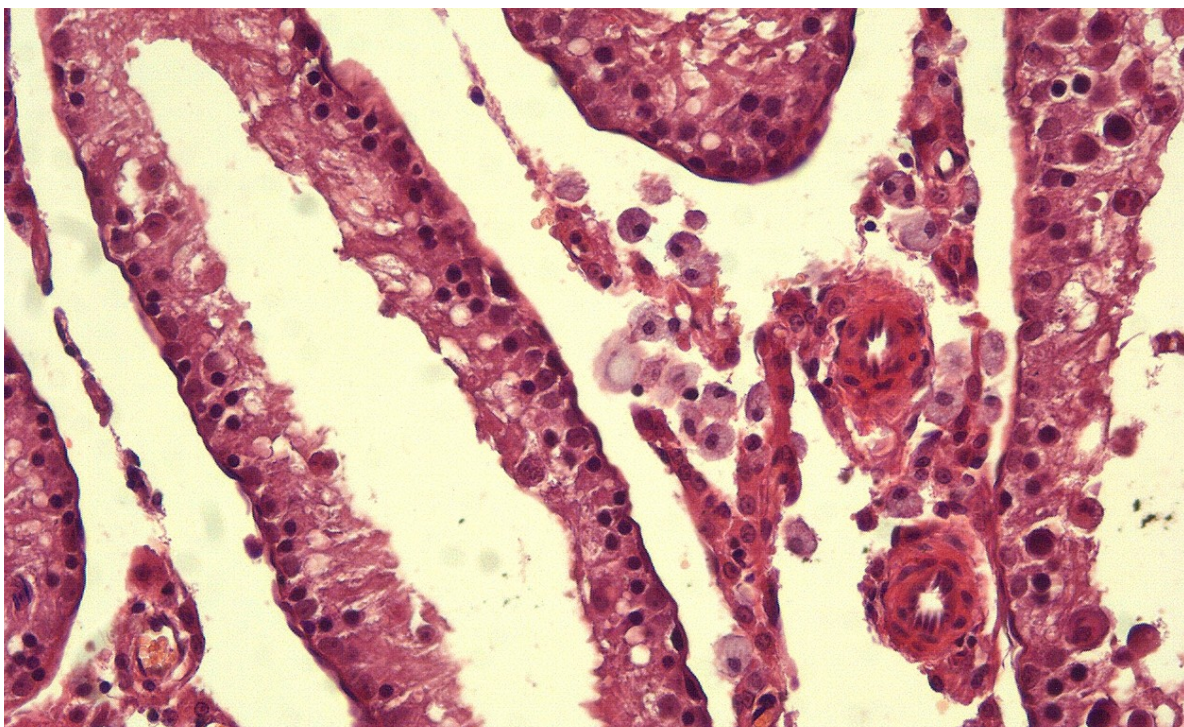


Obr. 19 - Kryptorchismus, varle, 7dnů, HE, zvětšeno 400x.
Zde je vidět ložisko z populace mikrofágů pod tunica albuginea.

