

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd



Bakalářská práce

**Poškození funkce spermií po krátkodobém
působení ftalátu.**

Školitel: Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.

Vedoucí katedry: PharmDr. Petr Jílek, CSc.

Obsah:

1. Úvod a cíl bakalářské práce	3
2. Teoretická část	5
2.1. Morfologie varlat a nadvarlat	6
2.1.1. Varle.....	6
2.1.2. Nadvarle.....	6
2.1.3. Šourek.....	6
2.2. Sertoliho buňky	7
2.3. Hematotestikulární bariéra	7
2.4. Spermatogeneze	9
2.4.1. Spermatocytogeneze.....	9
2.4.2. Meióza.....	9
2.4.3. Spermioogeneze.....	10
2.5. Vliv ftalátů na funkci spermií	11
3. Experimentální část	13
3.1. Experiment	14
3.1.1. Zvířata.....	14
3.1.2. Vlastní experiment.....	14
3.2. Histologické zpracování orgánů	15
3.2.1. Fixace a zalití do parafínu.....	15
3.2.2. Barvení hematoxylin – eozin.....	16
3.2.3. Barvení na kolagen – zelený trichrom.....	17
3.3. Roztoky a chemikálie	19
4. Výsledky	21
4.1. Výsledky makroskopických pozorování.....	22
4.2. Výsledky histologického hodnocení.....	24
5. Diskuze	25
6. Závěr	27
7. Seznam literatury	29
8. Obrázková příloha	31
9. Summary	43

1. Úvod a cíl bakalářské práce

Úkolem této bakalářské práce bylo posouzení vlivu diethyl ftalátu na morfoložický obraz varlete potkana, spermatogenezi a stav zárodečného epitelu. Ftaláty jsou známé jako jedovaté látky. Jsou klasickým příkladem xenobiotik – cizorodých látek, kterým jsou alespoň v malých koncentracích lidé neustále vystavováni.

Setkáváme se s nimi v kosmetickém průmyslu, kde jsou často přísadami do parfémů, laků na vlasy či deodorantů. Často se využívají také jako změkčovadla při výrobě PVC. Do styku se s nimi dostávají také novorozenci, protože ve zdravotnických zařízeních se stále využívají výrobky z měkčeného PVC s obsahem ftalátů (katetry, dýchací trubice, soupravy pro transfúze, infúze, hemodialýzu, aj.). Nejvíce nebezpečné jsou dětské hračky vyrobené z PVC měkčeného ftaláty, protože děti berou hračky do úst a následkem toho se škodlivé ftaláty vstřebávají sliznicí.

Ftaláty ohrožují schopnost reprodukce, která způsobuje vrozené vývojové vady varlat, prostaty a penisu, neplodnost, dále může také způsobit smrt plodu v děloze, zpomalit nitroděložní vývoj, atrofii ledvin či narušení funkce jater.

Experiment byl vyhodnocen pomocí histologických nálezů odebraných tkání potkanů po krátkodobém působení ftalátu.

2. Teoretická část

2.1. Morfologie varlat a nadvarlat

2.1.1. Varle

Varle (testis) je párová mužská pohlavní žláza, která je umístěna mimo břišní dutinu, v šourku (scrotum). Má tvar ovoidu dlouhého 4 - 5 cm a širokého 2 - 3 cm. Hmotnost varlete je 18 - 25 g. Na zadní stěně na ně shora navazuje nadvarle.

Většinu povrchu varlete a část nadvarlete kryje lesklý povlak – epiorchium (lamina visceralis). Kolem varlete je parietální list této původní peritoneální výchlípky – periorchium (lamina parietalis). Oba dva listy v sebe přecházejí v hilu varlete. Kolem většiny povrchu varlete tak vzniká štěrbina – cavum serosum scroti – oddělená část peritoneální dutiny.

Pod lamina visceralis je na vlastním povrchu varlete bílá vazivová tunica albuginea. Vazivové přepážky (septula testis) vstupují do nitra varlete a rozdělují je tak na 200 – 300 lalůček (lobuli testis). Uvnitř lalůček se nacházejí stočené 2 - 3 semenotvorné kanálky (tubuli seminiferi concerti). Jejich celková délka v jednom varleti je 250 – 300 m. Epitel, který vystýlá stěnu kanálků, se nazývá epithelium spermatogenicum. Je to vícevrstevný semenotvorný epitel, který se skládá ze dvou buněčných linií – spermatogenních a podpůrných (Sertoliho) buněk.

2.1.2. Nadvarle

Nadvarle (epididymis) je protáhlý, trubicovitý orgán na zadním obvodu varlete. Skládá se ze tří částí – hlavy nadvarlete (caput epididymis), těla (corpus epididymis) a ocasu (cauda epididymis). Celý orgán je orientován tak, že hlava leží za horním pólem varlete a tělo a ocas sestupují po zadním obvodu varlete. Při dolním pólu přechází nadvarle ostrým ohbím v chánovod (ductus deferens).

Povrch nadvarlete tvoří silná vazivová membrána, která je pevně spojena s vazivem uvnitř nadvarlete. Do caput epididymidis vstupují ductuli efferentes testis (8 - 12 kanálků), které formují lalůčky – lobuli epididymidis. Každý z nich obsahuje stočený kanálek asi 15 cm dlouhý. Ty se postupně spojují a vyústí do jediného kanálku nadvarlete – ductus epididymidis. Na konci cauda epididymidis pokračuje kanálek nadvarlete v ductus deferens spojující nadvarle s močovou trubicí (urethra masculina).

2.1.3. Šourek

Šourek (scrotum) se svoji polohou i původem řadí k mužským zevním pohlavním orgánům. Je to kožní vak hruškovitého až kulovitého tvaru. Septum scroti – vazivová přepážka, rozděluje šourek na dvě dutiny – pro pravé a levé varle.^{1,2,3}

2.2. Sertoliho buňky

Podpůrné Sertoliho buňky pocházejí z embryonálního mezodermu. Jsou to dlouhé štíhlé, vysoce specializované buňky semenotvorného epitelu varlat. Nasedají rozšířenou bazí na bazální laminu semenotvorného kanálku a dosahují až k lumen kanálku.

Sertoliho buňky proliferují až do začátku puberty. Jejich finální počet je korelovaný množstvím zárodečných buněk produkovaných dospělým varletem. Růst Sertoliho buněk je ovlivňován hlavně folikul stimulujícím hormonem (FSH) z hypofýzy.

Tyto buňky mají velká oválná světlá jádra obsahující nenápadné jádérko. Uvnitř buněk se nachází dobře vyvinuté drsné endoplazmatické retikulum, Golgiho komplex a četné mitochondrie. Naopak hladkého endoplazmatického retikula je méně. Do cytoplasmy těchto buněk jsou zanořena jednotlivá stadia zárodečných buněk, které Sertoliho buňky vyživují a chrání (hematotestikulární bariéra). Pomocí zonula occludentes jsou okraje buněk těsně připojeny k sousedním Sertoliho buňkám.

Podpůrné buňky mají řadu funkcí. Patří mezi ně fyzická opora pro spermatogenní buňky, dále řízení výživy vyvíjejících se spermatozoí, ochrana před autoimunitním útokem imunoglobulinů v krvi a fagocytóza reziduálních tělísek. Buňky také secernují tekutinu pro transport semene, inhibin a estrogen. ^{2,4}

2.3. Hematotestikulární bariéra

Při spermatogenezi vznikají na diferencujících se spermatogenních buňkách nové, specifické proteiny a glykoproteiny. Protože tento proces začíná již po vývoji imunitního systému, mohou být povrchové molekuly rozpoznány jako „cizí“ antigeny. Hematotestikulární bariéra chrání vyvíjející se spermie před autoimunitním poškozením. Též pomáhá vytvářet osmotický gradient, který podporuje pohyb tekutiny do tubulárního lumen.

Bariéra mezi krví a testes rozděluje výstelku semenotvorných kanálků na dva funkční oddíly. Prvním z nich je bazální oddíl, který leží mezi bazální laminou a spojovacím pásem. Tento oddíl obsahuje spermatogonie. Látky, které proniknou přes bazální laminu, jsou do tohoto oddílu přenášeny krví. Druhým funkčním oddílem je lumenální, který dosahuje od spojovacího pásu až dovnitř k lumen. Kromě látek, které vycytávají podpůrné buňky a přenášejí je přes svou cytoplazmu do tohoto prostoru, sem látky přenášené krví nepronikají.

Tekutina uvnitř semenotvorných kanálků je odlišná od plasmy. Obsahuje velké množství androgenů, estrogenů, draslíku, inositolu, kyseliny glutamové a asparágové. Naopak je chudá na bílkoviny a glukosu. Udržení jejího složení je závislé právě na hematotestikulární bariéře. ^{2,5}

2.4. Spermatogeneze

Spermatogeneze je složitý proces tvorby a vývoje spermií, na jejímž konci je zralá mužská pohlavní buňka. Celý proces je závislý na hormonu testosteronu a lze jej rozdělit na tři fáze: spermatocytogenezi, meiózu a spermiogenezi.

