

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE

Katedra fyziologie živočichů a vývojové biologie

oddělení vývojové biologie a imunologie

Bakalářská práce

**VARLATA jako IMUNOLOGICKY PRIVILEGOVANÉ  
ORGÁNY**

**Vedoucí bakalářské práce:**

Doc. Mgr. Jan Černý Ph.D.

Laboratoř buněčné imunologie  
Přírodovědecká fakulta UK v Praze

**Autor:**

Lenka Drozdíková

Praha 2006

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala Doc. Mgr. Janu Černému Ph.D. za velmi vstřícný přístup a cenné rady při sepisování této práce

# 1. OBSAH

Poděkování .....	1
1. OBSAH.....	2
2. SEZNAM ZKRATEK.....	3
3. ÚVOD .....	4
4. IMUNOLOGICKÁ PRIVILEGOVANOST VE VARLATECH.....	5
4. 1 Stavba varlat, struktura a funkce krevně-testikulární bariéry .....	6
4. 1. 1 Stavba savčích varlat .....	6
4. 1. 2 Struktura krevně-testikulární bariéry .....	7
4. 1. 3 Funkce krevně-testikulární bariéry .....	9
4. 2 Imunosupresivní mechanismy ve varlatech .....	10
4. 3 Fas/FasL systém .....	11
4. 3. 1 Role Fas/FasL systému ve varlatech .....	12
4. 4 Sertoliho buňky-klíčové regulátory lokálních imunitních reakcí ve varlatech .....	13
4. 5 Autoimunitní orchitida a role TNF- $\alpha$ v EAO .....	15
4. 6 Imunomodulační účinky semenné plazmy .....	16
5. ZÁVĚR.....	17
6. SEZNAM LITERATURY .....	18

## 2. SEZNAM ZKRATEK

CTL	cytotoxický T-lymfocyt
FasL	Fas ligand
FSH	folikul stimulující hormon
HPV	lidský papilomavirus (human papilloma virus)
HIV	virus lidské imunodeficiency (human immunodeficiency virus)
HSV	herpes simplex virus
ICAM	mezibuněčná adhezní molekula (intercellular adhesive molecule)
IL	interleukin
NK-buňka	přírozený zabíječ (natural killer)
PGE	prostaglandin E
sFasL	soluble FasL
T <sub>C</sub>	cytotoxický T-lymfocyt (cytotoxic T-cell)
TGF	transformující růstový faktor (transforming growth factor)
T <sub>H</sub>	pomocný T-lymfocyt (helper T-cell)
TNF	faktor nekrotizující nádory (tumor necrosis factor)
VCAM	cévní adhezní molekula (vascular cell adhesion molecule)

### 3. ÚVOD

Tkáně označované jako imunologicky privilegované interagují s imunitním systémem rozdílně v porovnání s většinou ostatních tkání (Newell, M. K. *et al.*, 2006). Vyvinuly se u nich totiž mechanismy bránící tomu, aby se v nich po infekci nebo jiném poškození rozvíjely zánětlivé a jiné destruktivní obranné reakce. Ty by mohly poškodit kriticky důležité orgány (oko, mozek, gonády). V alogenním příjemci jsou proto odhrojovány v mnohem menší míře než jiné tkáně. Platí to i obráceně, za experimentálních podmínek jsou i některé, jinak dobře odhrojované tkáně transplantované do určitých privilegovaných míst (mozek, přední komora oční), méně odhrojovány nebo dokonce zcela tolerovány (Hořejší, Bartůňková, 2005).

Mezi typické příklady imunologicky privilegovaných tkání/míst lze zahrnout oči (přední komora oční, stroma rohovky), mozek, varlata a ovaria (Dai, Z. *et al.*, 2005), dále matrix vlasových folikulů, dělohu po dobu těhotenství a lícní vaky syrských křečků (Rossini, A. A. *et al.*, 1999).

Mechanismy imunologické privilegovanosti nejsou zcela objasněny. Původní myšlenka, že privilegovanost vzniká pouze jako pasivní důsledek anatomické bariéry mezi krví a tkáněmi, a nepřítomností nebo alespoň menším počtem eferentních lymfatických cév (Medawar, P., 1948), byla vyvrácena. Bylo prokázáno, že určitá privilegovaná místa (varlata (Head, J. R., 1983), mozek (Czerr, H. F. *et al.*, 1992), oči) vlastní četné eferentní lymfatické dráhy. Antigeny opouští privilegovaná místa, interagují s T-buňkami, ale namísto vyvolání destruktivní imunitní reakce, navozují toleranci nebo reakce, které nejsou pro tkáně až tak destruktivní (Janeway, C. A., 2001).

Dnes je známo, že mechanismy, pomocí nichž je imunologická privilegovanost udržovaná, jsou mnohem složitější a potlačují jak vrozené, tak adaptivní imunitní reakce. Tyto mechanismy, jak se zdá, zahrnují sníženou infiltraci buněk imunitního systému (důsledek přítomnosti krevně-tkáňové bariéry); produkci imunosupresivních a protizánětlivých cytokinů, např. TGF- $\beta$ , (preferenční rozvoj T<sub>H</sub>2 a potlačování T<sub>H</sub>1 reakcí); lokální expresi Fas ligandu (FasL), rozpustných variant MIC A proteinů, faktorů bránících migraci buněk imunitního systému, atypickou expresi klasických i neklasických MHC glykoproteinů I. třídy atd. Např. FasL se po kontaktu s efektorovými T<sub>C</sub> nebo T<sub>H</sub>1 naváže na jejich Fas receptor a indukuje v nich apoptózu. Buňky privilegovaných tkání tak tímto způsobem používají proti T-buňkám jejich vlastní zbraně (Janeway, C. A., 2001; Dai, Z. *et al.*, 2005).

Imunologická privilegovanost zvýhodňuje organismus poskytováním ochrany jeho životně důležitých orgánů před zánětlivými obrannými reakcemi a umožňuje přežívání alogenních štěpů bez podávání imunopresivních látek. Na druhou stranu, může představovat obrovský problém pro imunitní systém hostitele poskytováním útočiště pro nežádoucí nádorové buňky a patogeny. Tato strategie byla prokázána u HSV (herpes simplex virus) infekce, kdy vstup viru do přední komory oční vedl spíše než k imunitní reakci proti virům k toleranci (Griffith, T. S. *et al.*, 1996). Bylo prokázáno, že za určitých okolností se mohou i privilegovaná místa stát terčem autoimunitních reakcí (např. roztroušená skleróza, autoimunitní poškození reprodukčních orgánů) (Hořejší, Bartůňková, 2005).

Ve své práci jsem se zaměřila na jeden z typických příkladů imunologicky privilegovaných orgánů, a to na varlata.