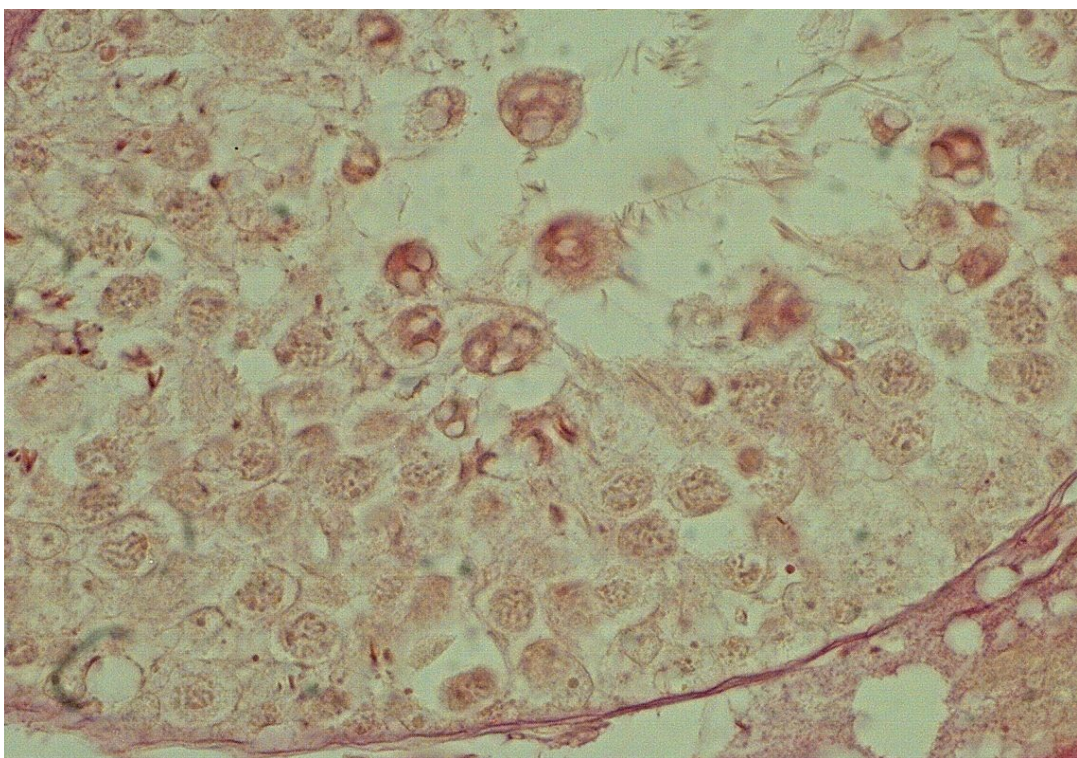


Obr. 20 - Kryptorchismus, varle, 7dnů, PAS, zvětšeno 400x.

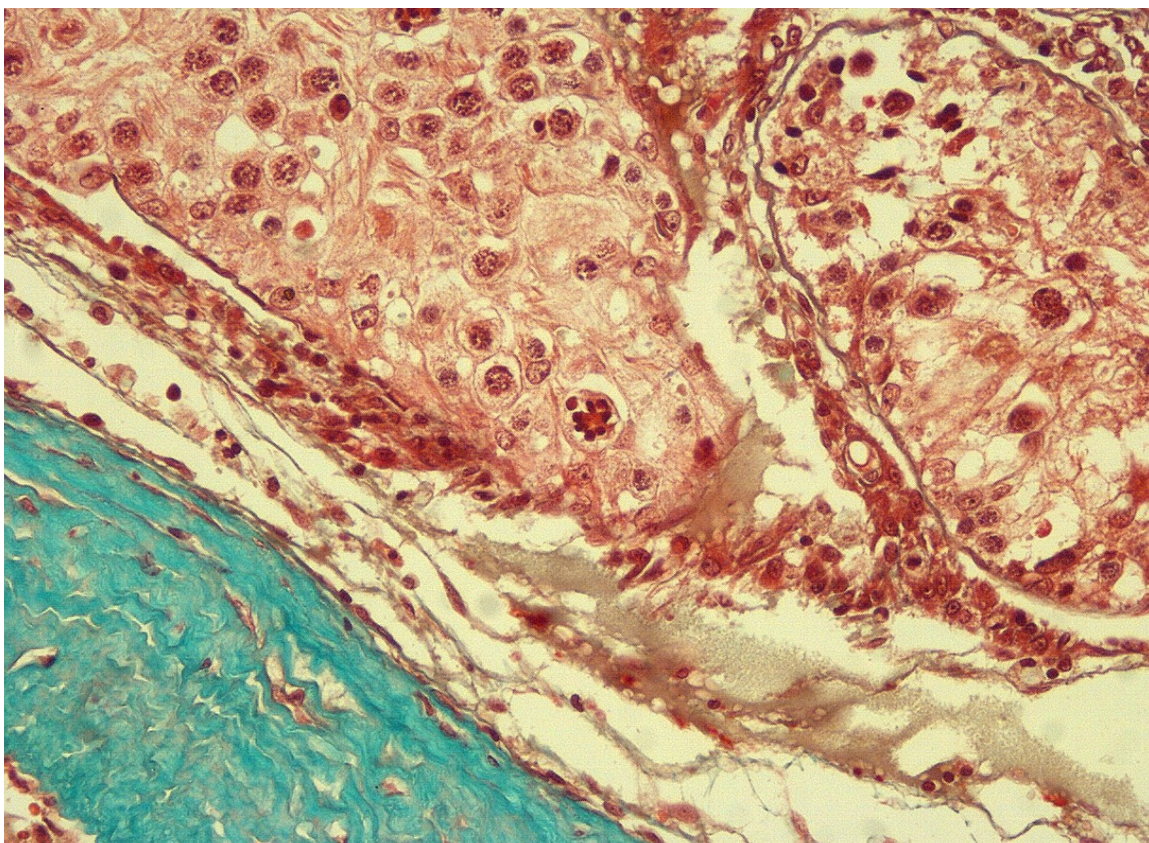
Barvení PAS také prokázalo ložisko makrofágů pod tunica albuginea.