2.4.1. Spermatocytogeneze

Při spermatocytogenezi dochází řadou mitotických dělení k produkci primárních spermatocytů ze spermatogonií (primitivní zárodečné buňky). Rozlišují se spermatogonie A, které zůstávají nediferencovanými kmenovými buňkami a jsou schopny produkovat další A i B buňky. Dále spermatogonie B, které procházejí dalšími mitózami a jsou schopné dalšího vývoje.

2.4.2. Meióza

Meióza je proces zahrnující dvě po sobě jdoucí buněčná dělení. Výsledkem je vznik čtyř haploidních spermatid z jednoho diploidního primárního spermatocytu.

Meióza I.

Primární spermatocyty se během prvního meiotického dělení rozdělí a vznikají sekundární spermatocyty. Krátce před zahájením mitózy dochází ke zdvojení DNA – stává se tetraploidní (4n DNA), spermatocyt tak obsahuje 46 chromozomů (22 párů autozomů + XY). První meiotické dělení se skládá ze 4 fází – profáze, metafáze, anafáze a telofáze.

Během profáze se 23 párů homologních chromozomů párují bod po bodu a vytvářejí můstky, které spárovaným chromozomům dovolí výměnu DNA („crossing over“). Dále dochází k zániku jaderné membrány. V průběhu metafáze se páry chromozomů seřadí v ekvatoriální rovině. Následuje fáze anafáze, kdy dvouchromatidové chromozomy se rozcházejí k opačným pólům buňky, kam jsou přitahovány pomocí dělicího vřetenka. V poslední fázi – telofázi – se u protilehlých pólů buňky seskupují haploidní (1n) sady chromozomů, tzn. že vzniklý sekundární spermatocyt obsahuje jeden chromozom z každého homologního páru chromozomů. Výsledkem prvního meiotického dělení jsou sekundární spermatocyty obsahující 23 jaderných chromozomů zdvojených ve dvě chromatidy (2n DNA).

Meióza II.

V průběhu druhého meiotického dělení se rozdělí sekundární spermatocyty a vzniknou spermatidy. Při tomto dělení je obsah DNA rozdělen na polovinu, počet chromozomů zůstává

stejný – haploidní ($1n$). Výsledkem je spermatida s haploidním počtem chromozomů i haploidním množstvím DNA.

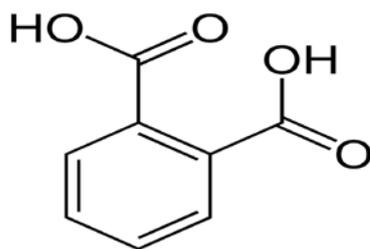
2.4.3. Spermioogeneze

Poslední fáze spermatogeneze se nazývá spermioogeneze. Je to komplexní proces tvorby spermie ze spermatidy, který probíhá v nadvarleti. Při tomto procesu dochází k mnoha strukturálním změnám – tvorba akrozomu, přesun centriol a vytvoření bičíku, dále přesun cytoplazmy a mitochondrií, kondenzace jaderného chromatinu a oddělení reziduálních tělísek. Výsledkem je zralá spermie skládající se z hlavičky, krčku a bičíku. Na hlavičce se utváří akrozomální váček obsahující enzymy důležité pro oplodnění vajíčka. Aby spermioogeneze probíhala správně, je nutná dostatečná tvorba testosteronu.^{2,5,6}

2.5. Vliv ftalátů na funkci spermií

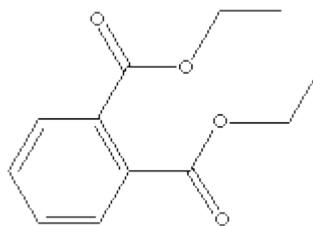
Je mnoho způsobů, jak mohou xenobiotika poškodit plodnost mužů. Například chemikálie mohou projevit přímý účinek na zárodečný epitel, nebo mohou účinkovat tím, že ovlivní hormonální regulaci mezi hypotalamem, hypofýzou a pohlavními žlázami.¹⁰

Ftaláty jsou chemicky estery kyseliny ftalové.⁷ Jedná se o aromatickou dikarboxylovou kyselinu. Její sumární vzorec je $C_8H_6O_4$ a strukturní vzorec vypadá takto:¹¹



Kyselina ftalová je bílá krystalická látka.

Diethylftalát, tedy ester kyseliny ftalové, má sumární vzorec $C_{12}H_{14}O_4$ a má tuto strukturu:¹²



Podle studií, které byly prováděny na zvířatech, jsou ftaláty známé jako jedovaté látky ohrožující schopnost reprodukce, která způsobuje vrozené vady a neplodnost.

Ftaláty jsou klasickým případem sloučenin, kterým jsou alespoň v malých koncentracích lidé neustále vystavováni. Mnoho vědců se dnes zaměřuje na zkoumání poškození plodnosti tzv. „sloučeninami znečišťující prostředí“, ale je třeba připomenout, že mnoho tříd léků má přinejmenším schopnost způsobit přechodné poškození plodnosti.

Vystavení ftalátů u člověka může nastat cestou znečištěné potravy, léčiv, krevních konzerv, dialyzační trubice nebo na pracovišti.

S ftaláty se můžeme setkat také v nemocnicích, protože jsou uvolňovány některými zdravotnickými pomůckami vyrobené z PVC (katetry, dýchací trubice, soupravy pro transfúze, infúze, hemodialýzu, aj.). A to i přesto, že jsou na trhu dostupné alternativní materiály, které PVC neobsahují.^{10,13}

Doktor S. D. Gangoli se zabýval studiem účinků ftalátů na testikulární tkáň. Účinky na testikulární tkáň vyvolané di(2-ethylhexyl) ftalátem (DEHP) u krysy byly charakterizované úbytkem váhy orgánů a histologickými změnami v kanálcích varlete. Tyto účinky lze též vyvolat ve střevní sliznici a dalších tkáních. Poškození varlete vyvolané ftaláty bylo provázeno poklesem obsahu zinku v gonádách a zvýšeným vylučováním tohoto prvku močí. Vystavení účinku ftalátů preparátu zárodečných kanálků krysy mělo za následek odlučování zárodečných buněk od Sertoliho buněk v závislosti na podané dávce.¹⁴

3. Experimentální část

3.1. Experiment

3.1.1. Zvířata

Pro experiment byli použiti dospělí samci potkana kmene Wistar o průměrné hmotnosti 400 g. Zvířata byla chována za standardních podmínek ve viváriu Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové s volným přístupem k vodě a krmena standardní potravou.

Studie byla prováděna v souladu se zákonem č. 246/1992 Sb. O ochraně zvířat proti týrání a pod odborným dohledem Etické komise Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

3.1.2. Vlastní experiment

V experimentu bylo použito celkem 6 potkanů. Každý potkan byl označen kyselinou pikrovou na různých částech těla pro pozdější identifikaci: 1. zvíře – HL+LZ, 2. - PP, 3. – HL, 4. LP, 5. – LZ, 6. – PZ. Podle hmotnosti, která jim byla naměřena první den experimentu, byli rozděleni na dvě skupiny. Oběma skupinám byl následujících 10 dní dávkován gastrointestinální sondou Diethyl Phthalate Pestanal od firmy Riedel – de Haer. Během celého experimentu jsme sledovali váhu potkanů a potravní chování. Po 10-ti dnech byla potkanům provedena euthanázie předávkováním celkovým inhalačním anestetikem. Použili jsme Aether pro narcosi (Synthesia, Pardubice - Semtín) v uzavřeném prostoru exsíkátoru. Po usmrcení jsme provedli otevření dutiny břišní a odebrali tyto orgány: prostatu, varlata, ledviny, plíce, střevo, slezinu a játra. Orgány jsme histologicky zpracovali a pozorovali pod mikroskopem.

3.2. Histologické zpracování orgánů

Ihned po odebrání jsme tkáň vložili do Bouinovy fixační tekutiny na 48 hodin. Účelem této fixace je zabránit samovolnému rozkladu tkáň působením enzymů. Poté jsme tkáň odvodnili acetonem, projasnili xylenem (z důvodu odstranění ethanolu) a po prosycení parafinem zalévali do bločků.

Parafínové bločky jsme po ztuhnutí krájeli na sáňkovém mikrotomu Leitz – Wetzlar na řezy tenké 5 µm. Nakrájené řezy jsme za pomoci preparačních jehel přenesli na podložní sklíčko a přilepili pomocí glycerinu s bílkem.

Před vlastním barvením jsme řezy odparafinovali řadou xylen, sestupná alkoholová řada, voda. Poté jsme na řezech provedli barvení hematoxylin – eosin, a dále zelený trichrom. Po vlastním barvení jsme řezy odvodnili pomocí vzestupné alkoholové řady a projasnili xylenem. Barvené řezy jsme zamontovali do kanadského balzámu a hodnotili pod mikroskopem.