#### 4. IMUNOLOGICKÁ PRIVILEGOVANOST VE VARLATECH

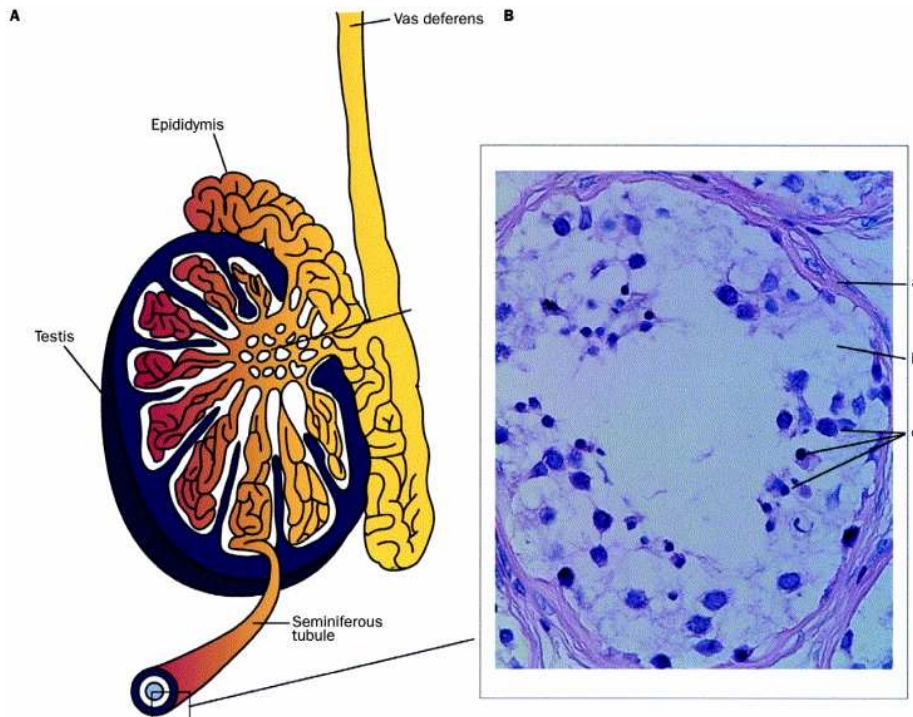
Imunologická kompetence je získaná během perinatálního období a spočívá ve schopnosti imunitního systému rozeznávat všechny antigeny, tou dobou přítomné v organismu, jako “vlastní“. Jakýkoliv antigen objevující se od této doby v organismu je považován za “nevlastí“, cizí, a proto se proti němu vytváří imunitní odpověď. V pubertě, kdy je již imunologická kompetence pevně stanovena, zahajují zárodečné buňky nový program vedoucí k tvorbě zralých spermií. Během tohoto procesu je na diferencujících se zárodečných buňkách exprimována sada nových povrchových molekul, potenciálních autoantigenů. Bylo pozorováno, že varlata jsou schopná tolerovat jak tyto autoantigeny zárodečné buňky, tak cizí tkáň transplantované do testikulárního intersticia (Head, J. R. *et al.*, 1983, Head, J. R. and Billingham, R. E., 1985). Toto zjištění vedlo k označení varlat jako imunologicky privilegovaných orgánů. Skutečnost, že jsou příslušné autoantigeny fyziologicky tolerovány *in situ*, ne však v případě, že jsou vpraveny kamkoliv jinam, kde vyvolávají silné autoimunitní reakce, umožňuje vědcům využívat experimentální autoimunitní záněty varlat (experimental autoimmune orchitis-EAO) jako efektivní nástroj pro studium patogenních mechanismů podobných spontánních patologií (Filippini, A. *et al.*, 2001).

Četné faktory podílející se na ustanovení imunotolerance ve varlotech zahrnují např. přítomnost krevně-testikulární bariéry, imunopresivních a protizánětlivých molekul

v testikulárním prostředí, vysoké množství místně syntetizovaných steroidních hormonů (některé z nich mohou mít imunosupresivní účinky), nižší okolní teplotu varlat (Head, J. R. and Billingham, R. E., 1985) a Fas systém jako regulátor imunologické homeostázy (Bellgrau, D. 1995).

## 4. 1 Stavba varlat, struktura a funkce krevně-testikulární bariéry

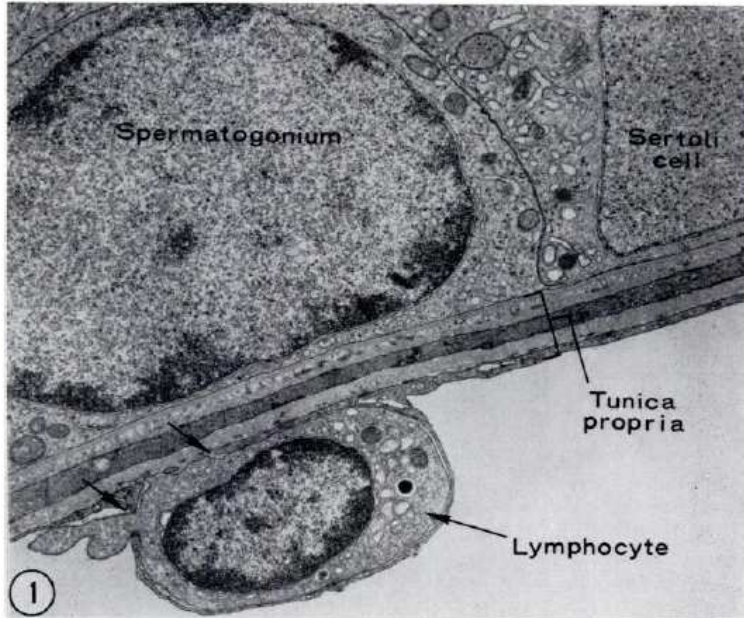
### 4. 1. 1 Stavba savčích varlat



Obr. 1: Anatomie varlete (a) makroskopický pohled ukazující lalůčky, které obsahují svinuté kanálky. (b) semenotvorný kanálek barvený Haematoxylin-eosinem. a-myoidní buněčná vrstva; b-Sertoliho buňky; c-zrající zárodečné buňky (převzato z Bart, J., 2002)

Na povrchu je každé savčí varle kryté vazivovým obalem (tunica albuginea), jenž zasahuje i do parenchymu varlete a rozděluje jej na přibližně 250 neúplných lalůček. Každý z lalůček obsahuje jeden až čtyři semenotvorné kanálky, které se skládají z nesmírně složitého epitelu, obsahujícího proliferující a diferencující se zárodečné buňky a podpůrné Sertoliho buňky (obr. 1). Ty jsou zodpovědné za udržování specifického mikroprostředí, ve kterém probíhá spermatogeneze, chrání a vyživují zárodečné buňky (Bart, J. *et al.*, 2002). Semenotvorné kanálky se u hilu varlete propojují a vytváří síť – rete testis. Z ní vystupuje 10 až 20 vývodných kanálků, pomocí nichž je transportována testikulární tekutina se zralými spermii do nadvarlete (Čihák, R., 1988). Epitel je obklopen tunikou propriou (obr. 2), která se z větší části skládá z bazální laminy, myoidních buněk a lymfatického endotelu

(Dym, M and Fawcett, D. W., 1970). Prostor mezi kanálky je vyplněn řídkým vazivem, bohatým na fibroblasty, žírné buňky a makrofágy. Ve vazivu se dále nachází intersticiální androgen-produkující Leydigovy buňky, nervy, síť krevních kapilár a mízní cévy (Hedger, M. P., 2002).