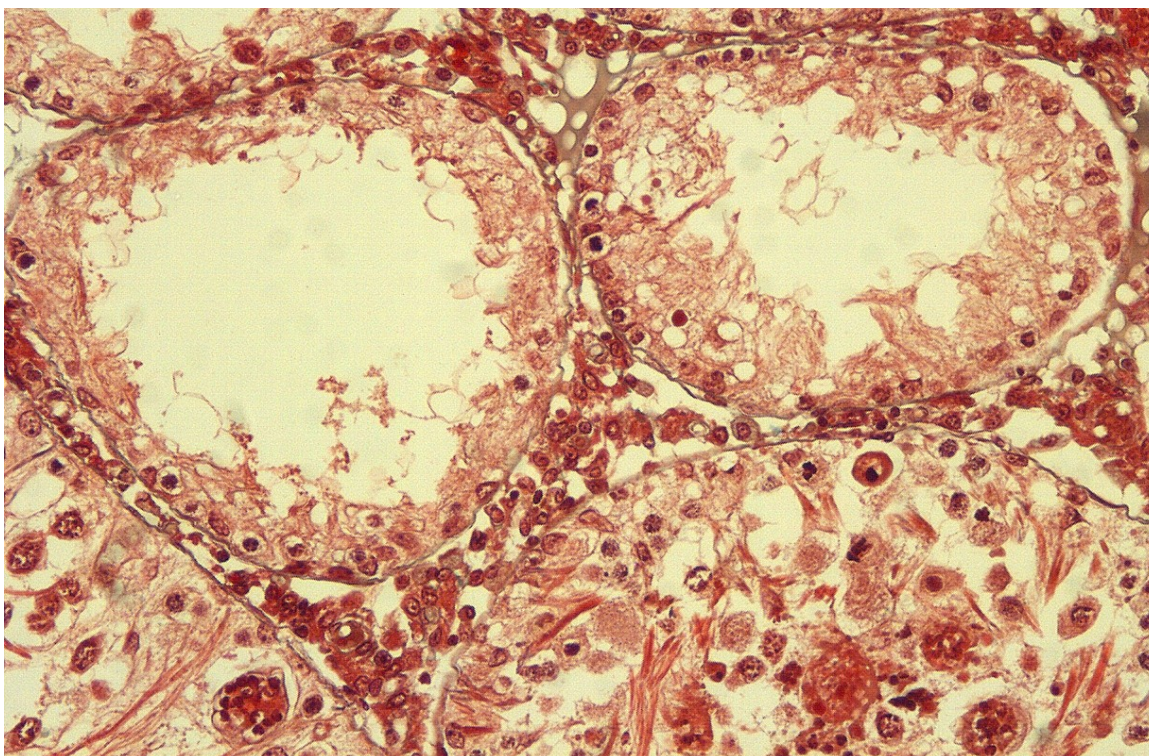
Obr. 21 - Kryptorchismus, varle, 7dnů, HE, zvětšeno 200x.
Makrofágy v intersticiu ve vztahu ke stěně kanálku a cévám.