3.2.1. Fixace a zalití do parafínu

Fixace v Bouinově roztoku

Bouinův roztok	3 dny
ethanol 80%	1 hodina
3x aceton	během 24 hodin
xylen	2 x 15 minut
parafín (56°C)	2 hodiny
parafín (56°C)	2 hodiny

Zalití do parafínu a vytvoření bločků.

3.2.2. Barvení hematoxylin - eozin

odparafinování:

xylén	3 x 5 minut
96% ethanol	5 minut
70% ethanol	5 minut
destilovaná voda	5 minut
Otření sklíček buničinou.	

barvení:

hematoxylin	6 – 8 minut
pramenitá voda	10 minut

Otření sklíček buničinou a kontrola zmodrání jader v mikroskopu.

eosin	2 minuty
destilovaná voda	opláchnutí

odvodnění:

96% ethanol	2x opláchnutí
ethanol : xylén (2 : 1)	3 minuty
xylén : ethanol (1 : 2)	3 minuty

projasnění:

xylén	3 x 3 minuty
Otření sklíček buničinou.	

zamontování do kanadského balzámu

výsledek barvení:

Jádra buněk a chrupavka se barví modře, kolagenní vazivo růžově a svalstvo červeně.

3.2.3. Barvení na kolagen – zelený trichrom

odparafinování:

xylén	3 x 5 minut
96% ethanol	5 minut
70% ethanol	5 minut
destilovaná voda	5 minut
Otření sklíček buničinou.	

barvení zelený trichrom:

destilovaná voda	opláchnutí
hematoxylin	3 -5 minut
70% alkohol	opláchnutí
Diferencovat v kyselém alkoholu.	
pramenitá voda	opláchnutí
Kontrola v mikroskopu.	
Goldner I.	10 minut
destilovaná voda	opláchnutí
Goldner II.	10 minut
destilovaná voda	opláchnutí
Goldner III	10 minut
destilovaná voda	opláchnutí

odvodnění:

96% ethanol	2x opláchnutí
ethanol : xylén (2 : 1)	3 minuty
xylén : ethanol (1 : 2)	3 minuty

projasnění:

xylén	3 x 3 minuty
Otření sklíček buničinou.	

zamontování do kanadského balzámu

výsledek barvení:

Jádra buněk jsou obarvena modře, svalovina cihlově červeně, kolagenní vazivo zeleně, erythrocyty oranžově a hyalinní vazivo červeně.

3.3. Roztoky a chemikálie

Diethyl Phthalate pestanal 1g

naředěný do 40 ml aqua pro injectione

Bouinův roztok:

nasyčený roztok kys. pikrové 300 ml

neutrální formol 100 ml

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

Parafín:

Tuhý parafín zkvalitněný 3 – 5 % bílého včelího vosku.

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

kys. octová 40,0 ml

Roztok eosinu:

1 % roztok eosinu v destilované vodě.

Goldner I:

a)

ponceu de xyloidin 1 g

koncentrovaná kys octová 1 ml

destilovaná voda 100 ml

b)

oranž G 1 g

koncentrovaná kyselina octová 1 ml

destilovaná voda 100 ml

c)

Fuschin S	1 ml
koncentrovaná kys. octová	1 ml
destilovaná voda	100 ml

Goldner I. se připraví smícháním 20 ml roztoku a, 10 ml roztoku b a 10 ml roztoku c.

Goldner II:

1 % vodního roztoku kys. fosfowolframové.

Goldner III:

světlá zeleň	1,5 g
ledová kys. octová	1 ml
destilovaná voda	100 ml

4. Výsledky

4.1. Výsledky makroskopických pozorování

Na začátku experimentu jsme všechny potkany označili kyselinou pikrovou a následně zvážili. Podle jejich hmotnosti jsme je rozdělili na dvě skupiny – skupina A s naváženými vyššími hmotnostmi, skupina B s nižšími.

SKUPINA A		SKUPINA B	
LP	440 g	HL	400 g
LZ	440 g	PP	400 g
PZ	420 g	HL+LZ	380 g

Tab.1: Tabulka hmotností potkanů skupiny A i B.

Následujících 10 dní (kromě víkendu 21. a 22.6.2008) byl potkanům podáván gastrointestinální sondou Diethyl Phthalate pestanal a to v množství 0,5 ml skupině A, 0,1 ml skupině B. Během celého experimentu jsme u potkanů sledovali jejich váhu a potravní chování. Výsledky jsou v následující tabulce.

Hmotnost potkanů v gramech						
	SKUPINA A			SKUPINA B		
datum	LP	LZ	PZ	HL	PP	HL+LZ
16.6.2008	440	440	420	400	400	380
17.6.2008	440	440	420	400	400	390
18.6.2008	460	440	420	400	400	390
19.6.2008	469	460	445	422	490	400
20.6.2008	465	445	430	428	430	410
23.6.2008	475	450	440	440	420	410
24.6.2008	478	449	449	445	425	410
25.6.2008	483	455	450	445	425	415
26.6.2008	489	460	442	445	430	410
27.6.2008	490	461	455	445	430	410

Tab.2: Tabulka navážených hmotností potkanů obou skupin během celého experimentu.

Z tabulky č.2 je patrné, že všichni potkani během experimentu přibrali na váze, a to v průměru asi 35 g u obou skupin.

Během podávání diethyl ftalátu jsme také vysledovali řidší exkrementy u obou skupin potkanů.

Po skončení 10-ti denního dávkování diethyl ftalátu byli potkani usmrceni (30.6.2008). Odebrali jsme jim vybrané orgány, z nichž největší pozornost byla věnována varlatům. Jejich rozměry jsou pro obě skupiny potkanů uvedeny v následujících tabulkách:

Potkani skupiny A – parametry odebraných varlat		
	Hmotnost potkana	Odebraný orgán a jeho parametry
LP	500 g	Varle: 2,4 cm + 2,2 g
LZ	460 g	Varle: 2,1 cm + 1,8 g
PZ	465 g	Pravé varle: 2,2 cm + 1,7 g Levé varle: 2,1 cm + 1,7 g

Tab.3: Parametry odebraných varlat u skupiny A.

Potkani skupiny B – parametry odebraných varlat		
	Hmotnost potkana	Odebraný orgán a jeho parametry
HL	465 g	Varle: 2,1 cm + 1,8 g
PP	430 g	Varle: 2,2 cm + 1,9 g
HL+LZ	420 g	Varle: 2,2 cm + 1,7 g

Tab.4: Parametry odebraných varlat u skupiny B.

Odebrané orgány při rozměru i hmotnosti odpovídaly fyziologickým rozměrům. Při odběru byly především sledovány dlouhá osa varlete a mokrá hmotnost, které byly ve fyziologickém rozmezí.

Na vybraných orgánech jsme také pozorovali patologické změny:

LZ – překrvené orgány

PZ – fibrilace, překrvení, chyběla část plic

HL – světlejší játra

PP – překrvené orgány

4.2. Výsledky histologického hodnocení

4.2.1. Potkani skupiny A

Této skupině byl dávkován Diethyl Phthalate pestanal o koncentraci 0,5 ml.

- Zjistili jsme, že při výše uvedeném způsobu podání nebyla ovlivněna produkce zárodečných buněk.
- Oproti fyziologickému stavu ale bylo přítomno výrazné překrvení kapilární části glomerulu.
- V jaterní tkáni jsme našli místní změny zejména v cévní části lalůčků. Na preparátu bylo vidět zřetelné rozšíření jaterních sinusů sbíhajících se do centrální části. Jaterní buňky lemující tyto sinusy jevíly známky degenerace.
- Na preparátu duodena jsme pozorovali v části intersticia mírnou početnější infiltraci lymfocyty.
- V červené pulpě ve slezině jsme pozorovali výrazné překrvení a přítomnost nepočetných mnohojaderných elementů.

4.2.2. Potkani skupiny B

Této skupině byl dávkován Diethyl Phthalate pestanal o koncentraci 0,1 ml.

- Preparáty varlat a prostaty byly fyziologické, bez patrných morfologických změn.
- Ledviny také bez patrných změn.
- U jater jsme pozorovali podobný obraz poškození jaterního parenchymu jako při vyšší koncentraci.
- Obraz duodena byl naprosto fyziologický.
- Přehled všech komponent sleziny byl bez patrných změn.

5. Diskuze

Sledování účinků ftalátů na lidský organismus je v dnešní době velmi diskutované téma. Je intenzivně sledováno proto, že tyto chemické látky mohou být nebezpečné pro lidské zdraví.

Mnoho vědců se dnes zaměřuje na výzkum poškození plodnosti ftaláty, tzv. „sloučenin znečišťující prostředí“. Člověk může tyto látky dostat do těla prostřednictvím dýchání znečištěného ovzduší, kožní resorbci, z potravin, z krevních konzerv či dialyzačních trubic. Mladé, vyvíjející se organismy jsou vůči expozici ftalátům citlivější než organismy dospělé. Mimořádně citlivé jsou z tohoto hlediska zejména mužské pohlavní orgány ve fázi vývoje, i když důležité jsou např. též účinky ftalátů na játra, ledviny, plíce či na srážlivost krve.