Obr. 2: Elektron-mikroskopický obrázek semenotvorného kanálku. Spermatogonium a Sertolihova buňka leží na tunica propria, lymfocyt pronikl do vnějšího lymfatického endotelu tunica propria (šipky) (převzato z Dym and Fawcett, 1970)

#### 4. 1. 2 Struktura krevně-testikulární bariéry

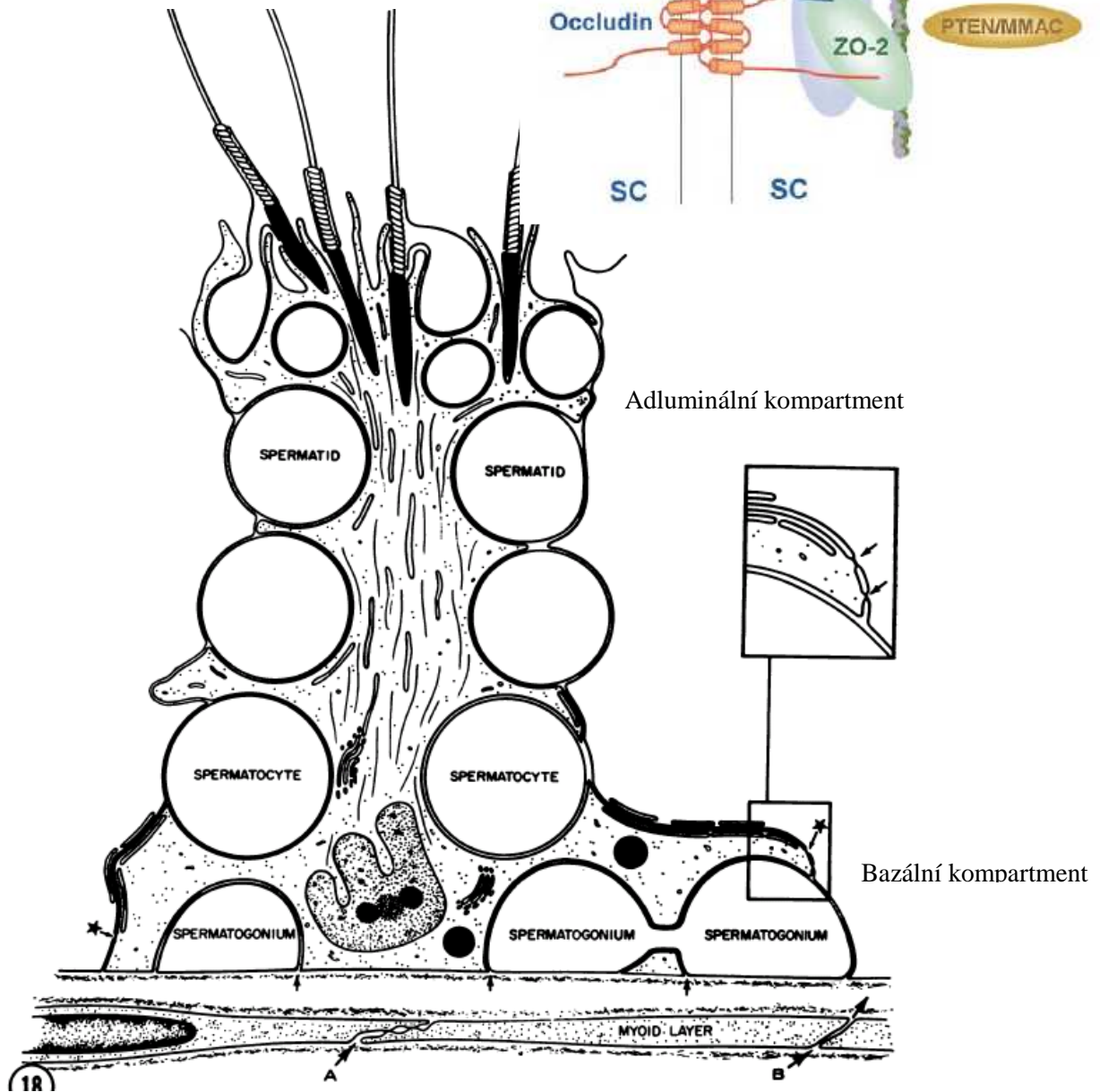
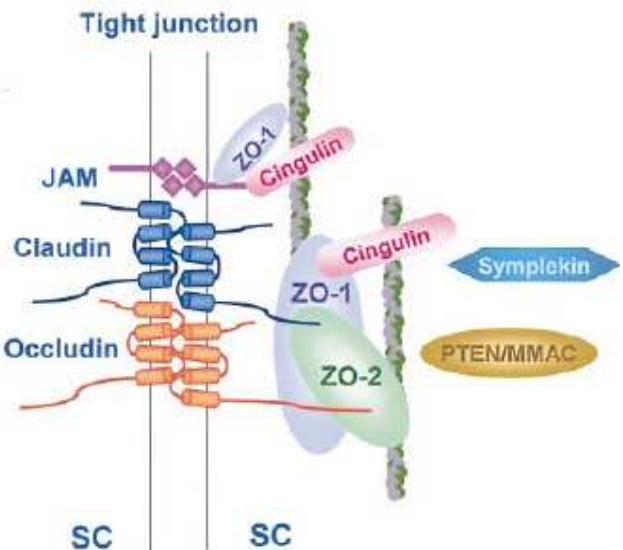
Fyziologické studie ze 70. let minulého století se zaměřily na přítomnost propustné bariéry obklopující semenotvorný kanálek savčích varlat. Kanylací rete testis potkanů byly odebrány vzorky testikulární tekutiny pro analýzu. Bylo zjištěno, že proteiny, hojné v krevní plazmě a testikulární lymfě, jsou přítomné v rete testis tekutině jen ve velmi nízkých koncentracích. Byly nalezeny také rozdíly v koncentracích aminokyselin a určitých iontů. Z toho bylo usouzeno, že kolem semenotvorného kanálku je umístěna bariéra schopná vyloučit z lumen těchto kanálků mnoho látek normálně přítomných v testikulární krvi a lymfě.

Primární bariérou pro vstup látek z intersticia do zárodečného epitelu je vrstva myoidních buněk (Obr. 4). Sousední myoidní buňky jsou od sebe odděleny těsnými spoji, které brání průniku látek do epitelu. Přesto, mohou některé látky v určitých místech této myoidní vrstvy pronikat otevřeným mezibuněčným prostorem do zárodečného epitelu, poté vstupují do prostoru mezi spermatogonií a Sertolihovou buňkou. Hlubšímu pronikání do lumen



kanálku je však zabráněno těsnými spoji mezi sousedními Sertoliho buňkami (Obr. 3). Tyto těsné spoje vytváří druhou, mnohem účinnější součást krevně-testikulární bariéry (Dym, M and Fawcett, D. W., 1970).

Obr. 3: Schéma znázorňující těsný spoj (Tj) mezi dvěma Sertoliho buňkami. Ve varlatech byli rozpoznány tři rozdílné Tj membránové proteiny (JAM, Claudin, Occludin) a sada periferních membrán. proteinů (převzato z Lui, W. Y, 2002).



Obr. 4: Schéma znázorňující lokalizaci krevně-testikulární bariéry a kompartmentalizaci zárodečného epitelu těsnými spoji mezi sousedními Sertoliho buňkami. A. těsné spoje mezi myodními buňkami B. otevřený mezibuněčný prostor, hvězdička – těsné spoje na hranici dvou Sertoliho buněk (převzato z Dym and Fawcett, 1970)

Studie dále odhalily, že těsné spoje mezi Sertoliho buňkami, rozdělují semenotvorný epitel na dva kompartmenty (Obr. 4): 1. bazální kompartment, mezi těsnými spoji Sertoliho buněk a bazální laminou, obsahující populaci spermatogonií a časné preleptotenní spermatocyty, a 2. adluminální kompartment, nad bariérou, tedy nad těsnými spoji Sertoliho buněk, obsahující spermatocyty a spermatidy (Dym, M. and Fawcett, D. W., 1970). V průběhu spermatogeneze se zárodečné buňky stěhují z bazálního do adluminálního kompartmentu, vytváří se nové těsné spoje a staré zanikají. Tvorba nových těsných spojů je regulována androgeny (Meng, J. *et al.*, 2005). Látky, které prochází otevřeným mezibuněčným prostorem v myoidní buněčné vrstvě mají volný přístup k buňkám bazálního kompartmentu, ale aby se setkaly s buňkami adluminálního kompartmentu, musí projít skrz Sertoliho buňky (Dym, M. and Fawcett, D. W., 1970).

