

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd



Histopatologická analýza reprodukčních orgánů samců potkana po  
krátkodobém podání diethylftalátu

(diplomová práce)

Školitel: Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.

Vedoucí katedry: PharmDr. Petr Jílek, CSc.

Hradec Králové, 2009

Bc. Kristýna Žabová

Děkuji Doc. RNDr. Vladimíru Semeckému, CSc. za odborné vedení a poskytnutí informací a studijních materiálů, jež jsem využila pro sestavení diplomové práce.

Dále bych chtěla poděkovat paní Ing. Müllerové a paní laborantce Jabůrkové za pomoc a trpělivost při zpracování vzorků a zhotovování preparátů.

Prohlašuji, že jsem na této diplomové práci pracovala samostatně, a že jsem použila jen uvedenou literaturu.

..... v Hradci Králové

.....

# OBSAH

Abstrakt.....	6
Abstract.....	8
<b>1. Úvod a cíl diplomové práce .....</b>	<b>10</b>
<b>2. Anatomie testis .....</b>	<b>12</b>
2.1. Testis .....	12
2.2. Vmezeřená tkáň varlete .....	13
2.3. Spermatogeneze .....	13
<b>3. Struktura a funkce Sertoliho buněk, hematotestikulární bariéra.....</b>	<b>15</b>
3.1. Podpůrné Sertoliho buňky .....	15
3.2. Funkce Sertoliho buněk .....	15
3.2.1. Strukturální podpora.....	15
3.2.2. Účast na pohybu zárodečných buněk .....	17
3.2.3. Uvolňování zralých spermií ze Sertoliho buněk .....	17
3.2.4. Fagocytóza .....	18
3.2.5. Sekreční funkce .....	18
3.3. Hematotestikulární bariéra .....	19
3.3.1. Koncept hematotestikulární bariéry.....	19
3.3.2. Funkce hematotestikulární bariéry .....	20
3.3.3. Regulace hematotestikulární bariéry.....	20
3.4. Buněčná spojení přítomná ve varleti .....	21
3.4.1. Těsná spojení .....	21
3.4.2. Ukotvující spojení.....	24
3.4.2.1. Modifikovaná adhesní spojení.....	26
3.4.2.2. Fokální kontakty .....	27
3.4.2.3. Desmozomy .....	27
3.4.2.4. Hemidesmozomy .....	28
3.4.3. Komunikující (mezerové) spojení.....	28
<b>4. Ftaláty .....</b>	<b>30</b>
4.1. Metabolismus ftalátů .....	31
4.2. Expozice ftalátům.....	31
4.3. Toxicita ftalátů .....	32

4.4. Mechanismus působení ftalátů.....	33
4.4.1. Vliv ftalátů na vývoj testis .....	33
4.4.2. Vliv ftalátů na mužskou plodnost.....	34
4.5. Alternativní materiály.....	35
<b>5. Diethylftalát .....</b>	<b>36</b>
5.1. Fyzikální a chemické vlastnosti .....	36
5.2. Expozice diethylftalátu .....	37
5.3. Toxikokinetika a metabolismus diethylftalátu .....	38
5.3.1. Absorpce.....	38
5.3.2. Distribuce .....	38
5.3.3. Metabolismus .....	38
5.3.4. Exkrece .....	38
5.4. Toxicita diethylftalátu.....	39
<b>6. Experiment .....</b>	<b>42</b>
6.1. Použitá zvířata .....	42
6.2. Vlastní experiment .....	42
6.3. Histologické zpracování vzorků skupiny C .....	43
6.3.1. Fixace a zalití do epoxidové pryskyřice.....	43
6.3.2. Barvení polosilných řezů .....	44
6.4. Histologické zpracování vzorků skupiny D .....	44
6.4.1. Fixace a zalití do parafínu .....	45
6.4.2. Barvení hematoxylin – eosin .....	45
6.4.3. Barvení na kolagen – zelený trichrom.....	46
6.5. Roztoky a chemikálie .....	48
<b>7. Výsledky .....</b>	<b>52</b>
7.1. Výsledky histologického hodnocení .....	54
7.1.1. Potkani skupiny C .....	55
7.1.2. Potkani skupiny D .....	55
<b>8. Obrázková příloha .....</b>	<b>56</b>
<b>9. Diskuze .....</b>	<b>60</b>
<b>10. Závěr .....</b>	<b>62</b>
<b>11. Seznam literatury .....</b>	<b>63</b>
<b>12. Seznam zkratk.....</b>	<b>65</b>

# ABSTRAKT

Bc. Kristýna Žabová

Histopatologická analýza reprodukčních orgánů samců potkana po  
krátkodobém podání diethylftalátu

Diplomová práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Studijní obor: Odborný pracovník v laboratorních metodách

## **Cíl práce**

Cílem našeho experimentu bylo prokázat, zda krátkodobé působení diethylftalátu může způsobit změny spermatogeneze samčího pohlavního orgánu.