Výsledky testů prováděných na zvířatech ukázaly, že některé z ftalátů působí nepříznivě na vývoj mužských reprodukčních orgánů a jsou toxické pro testikulární buňky, které zajišťují normální produkci hormonů a spermií. Vysoké koncentrace toxických ftalátů jsou v České republice v posledních letech opakovaně zjišťovány v mateřském mléce.¹⁵ Z těchto důvodů se doporučuje materiály vyrobené z PVC nahrazovat bezpečnějšími materiály.

Naše pilotní studie měla za úkol ověřit krátkodobý možný vliv ftalátů na poškození funkce spermií. Při tomto pokusu jsme ale také věnovali pozornost dalším orgánům, jako ledvinám, játrům, střevu a slezině. V našich fakulturních podmínkách jsme zjistili, že nebyla ovlivněna produkce zárodečných buněk. Avšak oproti fyziologickému stavu bylo nalezeno mírné překrvení glomerulárních kapilár v kůře nadledvin, výrazné překrvení v červené pulpě a přítomnost mnohojaderných elementů.

6. Závěr

Pokusným modelem pro sledování vlivu známého xenobiotika – diethyl ftalátu na zárodečnou tkáň, byli dospělí samci potkana kmene Wistar o hmotnostech 420 – 500 g. Potkani byli podle jejich hmotností rozděleni do dvou skupin a oběma byl po dobu 10 dní dávkován gastrointestinální sondou Diethyl Phthalate pestanal a to v množství 0,5 ml skupině A, 0,1 ml skupině B. Po skončení experimentu byla zvířata usmrcena euthanází.

Odebrané orgány svými rozměry i hmotností odpovídaly fyziologickým rozměrům. Při odběru byly především sledovány dlouhá osa varlete a mokrá hmotnost, které byly ve fyziologickém rozmezím. Orgány jsme histologicky zpracovali a vyšetřili světelně mikroskopickou metodou.

Výsledkem bylo zjištění, že v příslušných koncentracích při výše uvedeném způsobu podání, nebyla ovlivněna produkce zárodečných buněk. Oproti fyziologickému stavu bylo nalezeno mírné překrvení glomerulárních kapilár v kůře nadledvin u potkana ze skupiny A, dávkovaného koncentrací 0,5 ml Diethyl Phthalate pestanal.

Současně i u této koncentrace byla zaznamenána výraznější aktivace červené pulpy ve slezině, která se projevila vznikem mnohояaderných elementů.

Ve tkáni jater byly zaznamenány ložiskové změny jak na úrovni hepatocytů (pravděpodobně nekrózy), tak i změny v cévním řečišti, a to u obou dávek.

Součástí experimentu bylo i sledování hmotnosti a potravního chování potkanů. Obě skupiny zvířat přibraly během sondování v průměru 35 g. Avšak jejich váha neustále kolísala, pravděpodobně z důvodů jejich traumatizace při gastrickém sondování.

7. Seznam literatury

1. Dylevský I., Druga R., Mrázková O.: Funkční anatomie člověka, 1. vydání, Praha, Grada Publishing, 2000, s. 383 – 95
2. Paulsen D.F.: Histologie a buněčná biologie, 1.vydání, Praha, H&H, 2004, s. 328 – 332
3. Maršala J.: Tkanivá a orgány člověka, Bratislava, Avicenum, 1983, s. 435 – 48
4. Petersen C.: Paracrine regulation of Sertoli cell proliferation, Dissertation, Stockholm, 2003
5. Ganong W.F.: Přehled lékařské fyziologie, 1. vydání, Jinočany, H&H, 1995, s. 358 – 60
6. http://www.oba.zcu.cz/soubory/literatura/BACL/BACL_Ontogenezezeze_Blazek_2004.pdf; (srpen 2008)
7. http://www.kst.cz/web/?page_id=2501; (srpen 2008)
8. Dylevský I., Druga R., Mrázková O.: Funkční anatomie člověka, 1. vydání, Praha, Grada Publishing, 2000, s. 362 – 67
9. Paulsen D.F.: Histologie a buněčná biologie, 1.vydání, Praha, H&H, 2004, s. 287 - 93
10. Riecke K., Stahlmann R.: Test systems to identify reproductive toxicants, Andrologia 32, Germany, 2000, s. 209 – 18
11. http://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina_ftalov%C3%A1; (srpen 2008)
12. <http://chemicaland21.com/industrialchem/plasticizer/DIETHYL%20PHTHALATE.htm>; (srpen 2008)
13. Růžičková K., Cobbing M., Rossi M., Belazzi T.: Ohrožení pacientů ftaláty lze zabránit náhradou PVC výrobků v nemocnicích, Health Care Without Harm, Praha, 2004, s. 4 – 6
14. Gangolli S.D: Testicular effects of phthalate esters, Environ Health Perspect, 1982 November, s. 77–84
15. <http://bezjedu.arnika.org/clanek.shtml?x=134740> (září 2008)

8. Obrázková příloha

Seznam obrázků

SKUPINA A

- potkani, kteří dostávali gastrointestinální sondou 0,5 ml Diethyl Phthalate pestanal.

Obrázek 1 – varle, HE, zvětšeno 100x

Obrázek 2 – varle, HE, zvětšeno 400x

Obrázek 3 – varle, HE, zvětšeno 200x

Obrázek 4 – nadvarle, HE, zvětšeno 100x

Obrázek 5 – nadvarle, HE, zvětšeno 400x

Obrázek 6 – prostata, HE, zvětšeno 200x

Obrázek 7 – ledvina, HE, zvětšeno 200x

Obrázek 8 - ledvina, HE, zvětšeno 400x

Obrázek 9 – játra, HE, zvětšeno 100x

Obrázek 10 – játra, HE, zvětšeno 200x

Obrázek 11 – duodenum, HE, zvětšeno 100x

Obrázek 12 – duodenum, HE, zvětšeno 400x

Obrázek 13 – slezina, HE, zvětšeno 200x

Obrázek 14 – slezina, HE, zvětšeno 400x

SKUPINA B

- potkani, kteří dostávali gastrointestinální sondou 0,1 ml Diethyl Phthalate pestanal.

Obrázek 15 – varle, HE, zvětšeno 200x

Obrázek 16 – prostata, HE, zvětšeno 400x

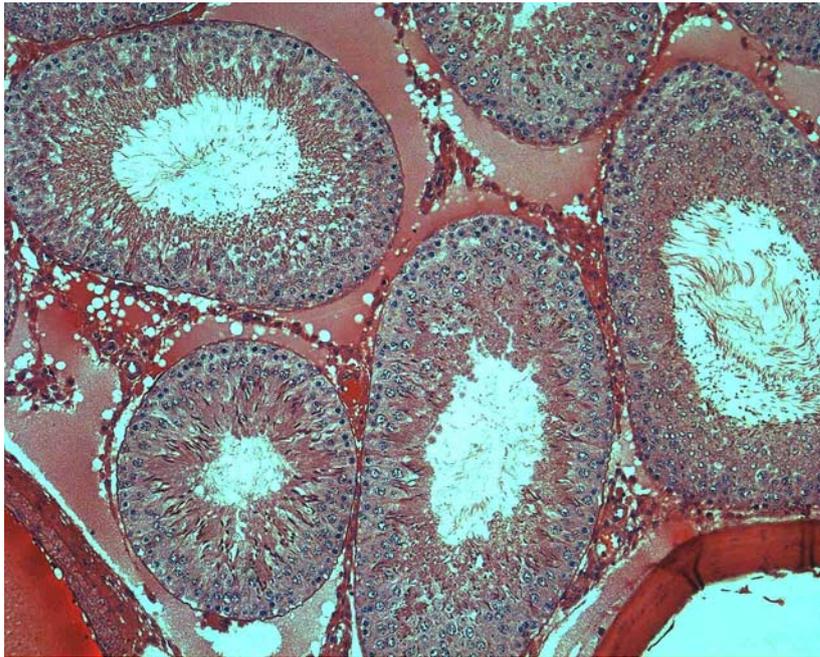
Obrázek 17 – ledvina, HE, zvětšeno 200x

Obrázek 18 – játra, HE, zvětšeno 200x

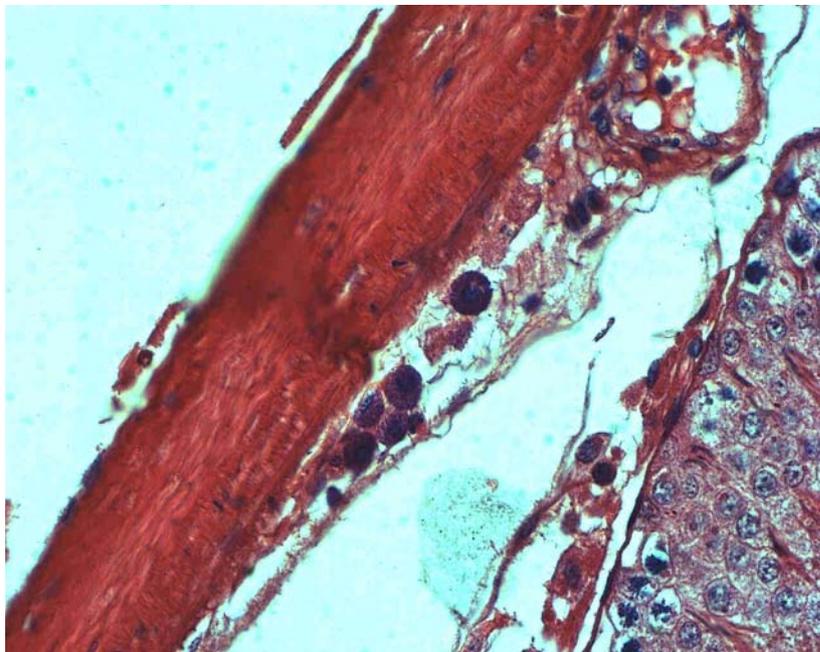
Obrázek 19 – duodenum, HE, zvětšeno 100x