#### **4. 1. 3 Funkce krevně-testikulární bariéry**

Krevně-testikulární bariéra odděluje většinu post-meiotických zárodečných buněk od intersticiálního prostředí varlat, a co je mnohem důležitější, od cirkulujících buněk imunitního systému a jejich humorálních produktů. Funkční význam krevně-testikulární bariéry tedy spočívá ve dvou hlavních aspektech: 1. udržování specifického prostředí pro diferenciaci spermatogenních buněk a 2. jejich oddělení od imunitního systému (Filippini, A. *et al.*, 2001).

Není pochyb, že krevně-testikulární bariéra určitým způsobem přispívá k ochraně antigenních zárodečných buněk ve varlatech. V řadě experimentů však bylo prokázáno, že se testikulární autoantigeny nachází i vně této bariéry. Spermatogonie a preleptotenní spermatocyty ležící v bazálním kompartmentu, vně hlavní složky bariéry, exprimují autoantigeny, jež jsou volně přístupné cirkulujícím protilátkám (Yule, T. D. *et al.*, 1988). Navíc se bariéra v průběhu zrání zárodečných buněk neustále přestavuje, čímž dochází k stěhování zrajících zárodečných buněk do lumen kanálku. U některých druhů savců (např. norek americký) se zřejmě v důsledku sezónního ústupu spermatogeneze bariéra opakovaně rozpadá (Pelletier, R. M., 1986). V určitých místech existují i rozdíly v propustnosti bariéry, např. lymfocyty a protilátky mohou relativně snadno procházet epitelem rete testis, kde se poté mohou setkat s antigenními spermii (Hedger, M. P., 2002). Vzhledem k důkazům o propustnosti krevně-testikulární bariéry, musí ve varlatech existovat specifické lokální mechanismy, jež regulují nebo potlačují imunitní reakce proti potenciálně autoantigenním zárodečným buňkám.

## 4. 2 Imunosupresivní mechanismy ve varlatech

Předběžná data popisující přítomnost imunosupresivních mechanismů ve varlatech byla potvrzena a dále specifikována týmy, jež si všimly anti-lymfocytické aktivity v kultuře Sertoliho buněk (Wyatt, C. R. *et al.*, 1988). *In vitro* studie prokázaly, že Sertoliho buňky sekretují molekuly inhibující proliferaci aktivovaných lymfocytů. Lymfocyty zůstávají v G<sub>1</sub> fázi buněčného cyklu. Mimoto, u nich dochází k drastickému snížení produkce IL-2 (De Cesaris, P. *et al.*, 1992). Jednou z důležitých imunosupresivních molekul produkovaných Sertoliho buňkami je TGF- $\beta$ 1. Antigeny v přítomnosti TGF- $\beta$  vyvolávají převážně T-buněčné reakce nepoškozující tkáň. Dochází tedy k preferenčnímu rozvoji T<sub>H</sub>2 odpovědi a potlačení T<sub>H</sub>1 reakce (Janeway, C. A., 2001). Sertoliho buňky také produkují clusterin, jenž má mnoho protizánětlivých účinků zahrnujících např. inhibici aktivace komplementu (Lee, H. *et al.*, 2006).

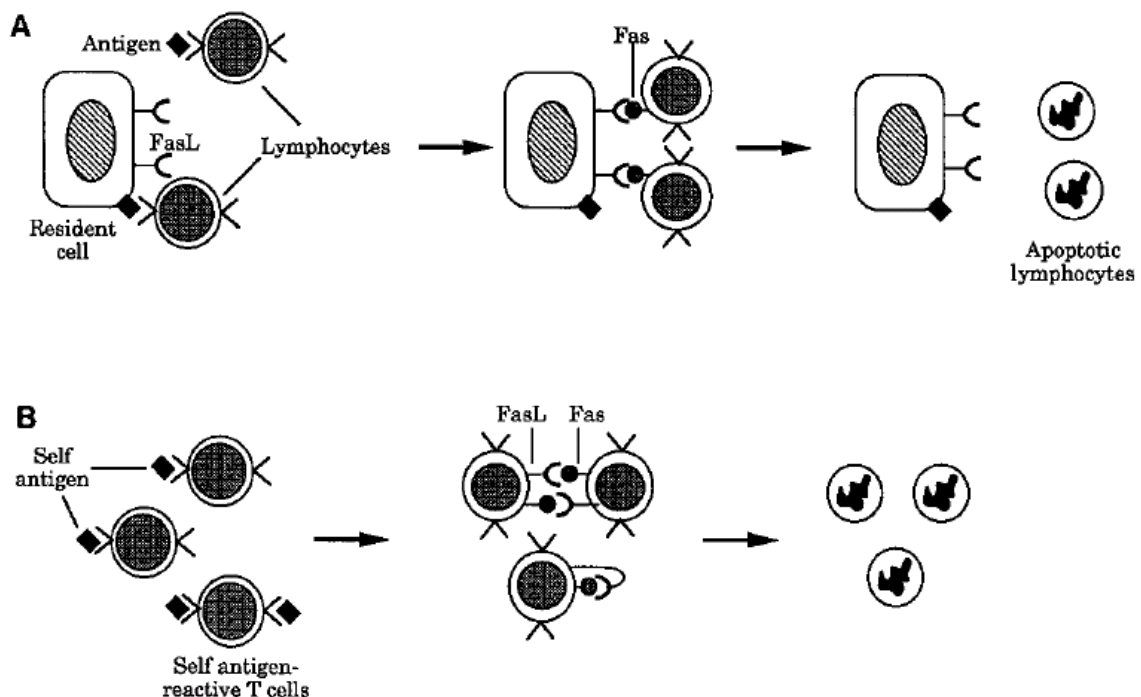
Intersticiální tkáň ve varlatech myši a potkanů obsahuje velké množství rezidentních makrofágů a malý, ale významný počet dendritických buněk, CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T-buněk a NK buněk. Tyto rezidentní makrofágy jsou morfologicky shodné s rezidentními makrofágy v ostatních tkáních. Studiemi na potkanech bylo prokázáno, že jsou v těchto testikulárních makrofázích zachovány fagocytické schopnosti, ale snížily se jejich schopnosti prozánětlivé. U izolovaných testikulárních makrofágů je poměrně nízká schopnost produkce prozánětlivých cytokinů IL-1 $\beta$  a TNF $\alpha$ . Jak se ukázalo, tyto rezidentní makrofágy jsou hlavními zdroji imunosupresivních peptidů,  $\alpha$ -melanocyty-stimulujícího hormonu a  $\beta$ -endorfinu (Hedger, M. P., 2002).

Byl navržen následující hypotetický model imunoregulace ve varlatech. Produkce cytokinů Sertoliho a Leydigovými buňkami vede k homingu cirkulujících monocytů do intersticia, ty následně pod vlivem testikulárního prostředí přijímají protizánětlivý, imunosupresivní fenotyp a stávají se rezidentními makrofágy. Tyto buňky pak společně s imunoregulačními cytokiny a dalšími regulátory produkovanými ve varlatech přispívají k imunologické privilegovanosti varlat (Hedger, M. P., 2002).