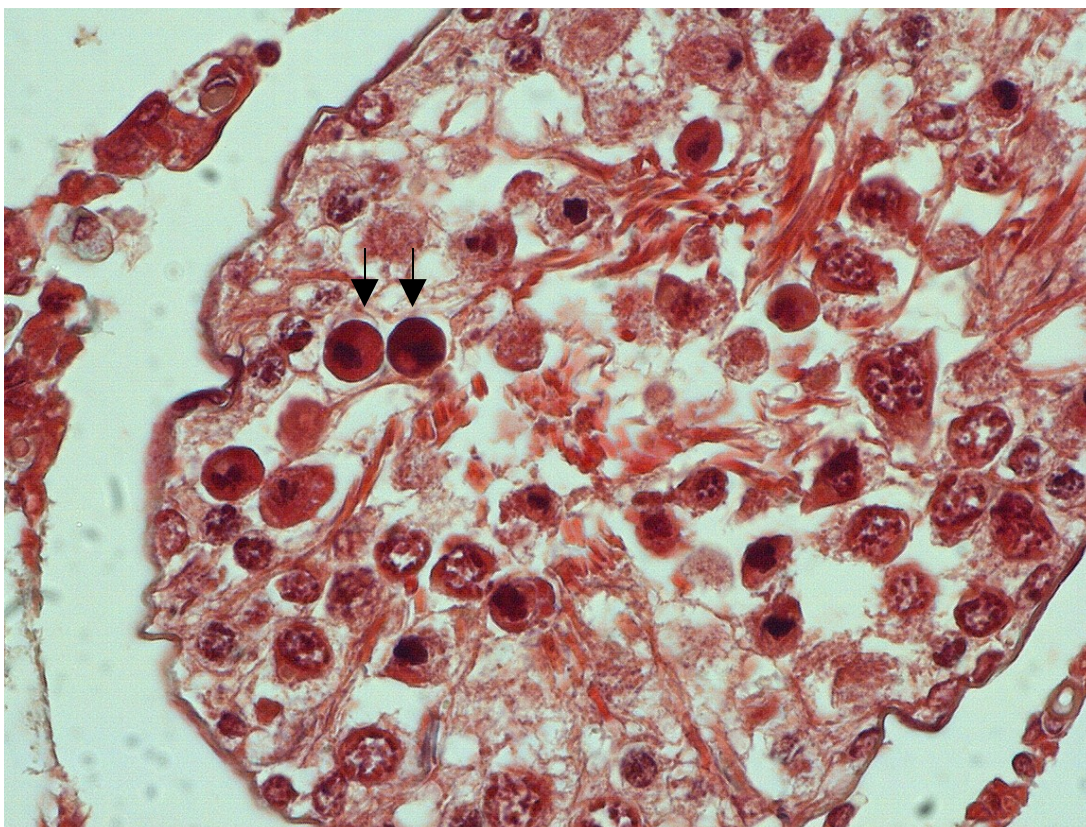
Obr. 22 - Kryptorchismus, varle, 7dnů, PAS, zvětšeno 400x.
Na tomto obrázku jsou zvýrazněny akrosomální komponenty
degenerujících zárodečných buněk.



Obr. 23 - Kryptorchismus, varle, 7dnů, ZT, zvětšeno 200x.
Barvení ZT nám umožnilo lépe pozorovat struktury jádra.



Obr. 24 - Kryptorchismus, varle, 7dnů, ZT, zvětšeno 200x.
Výrazně zbarvená těla Sertoliho buněk v zdegenerovaném kanálku.



Obr. 25 - Kryptorchismus, varle, 7dnů, ZT, zvětšeno 400x.
Populace apoptotických buněk je u barvení ZT lépe znatelná.