Obrázek 20 – slezina, HE, zvětšeno 100x

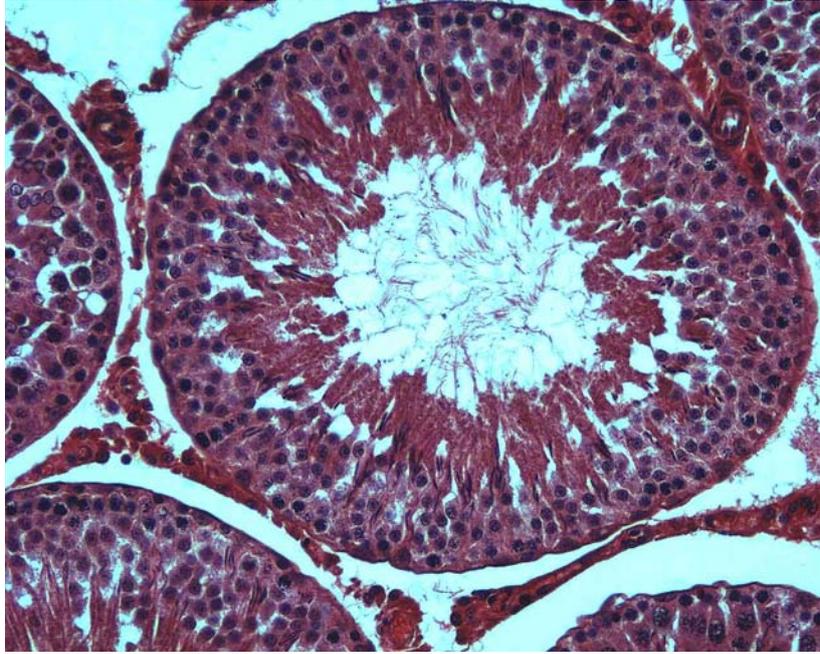
VÝSLEDKY SKUPINY A



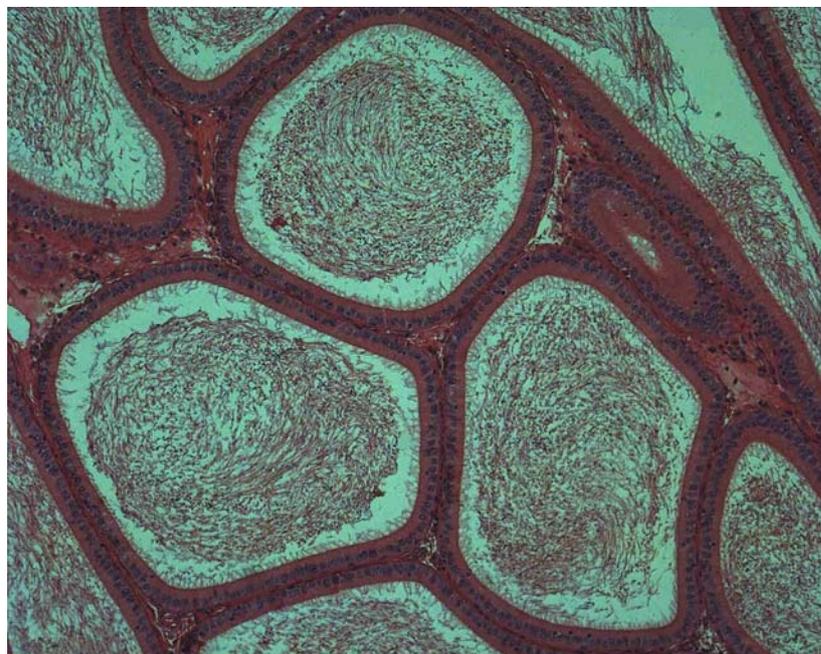
Obrázek 1: Přehledný řez stočenými semenotvornými kanálky varlete, HE, zvětšeno 100x



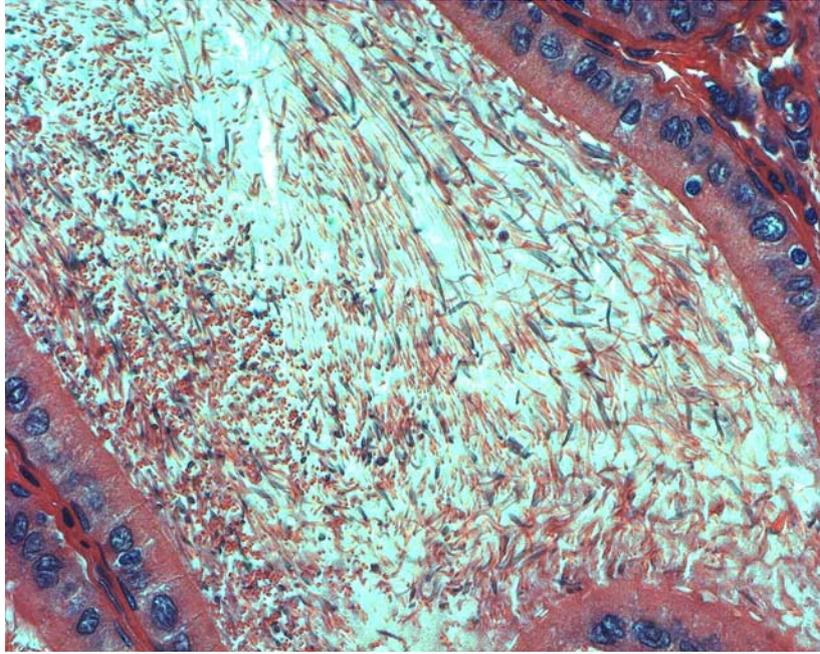
Obrázek 2: Tunica albuginea a prostor intersticiální tkáně pod ní s přítomností početných makrofágů, HE, zvětšeno 400x



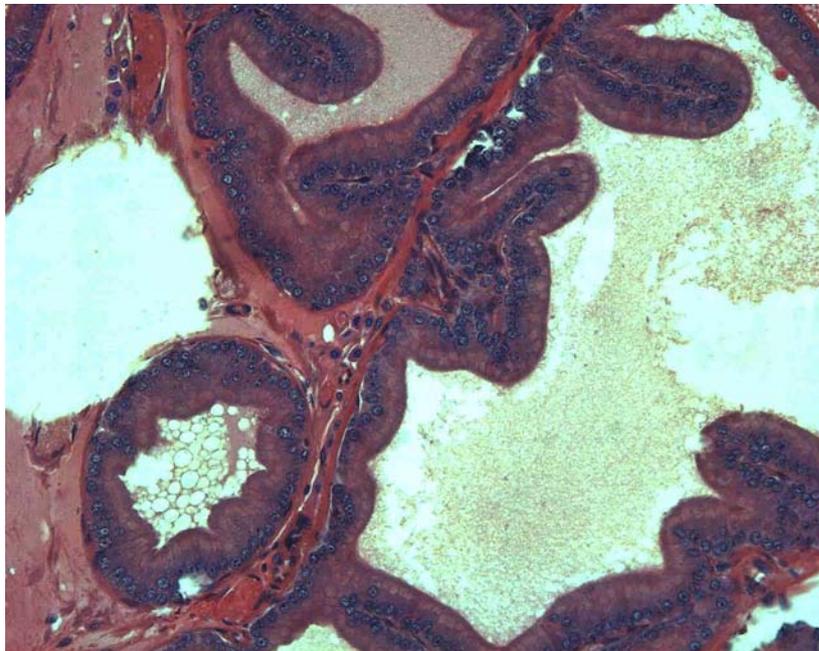
Obrázek 3: Detailní pohled na germinativní epitel stočených semenotvorných kanálků s úplnou a neovlivněnou spermiohistogenezí, HE, zvětšení 400x