### 4. 3 Fas/FasL systém

Fas/FasL systém je v posledních letech považován za jeden z centrálních mechanismů regulace imunitní reakce. Mechanismem jeho účinku je receptorem Fas indukovaná apoptóza aktivovaných lymfocytů. (D'Alessio, A. *et al.*, 2001). Fas (APO-1, CD95) je transmembránový protein I. typu patřící do tumor necrosis factor (TNF) receptorové rodiny. Obsahuje "doménu smrti" a po vazbě příslušného ligandu FasL je trimerizován a aktivuje kaskádu caspáz kulminující příslušnými apoptotickými ději. FasL (APO-1L, CD95L) je syntetizovaný jako transmembránový protein II. typu patřící do TNF rodiny. Jeho proteolytickým štěpením (specifickou membránovou metaloproteinázou) vzniká rozpustná forma (sFasL). Fas-FasL interakce pak spouští programovanou smrt buněk exprimujících Fas (Nagata, S., 1997).

FasL je převážně exprimován na aktivovaných T-buňkách a NK buňkách, zatímco Fas na široké škále buněk a tkání zahrnujících např. brzlík, játra, srdce a ledviny. Genetické a imunologické analýzy myši postrádajících FasL nebo Fas naznačily, že FasL je jednou z důležitých efektorových molekul  $CD8^+$  cytotoxických T-lymfocytů (CTLs) a  $CD4^+$   $T_H1$  buněk. Dále je Fas systém zapojen např. do klonální delecce autoreaktivních lymfocytů (mechanismu periferní tolerance) a do udržování imunologické privilegovanosti (Obr. 5) (Tanaka, M. *et al.*, 1996; Tanaka, M. *et al.*, 1998).



Obr. 5: Role Fas-FasL interakce v udržování imunologické privilegovanosti a autotolerance (a) imunologická privilegovanost (b) imunologická autotolerance (převzato z Abbas, A. K., 1996)

### 4. 3. 1 Role Fas/FasL systému ve varlatech

Prvotní studie exprese FasL mRNA v různých tkáních myší a potkanů odhalily, že varlata jsou hlavním nelymfoidním zdrojem FasL mRNA, zatímco exprese jeho receptoru Fas nebyla ve varlatech zjištěna (Suda, T., 1993). Byly provedeny další analýzy *in vitro*, jimiž bylo prokázáno, že Fas je exprimován na zárodečných buňkách v myších, potkaních, i v lidských varlatech. Předpokládá se, že Fas systém působí jako klíčový regulátor apoptózy zárodečných buněk během spermatogeneze. V tomto modelu, FasL exprimovaný Sertoliho buňkami iniciuje apoptózu zárodečných buněk exprimujících Fas (Lee, J. *et al.*, 1997; Pentikäinen, V. *et al.*, 1999).

Role vzájemného působení Fas-FasL v imunologické privilegovanosti byla poprvé doložena zjištěním, že testikulární štěpy přežívají neomezeně dlouho, jestliže jsou transplantovány do alogenního hostitele. Toto přežívání je spojeno s expresí FasL. Bellgrau a jeho kolegové (Bellgrau, D. *et al.*, 1995) publikovali data ukazující, že varlata z myší, jež exprimují funkční FasL, přežívají neomezeně dlouho, jestliže jsou transplantovány do ledvinového pouzdra alogenního hostitele, zatímco varlata pocházející z *gld* (generalized disease) myších mutantů, jež exprimují nefunkční FasL, byly odhojeny. Další jejich analýzy varlat ukázaly, že FasL mRNA je soustavně exprimována testikulárními Sertoliho buňkami a že Sertoliho buňky z normálních myší (ale ne z *gld* myší) byly akceptovány v případě, že byly transplantovány do alogenních příjemců. Exprese FasL tedy ve varlatech zajišťuje imunologickou privilegovanost vyvoláním apoptotické buněčné smrti ve Fas-exprimujících aktivovaných příjemcovských T-buňkách.

Tento proces probíhá zřejmě podle následujícího schématu. Hostitelské aloreaktivní T buňky vstupují do štěpu, rozeznávají aloantigeny na testikulární tkáni a jsou aktivovány. Následně začínají T-buňky exprimovat Fas, čímž se stávají terčem pro cytolytické působení FasL, jenž je soustavně exprimován na Sertoliho buňkách. To vede k zabíjení aktivovaných hostitelských T-buněk a tedy k ochraně štěpu před odhojením (Abbas, A. K., 1996).

Navzdory předchozím poznatkům zůstává role FasL v imunologické privilegovanosti varlat v současné době velice sporná. Někteří podporují myšlenku Bellgraua, jiní se pozastavují například nad tím, že jsou-li lymfocyty v přímém kontaktu s peritubulárními myoidními buňkami, nemohou nikdy přijít do styku se Sertoliho buňkami. Mimoto, mnohé studie podporující myšlenku, že FasL sám o sobě je schopen zajistit stav imunologické privilegovanosti, byly přehodnoceny nebo vyvráceny (Restifo, N. P., 2000; Filippini, A., 2001). Pokusy provedené Allison *et al.* (1997), jež měly zopakovat pozorování Bellgraua,

nebyly úspěšné, protože FasL<sup>+</sup> nebo FasL<sup>-</sup> alogenní testikulární štěpy vyvíjely masivní infiltraci lymfocytů a ztrácely veškerou normální tkáňovou strukturu již po 28 dnech. To je v jasném rozporu s pozorováním Bellgraua, který publikoval neomezeně dlouhé přežívání FasL<sup>+</sup> alogenních štěpů. Další pokusy Allison *et al.*, jež měly prokázat roli FasL v privilegovanosti byly rovněž neúspěšné. Expresí funkčního FasL na ostrůvcích pankreatu transgenních myší, nechránila tyto ostrůvky před odhojením v případě, že byly umístěny do ledvinového pouzdra recipientních myší. Přítomnost FasL v transgenních myších vyvolala infiltraci granulocytů a následné poškození (ale ne zničení) ostrůvků pankreatu. I další studie jiných výzkumných týmů ukázaly, že exprese či nadměrná exprese FasL může po alogenní nebo xenogenní transplantaci vyvolat prozánětlivé imunitní reakce.

Zcela jiný pohled na funkci Fas systému ve varlatech přinesli D'Alessio *et al.* (2001). Domnívají se též, že je nutné přehodnotit roli, jež byla doposud Fas systému ve varlatech přisuzována (udržování imunologické privilegovanosti a regulace apoptózy zárodečných buněk v průběhu spermatogeneze), protože obě výše zmíněné hypotézy podle nich vyplývají z chybné buněčné lokalizace FasL v semenotvorném epitelu. Jejich studie, prováděná na potkanech, poskytuje přímý důkaz, založený na Northern blot analýze a různých dalších experimentálních metodách, že přisuzování exprese FasL Sertoliho buňkám je mylné a že transkripce FasL nastává spíše v diferencujících se zárodečných buňkách. Samotný FasL protein je poté vystaven na povrchu jen tehdy, když je gameta zralá a opouští varlata. Toto zjištění poskytuje poutavou oblast výzkumu s ohledem na specifickou funkci FasL v biologii savčí reprodukce. Přítomnost FasL na buněčném povrchu spermie by mohla představovat jednu z promyšlených cest, jak samčí gamety mohou uniknout jak autoimunitním reakcím během cesty samčím pohlavním ústrojím, tak alogenním reakcím v hostitelském těle opačného pohlaví.