8. Literatura

1. Čihák, R.: Anatomie 2, 1. vydání. Avicenum Praha, 1988, s. 268-280.
2. Trojan, S. a kol.: Lékařská fyziologie, 3. vydání. Grada Publishing, 1999, s. 383-402.
3. Junqueira, L., Carneiro, J., Kelley R.: Základy histologie, 7. vydání, H&H nakladatelství, 1997, s. 402-414.
4. Silbernagl, S., Lang, F.: Atlas patofyziologie člověka, 1. vydání. Grada Publishing, 2001, s. 12-15.
5. Malčák, J., Malčáková, J.: Patologie, 1. vydání. Grada Publishing, 2004, s. 52,291-293.
6. Boekelheide, K., Fleming, L. S., Johnson, J. K., Patel, R. S., Schoenfeld, A. H.: Role of Sertoli cells in injury-associated testicular germ cell apoptosis. P.S.E.B.M., Vol. 225, 2000, s. 105-115.
7. Stewart, J., Boyd, S., Brown, S. Toner, G. P.: The blood testis barrier in experimental unilateral cryptorchidism. Journal of pathology, Vol. 160, 1990, s. 51-55.
8. Jones, M. T., Anderson, W., Fang, S. W., Landau, L. R., Rosenfield, L. R.: Experimental cryptorchidism in adult male rats: Histological and hormonal sequelae. Anat. Rec., Vol. 189, 1977, s. 1-28.
9. Yin, I., Stahl, C. B., Dewolf, C. W., Morgentaler, A.: P53 and Fas are sequential mechanisms of testicular germ cell apoptosis. Journal of andrology, Vol. 23, 2002, s. 64-70.
10. Hayashi, T., Yoshida, S., Yoshinaga, A., Ohno, R., Ishii, N., Yamada, T.: HtrA2 is up-regulated in the rat testis after

experimental cryptorchidism. International journal of urology, Vol. 13, 2006, s. 157-164.

11. Krawczyk, Z., Wisniewski, J., Wisniewski, S.: Expression of hsp70-related gene in developing and degenerating rat testis. Molecular biology reports, Vol. 12, 1987, s. 35-41.

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

13. Zakaria, O., Shono, T., Imajima, T., Sutia, S.: Comparative studies of fertility and histologic development of contralateral scrotal testes in two rat model of unilateral cryptorchidism. Pediatr. Surg. Int., Vol. 16, 2000, s. 498-501.

14. Kumagai, J., Fukuda, J., Kodama, H., Murata, M., Kawamura, K., Itoh, H., Tanada, T.: Germ cell-specific heat shock protein 105 binds to p53 in a temperature-sensitive manner in rat testis. Eur. j. biochem., Vol. 267, 2000, s. 3073-3078.

15. Morimoto, I. R.: Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. Genes & Dev. 1998, Vol 12, 2006, s. 3788-3796.

16. Izu, H., Inouye, S., Fujimoto, M., Shiraishi, K., Naito, K., Nakai, A.: Heat shock transcription factor 1 is involved

in Quality-control mechanisms in male germ cells. *Biology of reproduction*, Vol. 70, 2004, s. 18-24.

17. Nakai, A., Suzuki, M., Tanabe, M.: Arrest of spermatogenesis in mice expressing an active heat shock transcription factor 1. *The EMBO journal*, Vol. 19, s. 1545-1554.

18. Fujisawa, M.: Regulation of testicular function by cell-to-cell interaction. *Reproductive medicina and biology*, Vol. 5, 2006, s. 9-17.

19. Siu, Y. K. M., Cheng, Y. C.: Extracellular matrix: recent advances on its role in junction dynamics in the semeniferous epithelium during spermatogenesis. *Biology of reproduction*, Vol. 71, 2004, s. 375-391.

20. Petola, V., Huhtaniemi, I., Ahotupa, M.: Abdominal position of the rat testis is associated with high level of lipid peroxidation. *Biology of reproduction*, Vol. 53, 1995, s. 1146-1150.

21. Lui, Y-W., Mruk, D., Lee, M. W., Cheng, Y. C.: Sertoli cell tight junction dynamics: their regulation during spermatogenesis. *Biology of reproduction*, Vol. 68, 2003, s. 1078-1097.

22. Ertugrul, A., Cam, K., Tarcn, T., Akdas, A., Turkeri, L.: Nuclear accumulation of protein p53 and histological changes in the rat model of unilateral cryptorchidism. *Brazilian journal of urology*, Vol. 28, 2002, s. 57-63.

23. Kaki, T., Sofikitis, N.: Effects of unilateral cryptorchidism in contralateral epididymal sperm quality

and fertilizing capacity. *Yonago acta medica*, Vol. 42, 1999, s. 79-86.