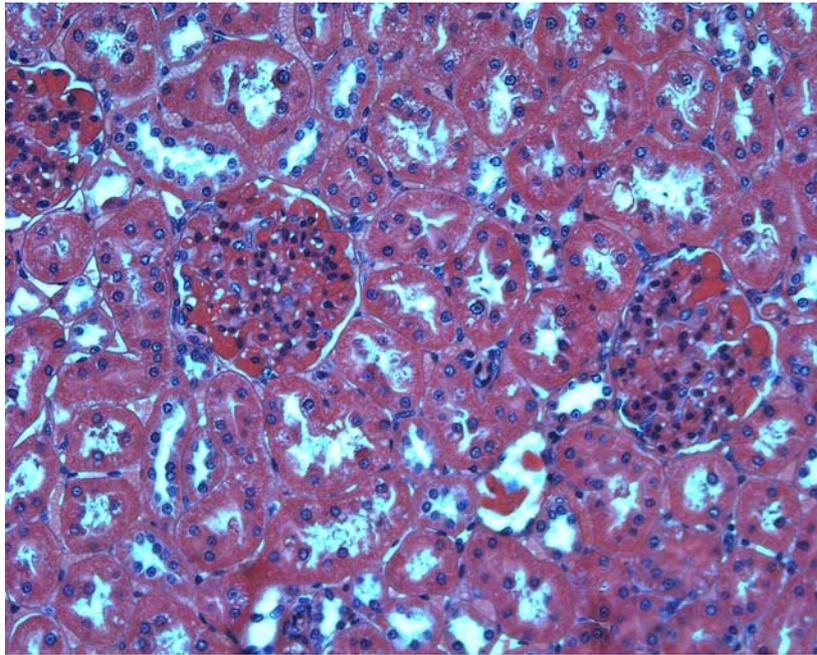
Obrázek 4: Přehled řezem kanálku ductus epididymidis s centrálně přítomnou normální populací spermatozoid, HE, zvětšeno 100x



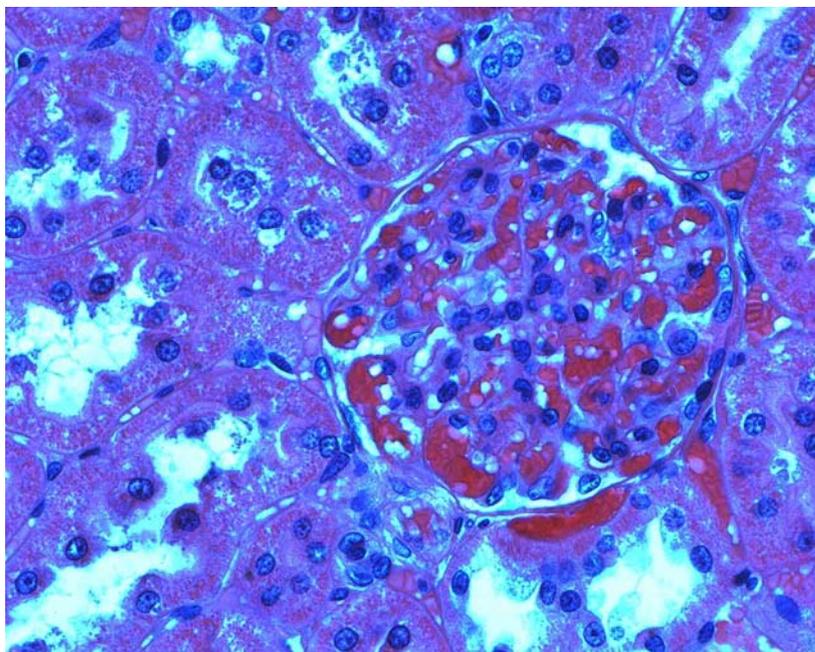
Obrázek 5: Detailní pohled na plně zralé neovlivněné samčí gamety, HE, zvětšeno 400x.



Obrázek 6: Průřezy žláznové části prostaty bez patologických změn, HE, zvětšeno 200x

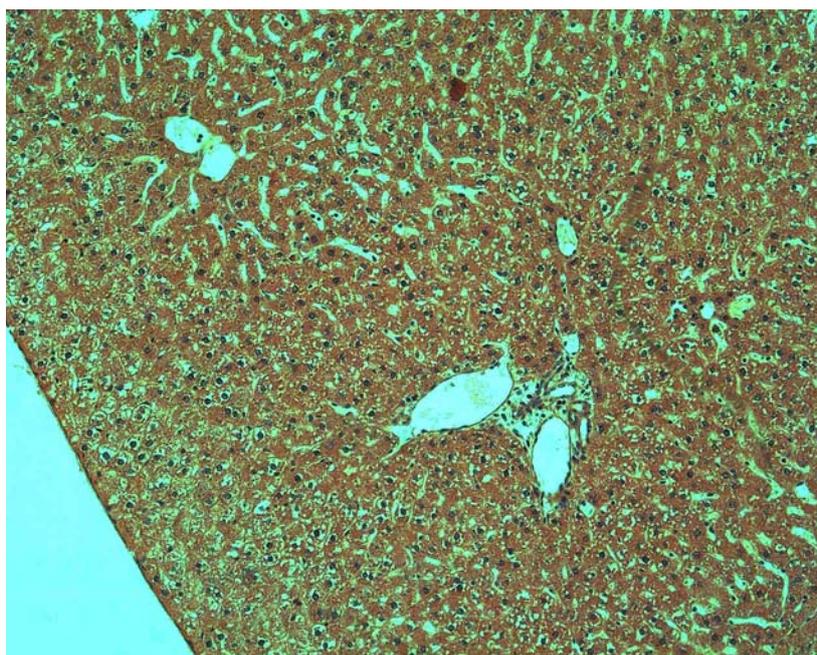


Obrázek 7: Přehledný obraz kortikální části ledviny bez patologických změn, místy však byly nalezeny výrazně překrvené kapilární části glomerulu. Tubulární úseky nefronu včetně intersticia byly bez výrazných změn. HE, zvětšeno 200x.

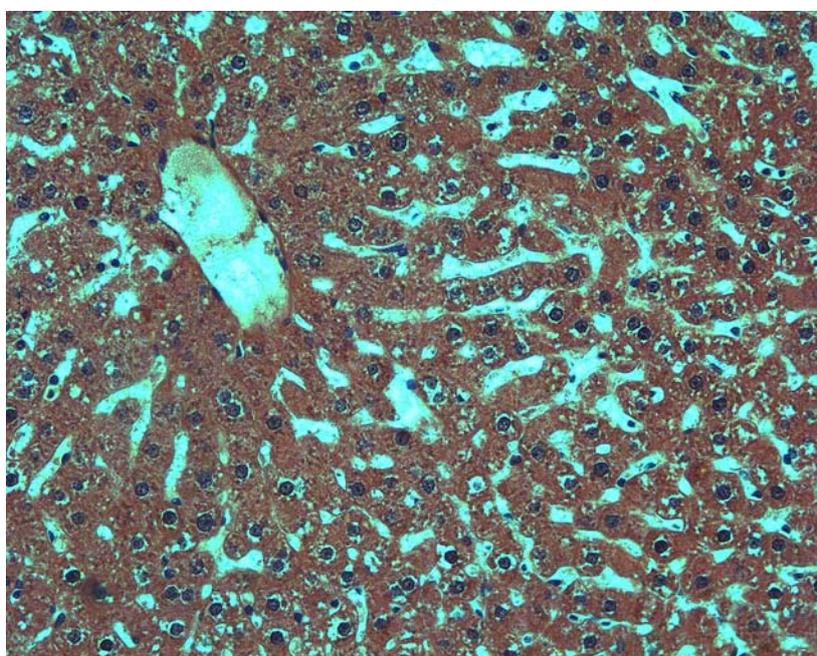


Obrázek 8: Detail překrveného glomerulu s výrazně potlačenou štěrbinou Bowmannova pouzdra. V proximálních tubulech bylo při detailním pohledu vidět degenerující epiteliální buňky s jádry.