#### **4. 4 Sertoliho buňky-klíčové regulátory lokálních imunitních reakcí ve varlatech**

Sertoliho buňky mohou být ve varlatech zapojeny jak do pozitivní, tak negativní regulace imunitních reakcí. V obou těchto případech interagují s lymfocyty prostřednictvím dvou základních mechanismů: parakrinním působením cytokinů a prostřednictvím specifických povrchových proteinů (Riccioli, A., *et al.*, 1995). Jak se ukázalo, Sertoliho buňky v kultuře *in vitro* sekretují tranferin, IL-6 a IL-1 $\alpha$ , jehož produkce v průběhu pohlavního dospívání

vzrůstá (Gerard, N., *et al.*, 1991). Dále bylo prokázáno, že jsou Sertoliho buňky aktivními fagocyty a že tyto fagocytické schopnosti jsou pod negativní kontrolou folikul-stimulujícího hormonu (FSH). Tato kontrola je zprostředkována zvýšením intracelulárního množství cAMP. Pohlčování částic je navíc spojeno s dramatickými změnami buněčného povrchu Sertoliho buněk. (Filippini, A., *et al.* 1989). Produkce transferinu a IL-6 vzrůstá působením FSH. Sertoliho buňky tedy produkují řadu cytokinů a faktorů, které působí na velké množství buněčných typů, zvláště pak na buňky imunitního systému. IL-6 je považován za jeden ze známých silně účinných cytokinů stimulujících T a B lymfocyty. Bylo navrženo, že deregulace genové exprese IL-6 může být zapojena do patogeneze autoimunitních onemocnění (Hirano, T., *et al.*, 1986).

Za normálních fyziologických podmínek jsou ve varlatech produkovány prozánětlivé cytokiny TNF- $\alpha$  a IL-1. Jak je známo, hrají rovněž klíčovou roli v udržování testikulárních funkcí. Na druhou stranu, zvýšení jejich exprese může vést až k autoimunitní orchitidě nebo torzu varlete (Lysiak, J. J, 2004). V kultuře myších Sertoliho buněk, zánětlivé mediátory jako např. IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) a lipopolysacharidy (LPS), silně zvyšují povrchovou expresi integrinových ligandů (cévní adhezní molekuly 1 (VCAM-1) a mezibuněčné adhezní molekuly 1 (ICAM-1)), které jsou známy jako specifické vazebné molekuly pro lymfocyty. Elektron-mikroskopická analýza a vazebné experimenty za použití <sup>51</sup>Cr-značených lymfocytů prokázaly, že zvýšená exprese ICAM-1 a VCAM-1 na povrchu Sertoliho buněk, vyvolaná zánětlivými mediátory, vede ke zvýšené adhezi mezi těmito dvěma typy buněk. Stejně podněty, s výjimkou IFN- $\gamma$ , vyvolávají prudký a nápadný přírůstek IL-6 produkovaného Sertoliho buňkami (Riccioli, A., *et al.*, 1995).

TNF- $\alpha$  je testikulární parakrinní faktor produkováný testikulárními makrofágy a zárodečnými buňkami. Myší Sertoliho buňky v odpověď na TNF- $\alpha$  zvyšují produkci IL-6 a expresi adhezních molekul na svém povrchu. Byla zkoumaná dráha přenosu signálu TNF- $\alpha$  v Sertoliho buňkách. Jak se ukázalo, TNF- $\alpha$  aktivuje MAP-K (mitogeny aktivovaná proteinkináza) dráhu (extracellular signal-regulated kinases (ERKs), p38 a Jun N-terminal kinases (JNKs)). Tyto data dále ukázaly, že aktivace p38 vede k produkci IL-6, zatímco exprese ICAM-1 je vyvolaná aktivací JNKs dráhy (De Cesaris, P., *et al.*, 1999).

Tyto výsledky potvrzují přítomnost jak přímých, tak parakrinních mechanismů interakce mezi Sertoliho buňkami a imuno-kompetentními buňkami, zapojených do kontroly imunitních reakcí ve varlatech. Tyto mechanismy jsou důležité pro porozumění zánětlivým a/nebo autoimunitním patologiím varlat (Riccioli, A., *et al.*, 1995).

Mnohé studie prokázaly, že jsou cytokiny, zvláště pak TNF- $\alpha$  a INF- $\gamma$ , také regulátory Fas a FasL exprese. Byly zkoumány účinky TNF- $\alpha$  a INF- $\gamma$  na expresi Fas/FasL na Sertoliho buňkách. Výsledky ukázaly, že oba cytokiny zvyšují Fas, ale ne FasL expresi a že up-regulovaná membránová forma Fas proteinu (mFas) je aktivní, protože v kultuře s Neuro-2a FasL<sup>+</sup> efektorovými buňkami indukuje smrt Sertoliho buněk. Navíc sFas forma indukovaná stejnými cytokiny, jež má antiapoptotické účinky, je také funkční. Kondicionané médium z kultivovaných Sertoliho buněk stimulovaných TNF- $\alpha$  inhibuje Neuro-2a FasL<sup>+</sup>-indukovanou buněčnou smrt. Tyto data tedy ukazují možnou regulační roli TNF- $\alpha$  a INF- $\gamma$  na Fas-zprostředkované apoptóze ve varlatech porušením rovnováhy mezi dvěma výše zmíněnými Fas formami (Riccioli, A, *et al.* 2000).

#### 4. 5 Autoimunitní orchitida a role TNF- $\alpha$ v EAO

Vzhledem k řadě poměrně spolehlivých imunoregulačních mechanismů ve varlatech nejsou autoimunitní postižení mužských pohlavních orgánů častá, mohou však mít nežádoucí důsledky, především vznik neplodnosti. Orchida je popsána jako zánětlivé onemocnění spojené pouze s virovou, bakteriální nebo mykoplazmatickou infekcí (Hedger, M. P., 2002). Spontánně se vyskytuje u psů, norků a po vasektomii u králíků a morčat. U hlodavců, jimž se brzy po narození odstraní tymus, dochází po latenci k rozvoji autoimunitních syndromů, jejichž součástí je pravidelně orchitida s postižením zárodečných buněk. Těžkou orchitidu s aspermií lze vyvolat i u dospělých myší imunizací varletními homogenáty se silným adjuvans. (Tung, K. S. K. and Lu, C. Y., 1989). Tento zvířecí modelový systém je známý jako experimentální autoimunitní orchitida a je široce využíván pro studium tohoto onemocnění (Lysiak, J. J., 2004).

Role prozánětlivých cytokinů v EAO byla popsána Yule and Tungem (1993). Prokázali, že injekce TNF neutralizační protilátky ruší účinky EAO. Vytvořením klonů T-lymfocytů z myší s EAO a jejich injekcí do normálních myší ukázali, že klony T-lymfocytů vyvolávají autoimunitní onemocnění varlat. T-lymfocyty zodpovědné za přenos EAO byly identifikovány jako CD4<sup>+</sup> sekretující TNF- $\alpha$ , IL-2 a IFN- $\gamma$ . Orchitida byla po injekci orchitogenních T-lymfocytů do recipientních myší s anti-TNF- $\alpha$  neutralizační protilátkou utlumená.

Nedávná studie Suescun *et al.* (2003) poskytla další důkazy zapojení TNF- $\alpha$  v EAO. Potkani s EAO vykazovali značné zvýšení v počtu TNF- $\alpha$  pozitivních testikulárních makrofágů. Testikulární makrofágy izolované ze zvířat s EAO sekretují větší množství



TNF- $\alpha$  v porovnání s makrofágy izolovanými z kontrolních zvířat. Dále prokázali *in vitro* inhibiční účinky TNF- $\alpha$  na produkci testosteronu Leydigovými buňkami z potkanů s orchitidou a navrhli možnou roli TNF- $\alpha$  v apoptóze zárodečných buněk během EAO.