24. Rockett, C. J., Mapp, L. F., Garges, B. J., Luft C. J., Mori, C., Dix, J. D.: Effects of hyperthermia on spermatogenesis, apoptosis, gene expression, and fertility in adult male mice. *Biology of reproduction*, Vol. 65, 2001, s. 229-239.

25. Watts, M. L., Hasthorpe, S., Farmer, J. P., Hutson, M. J.: Apoptotic cell death and fertility in three unilateral cryptorchid models. *Urol. Res.*, Vol. 28, 2000, str. 332-337.

26. Schärli, F. A.: Cryptorchidism and infertility. *Pediatr. Surg. Int.*, Vol. 14, 1998, s. 1.

27. Seethalakshmi, L., Steinberger, A.: Effect of cryptorchidism and orchidopexy on inhibin secretion by rat sertoli cells. *J. androl*, Vol. 4, 1983, str. 131-135.

28. Perey, Clermont, Leblond: Diagram of Cycle of the Seminiferous Epithelium in the Rat Testis, *Amer. j. anat.*, Vol. 108, 1967, obr. 2.

29. Kretser, D. M.: Endocrinology of the male reproductive system. na [endotex.org](http://www.endotext.org), <http://www.endotext.org/male/male1/maleframe1.htm>, 15. 7. 2002.

30. Ono, K., Sofikitis, N.: Novel mechanism to explain the detrimental effects of left cryptorchidism on right testicular function. *Yonago Acta Med.*, Vol. 40, 1997, s. 79-89.

31. Kubota, H., Avarbock, R. M., Brinster, R. L.: Spermatogonial stem cells share some, bu not all,

phenotypic and functional characteristics with other stem cells. P.N.A.S., vol. 100, 2003, s. 6478-6492.

32. Zakaria, O., Shono, T., Imajima, T., Suita, S.: Fertility and histological studies in a unilateral kryptorchid rat model during early and late adulthood. British Journal of Urology, Vol. 82, 1998, s. 404-407.

33. Silvestroni, L., Palleschi, S.: Effects of organochloride xenobiotics on human spermatozoa. Chemosphere, Vol 39., 1999, s.1249-1252.

34. Yazawa, H., Sagasawa, I., Nakada. T.: Apoptosis of testicular germ cells induced by exogenous glucocorticoid in rats. Human reproduction, Vol. 15, 2000, s. 1917-1920.

35. Alessio, A. D., Riccioli, A., Lauretti, P., Padula, F., Muciaccia, B., Cesaris, P., Filippini, A., Nagata, S., Ziparo, E.: Testicular Fas is expressed by sperm cells. P.N.A.S., Vol. 98, 2001, s. 3316-3321.

36. Fragale, A., Pglisi, R., Morena, R. A., Stefanini, M., Boitani, B.: Age-dependent activin receptor expression pinpoints activin A as a physiological regulator of rat Sertoli cell proliferation. Molecular Human Reproduction Vol. 7, 2001, s. 1107-1114.

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

38. Erkkilä, K., Aalto, H., Pentikäinen, V., Dunkel, L.: Lactate inhibits germ cell apoptosis in the human

testis. *Molecular Human Reproduction*, Vol. 8, 2002, s. 109-117.

39. Yin, Y., Hawkins, L. K., Dewolf, C. W., Morgentaler, A.: Heat Stress causes testicular germ cell apoptosis in adult mice. *Journal of Andrology*, Vol. 18, 1997, s. 159-165.

40. Chow, B., M., Li, Y-Q., Wong, C., S.: Radiation induced apoptosis in the adult central nervous system is p53 dependent. *Cell Death & Differentiation*. Vol. 7, 2000, s. 712-720.

41. Zini, A., Abitbol, J., Schulsinger, D., Goldstein, M., Schlegel, N. P.: Restoration of spermatogenesis after scrotal replacement of experimentally cryptorchid rat testis: assessment of germ cell apoptosis and e NOS expression. *Urology*, Vol. 53, 1999, s. 223-227.

42. Tramontano, F., Malanga, M., Farina, B., Jones R., Quesada, P.: Heat stress reduces poly(ADPR)polymerase expression in rat testis. *Molecular Human Reproduction*, Vol.6, 2000, s. 575-581.