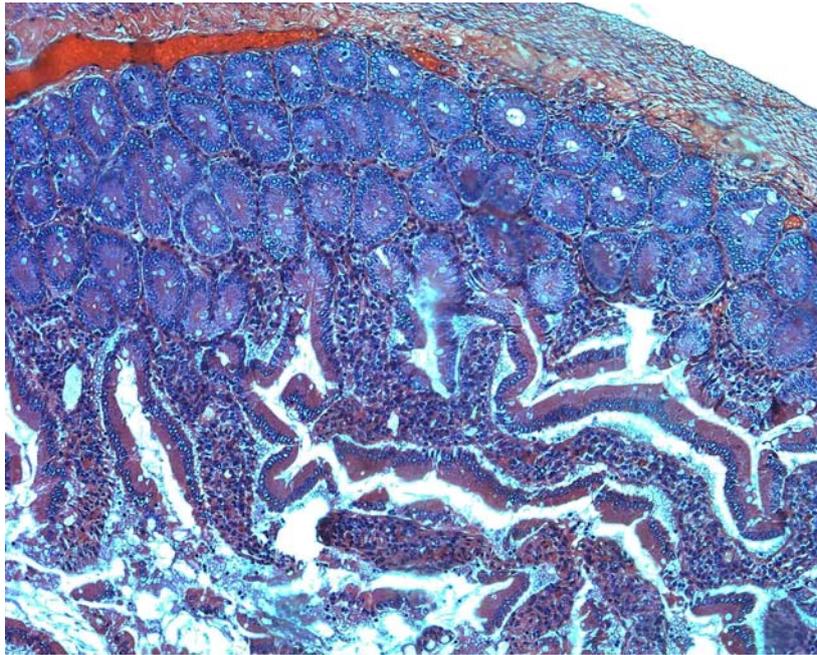
HE, zvětšeno 400x



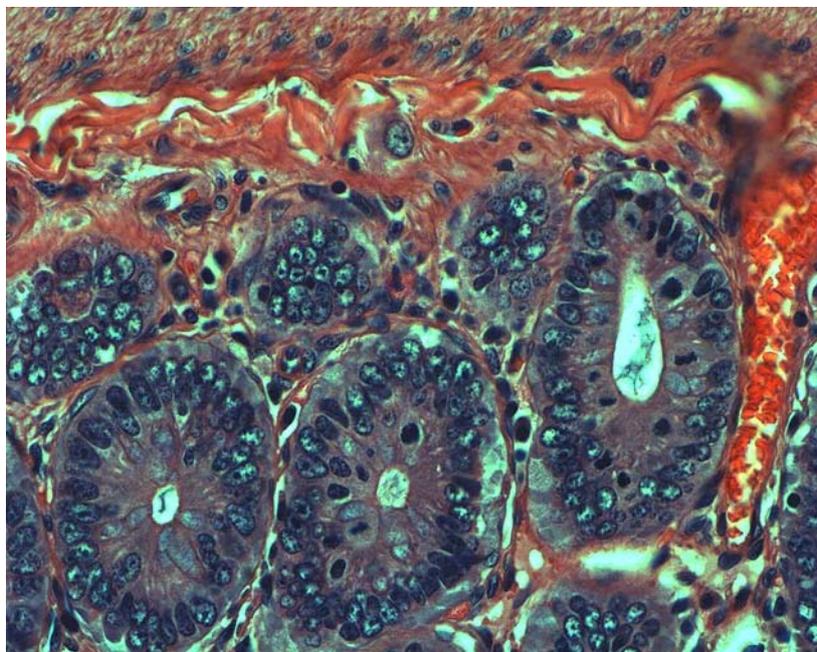
Obrázek 9: Přehled tkání jater vykázal místní změny zejména v cévní části lalůčků. Je zde zřetelné rozšíření jaterních sinusů sbíhajících se do centrální části. Jaterní buňky lemující tyto sinusy jeví známky degenerace. HE, zvětšeno 100x.



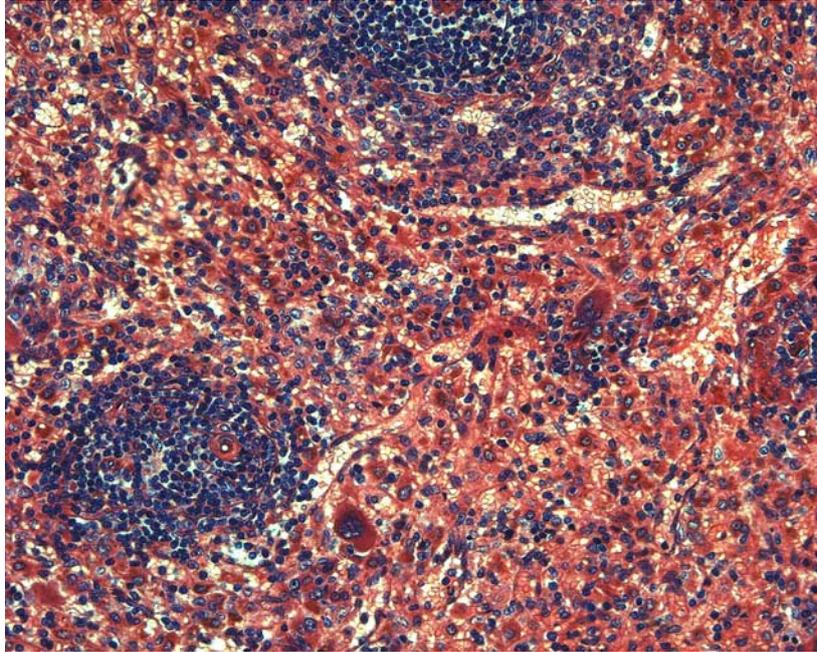
Obrázek 10: Detailní obraz jaterní tkáně popisující stav viz výše. HE, zvětšeno 200x.



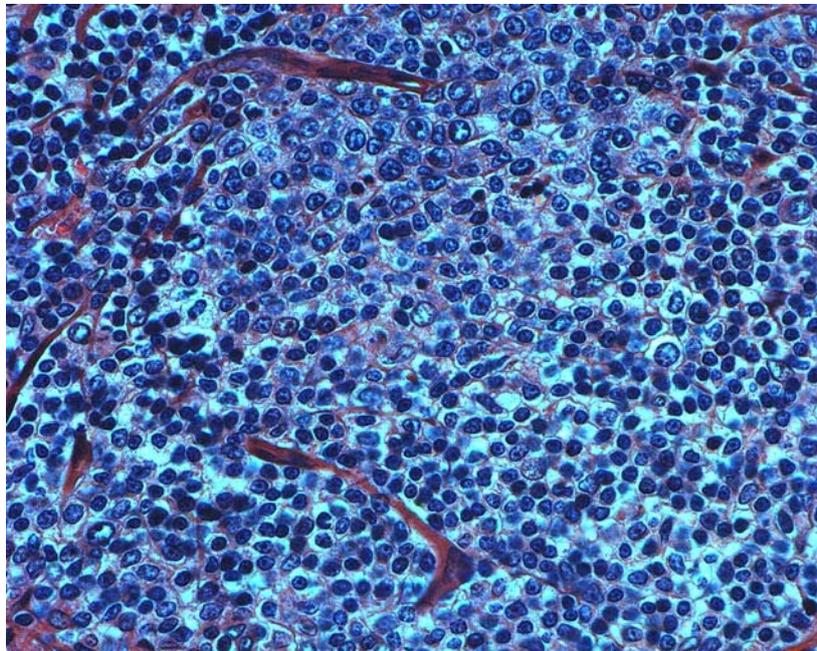
Obrázek 11: Přehledný řez duodenem vykazuje nezměněnou strukturu všech jeho komponent. Epitelie klků byly bez zjevných změn. V intersticiu jsme pozpozovali mírnou početnější infiltraci lymfocyty. Lieberkynské krypty měly normální morfolologii včetně početných mitóz. HE, zvětšeno 100x.



Obrázek 12: Detailní obraz Lieberkynských krypt, HE, zvětšeno 400x.

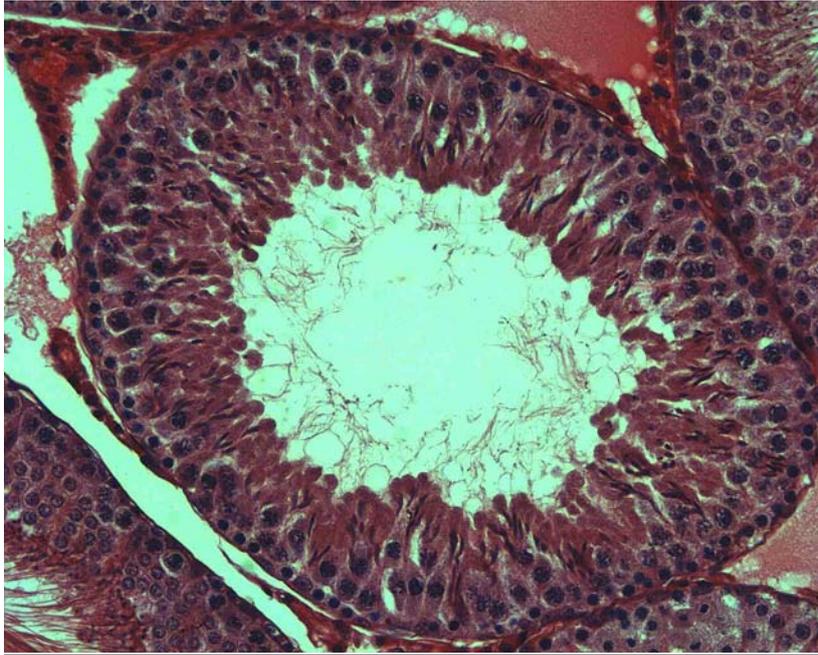


Obrázek 13: Přehledný obraz struktur sleziny. V červené pulpě je výrazné přečrvení a přítomnost mnohояaderných element, HE, zvětšeno 200x.



Obrázek 14: Detail aktivované centrální části folikulů bílé pulpy, HE, zvětšeno 400x.