#### 4. 6 Imunomodulační účinky semenné plazmy

Stejně tak, jako jsou potenciálně autoantigenní zárodečné buňky chráněny před imunitním systémem uvnitř varlat, musí být chráněny i při cestě samčím a samičím reprodukčním traktem. Toho je dosaženo imunosupresivními účinky semenné plazmy, díky nimž nedochází k imunitním reakcím proti antigenům spermií. Vzhledem k tomu, že je semenná plazma složena z tekutiny pocházející z mnoha přídatných pohlavních žláz, jako např. ze semenného váčku, prostaty, nadvarlete, Cowperových žláz a vas deferens, není původ imunosupresivních faktorů v semenné plazmě zcela objasněn (Filippini, A., *et al.*, 2001). Bylo však prokázáno, že hlavní složkou semenné plazmy s imunosupresivními účinky je tekutina semenného váčku (Emoto, M., *et al.*, 1991). V současnosti jsou za nejdůležitější efekторы imnosuprese v lidské semenné plazmě považovány prostaglandiny, prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) a 19-hydroxyprostaglandin E (19-hydroxy PGE) (Denison, F. C., 1999).

Imunosupresivní aktivita v lidské semenné plazmě je na jednu stranu prospěšná pro přežívání spermií v hostitelském samičím reprodukčním traktu, ale na druhou stranu může podporovat přenos onemocnění. Skutečnost, že sperma nepřenáší jen viry, ale také potenciální modulátory lokálních odpovědí příjemce, je důležitá pro studium pohlavně přenosných nemocí a vývoj antikoncepce (Kelly, R. W., *et al.*, 1997).

Lidské sperma může přenášet určité viry jako např. cytomegalovirus, lidský papilomavirus (HPV)(Zur Hausen, H., 1982) a virus lidské imunodeficiency (HIV)(Van Voorhis, B. J., *et al.*, 1991). Poruchy anti-virové odpovědi v reprodukčním traktu končí v případě, že není zahájena včasná léčba patologiemi např. dysplázií a rakovinou děložního krčku v případě HPV a AIDS v případě HIV infekce. Sperma může obsahovat volné viriony nebo infikované leukocyty. HIV virus infikuje převážně Langerhansovy buňky, hlavní antigen prezentující buňky epitelální vrstvy dělohy a děložního krčku (Zambruno, G., *et al.*, 1995). Buňky infikované viry jsou eliminovány T a NK buňkami. Tento děj je stimulován IL-12 (dříve známý jako stimulační faktor NK buněk) a částečně inhibován IL-10. Kelly, R. W. *et al.* (1997) zkoumaly účinky lidské semenné plazmy na produkci těchto klíčových cytokinů. *In vitro* studie prokázaly vliv prostaglandinů lidské semenné plazmy na produkci cytokinů leukocyty. V přítomnosti PGE<sub>2</sub> a 19-hydroxy PGE dochází poklesu

produkce IL-12 a stimulaci IL-10, což má negativní vliv na schopnost T<sub>C</sub>-buněk a NK buněk rozpoznávat a ničit buňky infikované virem. Mimoto, stimulace IL-10 blokuje anti-HIV aktivity sekretované CD8<sup>+</sup> T-buňkami. Lidská semenná plazma má tedy silné imunomodulační účinky.

## 5. ZÁVĚR

Fenomén imunologické privilegovanosti jako schopnosti varlat tolerovat jak potenciálně autoantigenní zárodečné buňky, tak cizí tkáň transplantované do testikulárního intersticia, je znám už dlouhá léta. Nicméně, mechanismy podílející se na udržování imunologické privilegovanosti ve varlatech nejsou dodnes zcela objasněny. Doposud dostupné informace ukazují, že krevně-testikulární bariéra představuje pasivní mechanismus, jehož prostřednictvím dochází k oddělení většiny post-meiotických zárodečných buněk a tedy i jejich potenciálních autoantigenů od buněk imunitního systému. Vzhledem k důkazům o propustnosti této bariéry byla navržena důležitá role lokálních imunoregulačních faktorů ve varlatech. Z nich můžeme zmínit např. imunosupresivní a protizánětlivé molekuly produkované Sertoliho buňkami a rezidentními makrofágy, dále specifické molekulární mechanismy (jako např. Fas/ Fas systém) indukující apoptózu potenciálně agresivních lymfocytů ve varlatech, stejně tak jako v samčím (a pravděpodobně i v samičím) reprodukčním traktu, a další faktory, jež všechny přispívají ke statusu imunologické privilegovanosti.

Varlata jsou orgány, jejichž základní funkcí je odpovědnost za reprodukci. Z tohoto hlediska složité mechanismy podílející se na imunologické privilegovanosti ve varlatech zřejmě představují hlavní plán samčí gametogeneze, kdy jsou spermie trénovány a selektovány, aby mohly přežít v hostitelském prostředí samčího i samičího reprodukčního traktu.

## 6. SEZNAM LITERATURY

Abbas, A. K. (1996): Die and let live: Eliminating dangerous lymphocytes. *Cell* 84: 655-7

Allison, J., Georgiou, H. M., Strasser, A., Vaux, D.L. (1997): Transgenic expression of CD95 ligand on islet  $\beta$  cells induces a granulocytic infiltration but does not confer immune privilege upon islet allografts. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(8): 3943-47

Bart, J., Groen, H. J., van der Graaf, W. T., Hollema, H., Hendrikse, N. H., Vaalburg, W., Sleijfer, D. T., de Vries, E. G. (2002): An oncological view on the blood-testis barrier. *Lancet Oncol.* 3(6): 357-363

Beer, A. E. and Billingham, R. E. (1976): Antigens of the male reproduction system

Bellgrau, D., Gold, D., Selawry, H., Moore, J., Franzusoff A, Duke, R. C. (1995): A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature* 377(6550): 630-2

Čihák, R. (1988) Anatomie 2, Avicenum

Cserr, H. F., Harling-Berg, C. J., Knopf, P. M. (1992): Drainage of brain extracellular fluid into blood and deep cervical lymph and its immunological significance. *Brain Pathol.* 2(4): 269-76. Review

Dai, Z., Nasr, I. W., Reel, M., Deng, S., Diggs, L., Larsen, Ch. P., Rothstein, D. M., Lakkis, F. G. (2005): Impaired recall of CD8 memory T Cells in immunologically privileged tissue. *Journal of Immunology* 174(3): 1165-70.

D'Alessio A, Riccioli A, Lauretti P, Padula F, Muciaccia B, De Cesaris P, Filippini A, Nagata S, Ziparo E (2001): Testicular FasL is expressed by sperm cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(6): 3316-21.

De Cesaris P, Filippini A, Cervelli C, Riccioli A, Muci S, Starace G, Stefanini M, Ziparo E. (1992): Immunosuppressive molecules produced by Sertoli cells cultured in vitro: biological effects on lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 186(3): 1639-46

De Cesaris, P., Starace, D., Starace, G., Filippini, A., Stefanini, M., Ziparo, E. (1999): Activation of Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase pathway by tumor necrosis factor alpha leads to intercellular adhesion molecule-1 expression. *J Biol Chem.* 274(41): 28978-82.

Denison, F. C., Grant, V. E., Calder, A. A., Kelly, R. W. (1999): Seminal plasma components stimulate interleukin-8 and interleukin-10 release. *Mol Hum Reprod.* 5(3): 220-6

Dym, M., Fawcett, D. W. (1970): The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol Reprod.* 3(3): 308-26.