43. MATERIAL SAFETY DATA SHEET - MDOC (Microdispersed Oxidised Cellulose), Alltracel Pharma Ltd, 10 Church Place, Sallynoggin, Co. Dublin, Ireland, 1999.

44. Wong, H. C., Mruk, D. D., Lui, Y. W., Cheng, Y. C.: Regulation of blood –testis barrier dynamics: an in vivo study. *Journal of cell science*, Vol. 117, 2004, s.783-798.

45. Falciatori, I., Borsellino, G., Haliassos, N., Boitani, C., Corallini, S., Battistini, L., Bernardi, G., Stefanini, M., Vicini, M.: Identification and enrichment of spermatogonial stem

cells displaying side-population phenotype in immature mouse testis. The FASEB Journal, Vol. 18, (2004), s. 376-378.

46. Kábrt, J., Valach, V.: Stručný lékařský slovník, 5. vydání, Avicenum Praha, 1979, s. 57.

47. Docimo, S., Silver, R., Cromie W.: The Undescended Testicle: Diagnosis and Management. American Family Physician Journal, Vol. 62, 2000, s. 9.

48. Švadlenka, J.: Bim a TRAIL, Dva noví hráči v negativní selekci T-lymfocytů. Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, oddělení fyziologie a biochemie buňky katedry fyziologie živočichů a vývojové biologie, 2003, s. 8 – 11.

49. Zaidi, M., Khan, A. A., Faruqi, N.: Microstructure of spermatid tract system in a fertile unilateral cryptorchid male – case report. J. Anat. Soc. India, vol. 54, 2005, s. 67-69.

50. Lee, P., O'Leary L., Songer N. et al.: Paternity after Bilateral Cryptorchidism. Arch. Pediatr. Adolesc. Med., vol. 151, 1997, s. 260-263

51. Lee P., Bellinger, M., Songer, N. et al. Paternity after cryptorchidism: lack of correlation with age of orchiopexy. Br. J. Urol., vol. 75, 1995, s. 704-707.

52. Pereira, L., M., Pires, R., Oliveira, H., Santos, T., Pedrosa, J.: Effect of Cr(V) on reproductive organ morphology and sperm

- parameters: An experimental study in mice. *Environmental Health: A Global Access Science Source* ,Vol. 4, 2005, s. 9.
53. Virtanen, I., Kallajoki, M., Narvanen, O., Paranko, J., Thornell, L. E., Miettinen, M., Lehto, V. P.: Peritubular myoid cells of human and rat testis are smooth muscle cells that contain desmin-type intermediate filaments. *Anat. Rec.*, Vol. 215, 1986, s. 10-20.
54. Winter, J.P., Vanderstichele, H. M., Verhoeven, G., Timmerman, M. A., Wesseling, J. G., Jong, F. H.: Peritubular myoid cells from immature rat testes secrete activin-A and express activin receptor type II in vitro. *Endocrinology*, Vol 135, 1994, s. 759-767.
55. Pinart, E., Bonet, S., Briz, M., Pastor, L. M., Sancho, S., Garci, N., Badia, E., Bassols, J.: Morphological and histochemical characteristics of the lamina propria in scrotal and abdominal testes from postpubertal boars: correlation with the appearance of the seminiferous epithelium. *J. Anat.*, Vol. 199, 2001, s. 435-448.
56. Kretser, M. D., Kerr, B. J., Paulsen, A. C.: The Peritubular Tissue in the Normal and Pathological Human Testis. An Ultrastructural Study. *Biology of reproduction*, Vol. 12, 1975, s. 317-324.
57. McCord Jr., G. R.: Fine structural observations of the peritubular cell layer in the hamster testis. *Protoplasma*, Vol. 69, 1970, s. 283-289.
58. Palombi, F., Farini, D., Salanova, M., Grossi, S., Stefanini, M.: Development and cytodifferentiation of

peritubular myoid cells in the rat testis. The Anatomical Record, Vol. 233, 1991, s. 32-40.

59. Jelinková, M., Briestenský, J., Santar, I., Ríhová, B.: In vitro and in vivo immunomodulatory effects of microdispersed oxidized cellulose. Int. Immunopharmacol., Vol. 2, 2002, s. 1429-41.