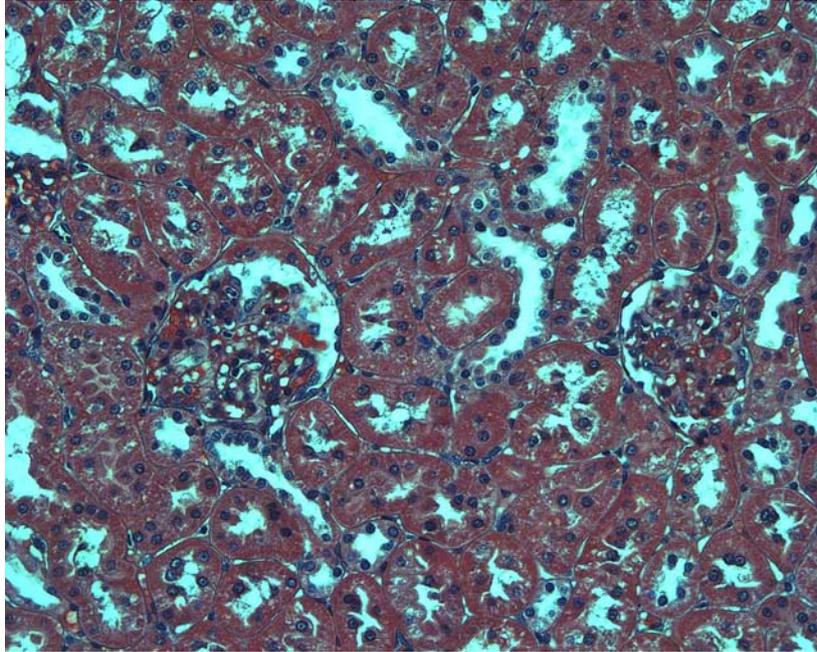
VÝSLEDKY SKUPINY B



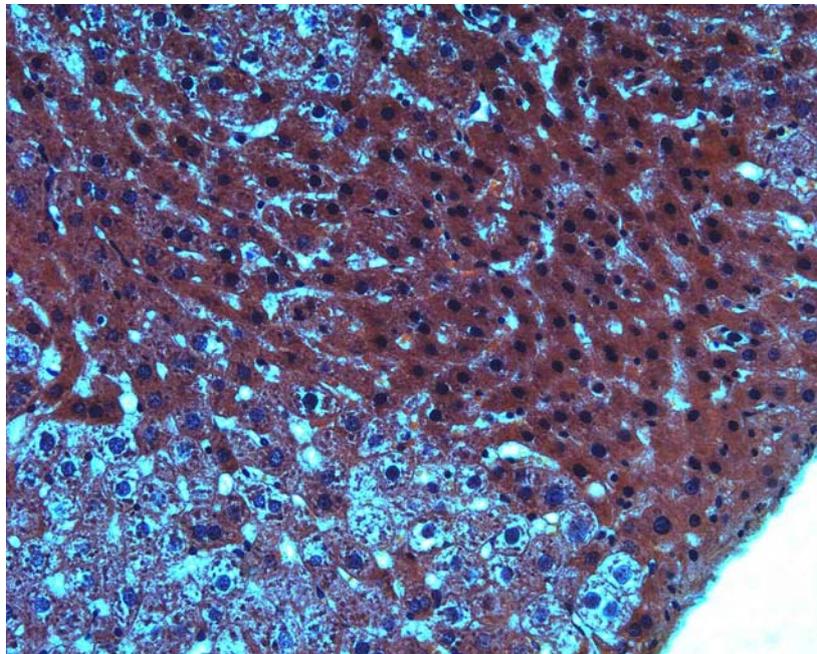
Obrázek 15: Příčný řez semenotvorným kanálkem s úplnou spermiogenezou, HE, zvětšení 200x.



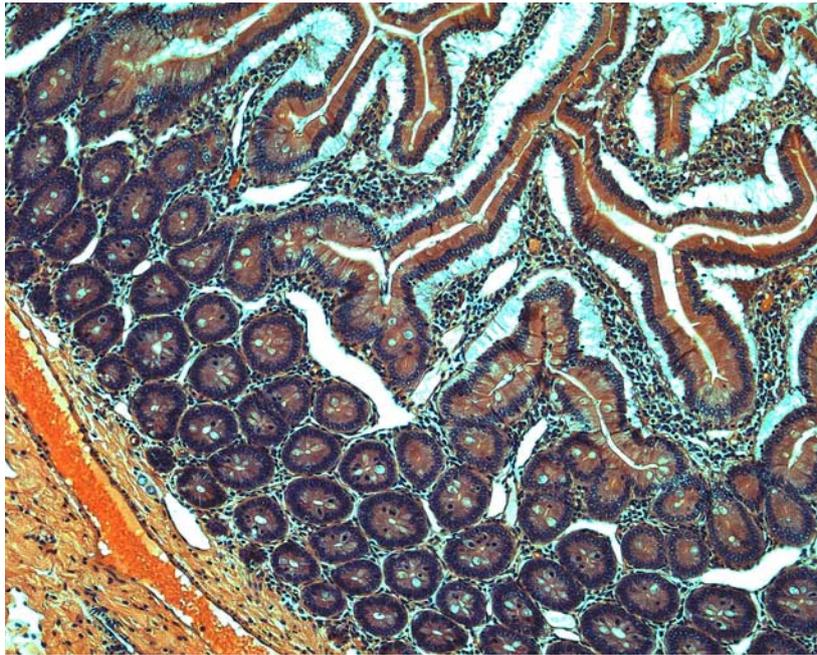
Obrázek 16: Detailní průřez tkání prostaty s fyziologicky utvářeným epitelem, HE, zvětšeno 400x



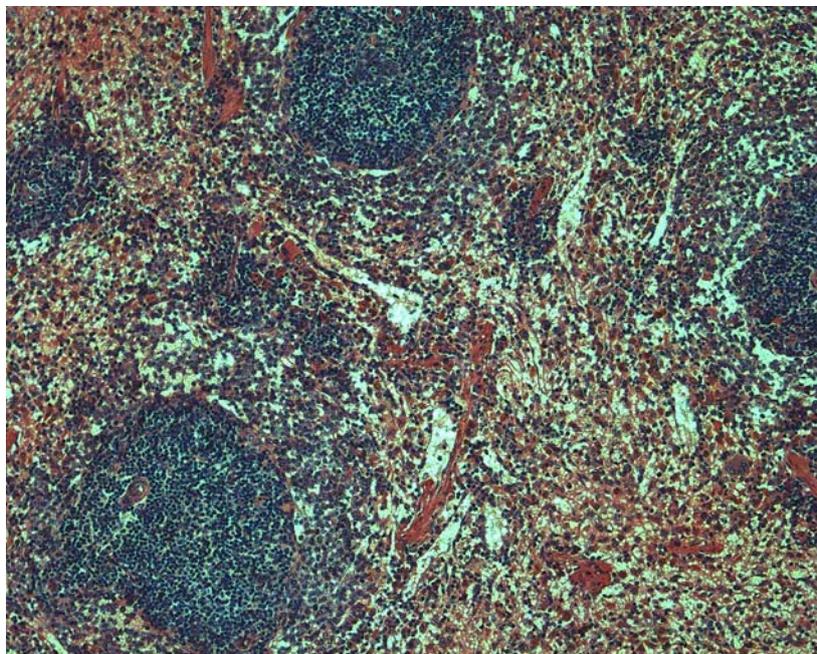
Obrázek 17: Korová část ledviny bez patrných morfologických změn, HE, zvětšeno 200x



Obrázek 18: Přehledný pohled na morfologický obraz jater. Je zde zachycena ložisková léze jaterních trámčů s výraznou eozinofilií, HE, zvětšeno 200x



Obrázek 19: Přehledný pohled na fyziologický stav součástí stěny duodena, HE, zvětšeno 100x.



Obrázek 20: Přehledný obraz komponent sleziny bez patrných změn, HE, zvětšeno 100x.

9. Summary

The aim of this bachelor's degree was to find out the effects of phthalate on the sperm function. We used adult rat males of „Wistar“ breed, weighing about 420 – 510 g. The rats were separated to two groups according to their weight. Both these groups were given diethyl phthalate Pestanal by gavage for 10 days. It was 0,5 ml for the group „A“ and 0,1 ml for the group „B“. The animals were killed by euthanasia after the experiment.

Organs were sampled of the abdominal cavity. Their size and weight approached physiological parameters. We measured mainly the long axis of testes and wet weight, which were in the physiological range. The organs were processed by histology and examined by light microscopy.

The results showed that spermiogenesis was not affected by the abovementioned mode of phthalate administration. We found out only hyperaemia of renal glomerular capillaries in the rats of „A“ group, who had been given diethyl phthalate Pestanal in the concentration of 0,5 ml. We also recorded a pronounced activation of splenic red pulp featuring an increase in number of multinucleated cells.

The liver displayed lesion of sinuses and lobules with focal necrosis of hepatocytes. Such changes appeared in animals both exposed to both dosage levels.

Our experimental mode also involved monitoring of body weight and foraging behaviour of rats. During diethyl phthalate Pestanal administration the rats gained about 35 g in weight. However, their weight was fluctuating during this 10. day interval, which might be caused by gavage traumatism.