Emoto, M., Nishikawa, F., Hamuro, A., Oku, D., Kita, E., Kashiba, S. (1991): Biological functions of the water-insoluble fraction of mouse seminal vesicle fluid. I. Suppression of the blastogenic response of lymphocytes. *Int J Androl.* 14(3): 196-208

- Filippini, A., Riccioli, A., Padula, F., Lauretti, P., D'Alessio, A., De Cesaris, P., Gandini, L., Lenzi, A., Ziparo, E. (2001): Control and impairment of immune privilege in the testis and in semen. *Hum. Reprod.Update* 7 (5): 444-9
- Filippini, A., Russo, M. A., Palombi, F., Bertalot, G., De Cesaris, P., Stefanini, M., Ziparo, E. (1989): Modulation of phagocytic activity in cultured Sertoli cells. *Gamete Res.* 23(4): 367-75.
- Gerard, N., Syed, V., Bardin, W., Genetet, N., Jegou, B. (1991): Sertoli cells are the site of interleukin-1 alpha synthesis in rat testis. *Mol Cell Endocrinol.* 82(1): R13-6
- Griffith, T. S., Yu, X., Herndon, J. M., Green, D. R., Ferguson, T. A. (1996): CD-95 induced apoptosis of lymphocytes in an immune privileged site induces immunological tolerance. *Immunity* 5: 7-16
- Head J. R., Billingham R. E. (1985): Immune privilege in the testis. II. Evaluation of potential local factors. *Transplantation* 40(3): 269-75
- Head J. R., Neaves W. B., Billingham R. E. (1983): Immune privilege in the testis. I. Basic parameters of allograft survival. *Transplantation* 36(4): 423-31
- Head, J. R., Neaves, W. B., Billingham, R. E. (1983): Reconsideration of the lymphatic drainage of the rat testis. *Transplantation* 35: 91-96
- Hedger, M. P. (2002): Macrophages and the immune responsiveness of the testis. *Journal of Reproductive Immunology* 57: 19-34
- Hirano, T., Matsuda, T., Turner, M., Miyasaka, N., Buchan, G., Tang, B., Sato, K., Shimizu, M., Maini, R., Feldmann, M., et al. (1988): Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol.* 18(11): 1797-801
- Hořejší, V., Bartůňková J. (2005). *Základy imunologie*. Nakladatelství TRITON, 3. vydání
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. (2001): *Immunobiology: The immune system in health and disease*. 5th ed. Garland Science
- Kelly, R. W., Carr, G. G., Critchley, H. O. (1997): A cytokine switch induced by human seminal plasma: an immune modulation with implications for sexually transmitted disease. *Hum Reprod.* 12(4): 677-81
- Lee, H. M., Oh, B. C., Yang, J. H., Cho, J., Lee, G., Lee, D. S., Hwang, W. S., Lee, J. R. (2006): Age-dependent expression of immune-privilege and proliferation-related molecules on porcine Sertoli cells. *Xenotransplantation* 13(1): 69-74.
- Lee, J., Richburg, J.H., Younkin, S.C., Boekelheide, K. (1997): The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology* 138(5): 2081-8
- Lui, W. Y., Mruk, D., Lee, W. M., Cheby, C. Y. (2002): Sertoli cell tight junction dynamics: their regulation during spermatogenesis. *Biol Reprod.* 68(4): 1087-97

Lysiak, J. J. (2004): The role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 in the mammalian testis and their involvement in testicular torsion and autoimmune orchitis. *Reprod Biol Endocrinol.* 2: 9 Review.

Medawar P. (1948): Immunity to homologous grafted skin. III. The fate of skin homografts transplanted to brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Brit J Exp Path* 29: 58-69

Meng, J., Holdcraft, R. W., Shima, J. E., Griswold, M. D., Braun, R. E. (2005): Androgens regulate the permeability of the blood-testis barrier. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102(46): 16696-700

Nagata, S. (1997): Apoptosis by death factor. *Cell* 88: 355-65

Newell, M. K., Villalobos-Menuy E., Schweitzer, S. C., Harper, M., Camley, R. E. (2006): Cellular metabolism as a basis for immune privilege. *J Immune Based Ther Vaccines.* 4: 1

Pelletier, R. M. (1986): Cyclic formation and decay of the blood-testis barrier in the mink (*Mustela vison*), a seasonal breeder. *Am J Anat.* 175(1): 91-117

Pentikäinen, V., Erkkilä, K., Dukel, L. (1999): Fas regulates germ cell apoptosis in the human testis in vitro. *Am J Physiol.* 276: E310-16

Restifo, N. P. (2000): Not so Fas: Re-evaluating the mechanisms of immune privilege and tumor escape. *Natur Med.* 6(5): 493-95

Riccioli, A., Filippini, A., De Cesaris, P., Barbacci, E., Stefanini, M., Starace, G., Ziparo, E. (1995): Inflammatory mediators increase surface expression of integrin ligands, adhesion to lymphocytes, and secretion of interleukin 6 in mouse Sertoli cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92(13): 5808-12

Rossini, A. A., Greiner, D. L., Mordes, J. P. (1999): Induction of immunologic tolerance for transplantation. *Physiol. Rev.* 79: 99-141

Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P., Nagata, S. (1993): Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75(6): 1169-78

Suescun, M. O., Rival, C., These, M. S., Calandra, R. S., Lustig, L. (2003): Involvement of tumor necrosis factor-alpha in the pathogenesis of autoimmune orchitis in rats. *Biol Reprod.* 68(6): 2114-21

Tanaka, M., Itai, T., Adachi, M., Nagata, S. (1998): Downregulation of Fas ligand by shedding. *Nature Med.* 4(1): 31-36

Tanaka, M., Suda, T., Haze, K., Nakamura, N., Sato, K., Kimura, F., Motoyoshi, K., Mizuki, M., Tagawa, S., Ohga, S., Hatake, K., Drummond, A. H., Nagata, S. (1996): Fas ligand in human serum. *Nature Med* 2(3): 317-22

Tung, K. S., Lu, C. Y.(1989): Immunologic basis of reproductive failure. *Monogr Pathol.* 308-33. Review

Van Voorhis, B. J., Martinez, A., Mayer, K., Anderson, D. J. (1991): Detection of human immunodeficiency virus type 1 in semen from seropositive men using culture and polymerase chain reaction deoxyribonucleic acid amplification techniques. *Fertil Steril.* 55(3): 588-94.

Wyatt, C. R., Law, L., Magnuson, J. A., Griswold, M. D., Magnuson, N. S. (1988): Suppression of lymphocyte proliferation by proteins secreted by cultured Sertoli cells. *J Reprod Immunol.* 14(1): 27-40.

Yule, T. D., Montoya, G. D., Russell, L. D., Williams, T. M., Tung, K. S. (1988): Autoantigenic germ cells exist outside the blood testis barrier. *J Immunol.* 141(4): 1161-7

Yule, T. D., Tung, K. S. (1993): Experimental autoimmune orchitis induced by testis and sperm antigen-specific T cell clones: an important pathogenic cytokine is tumor necrosis factor. *Endocrinology.* 133(3): 1098-107.

Zambruno, G., Giannetti, A. Bertazzoni, U., Girolomoni, G. (1995): Langerhans cell and HIV infection. *Immunol. Today* 16: 520-524

Zur Hausen, H. (1982): Human genital cancer: synergism between two virus infections or synergism between a virus infection and initiating events? *Lancet.* 2(8312): 1370-2.