## **Metody**

Pokus byl proveden na samcích potkana kmene Wistar, kterým byl jednorázově podán diethylftalát. Potkani byli rozděleni do dvou skupin po pěti zvířatech. První skupině, skupině C, byl diethylftalát Oekanal 10 mg aplikován intraperitoneálně, ředěný s 1 ml aqua pro injectione a 1 ml 100% ethanolu. Skupině C bylo podáno 0,4 ml této směsi. Druhé skupině, skupině D, byl podán diethylftalát Pestanal 1 g subkutánně v množství 0,2 ml. Po 12 – ti dnech byla zvířata usmrcena a byly jim odebrány orgány, ze kterých jsme zhotovili histologické preparáty. Preparáty jsme následně vyhodnocovali pod světelným mikroskopem.

## **Výsledky**

Odebrané orgány z pokusných zvířat měly fyziologickou stavbu i velikost. V histologických preparátech, zkoumaných pod světelným mikroskopem, byly v parenchymu jater nalezeny rozdílné velikosti jader Kupferových buněk a překrvené sinusoidy. V preparátech ledvin jsme pozorovali nápadné překrvení

glomerulů. Preparáty varlat potvrdily výsledky z předchozí studie, tedy že spermatogeneze porušena nebyla.

### **Závěry**

Výsledky v obou skupinách prokázaly, že v příslušných koncentracích neměl diethylftalát žádný vliv na spermatogenezi. V několika preparátech varlat skupiny D jsme našli infiltraci zánětlivými buňkami, jejichž přítomnost ovšem nemůže být s jistotou přisouzena působení diethylftalátu.

# ABSTRACT

Bc. Kristýna Žabová

Histopathological analysis of rat male reproductive organs after short – term application of diethyl phthalate

Diploma work

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Study programme: Special worker in laboratory methods

## **Background**

The aim of our experiment was extend, if diethyl phthalate can cause changes in spermatogenesis of rat male reproductive organs after short – term application.

## **Methods**

The experiment was effected on Wistar rat males, by which was handed up diethyl phthalate by a single application. Rats were separated into two groups after five animals. To first group, group C, was intraperitoneally applied diethyl phthalate Oekanal 10 mg diluted with 1 ml aqua pro injectione and 1 ml 100% ethanol. Group C was handed up 0,4 ml of this mixture. To second group, group D, was handed up diethyl phthalate Pestanal 1g by subcutaneous injection in the amount of 0,2 ml. After 12 days were animals euthanized and their organs were sampled. Their size and weight approached physiological parameters. From the organs were made the histological preparations, which were evaluated by the light microscopy.

## **Results**

In hepatic parenchyma were found different sizes of Kupfer's cells cores and congested sinusoids. In the preparation of kidneys we observed prominent congestion in glomerular capillaries. The results from preparations of testicles showed that the spermatogenesis was not affected



## **Conclusions**

Results in both groups proved, that diethyl phthalate had no influence on spermatogenesis in a related concentrations.

# 1. ÚVOD A CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

V této diplomové práci jsme se zabývali estery 1,2-benzendikarboxylové kyseliny, přesněji jejím diethyl esterem. Cílem bylo prokázat toxické poškození samčích reprodukčních orgánů potkana po jednorázovém podání diethylftalátu.

Diethylftalát je synteticky vyráběná látka s širokým spektrem použití, od výroby parfémů, přes koupelové přípravky, změkčování polyvinylchloridu, až po výrobu pesticidů. Spolu s ostatními estery kyseliny ftalové je zařazen na seznam toxických látek ohrožujících lidskou reprodukci.

V experimentální části této diplomové práce jsme zkoušeli účinky dvou pesticidů obsahujících diethylftalát. Jednalo se o výrobky společnosti Sigma-Aldrich, prodávané pod komerčními názvy Oekanal a Pestanal. Tyto látky jsme testovali na potkanech kmene Wistar, kterým jsme látky podali jednorázově intraperitoneálně a subkutánně.

Experiment byl vyhodnocen pomocí histologických preparátů z odebraných orgánů a tkání. Posuzoval se vliv diethylftalátu na morfologický obraz varlete potkana a další odebrané orgány. Výsledky jsme srovnali s výsledky pilotního experimentu na toto téma, u kterého byl diethylftalát podáván gastrickou sondou.

## TEORETICKÁ ČÁST

## 2. ANATOMIE TESTIS

### 2.1. Testis

Varle je párový orgán a mužská pohlavní žláza. Má tvar elipsoidu, ze stran je mírně zploštělé a je uloženo ve skrotu. K jeho zadní straně přiléhá protáhlé nadvarle. Rozměry varlete jsou přibližně:

- kraniokaudálně 4 - 5 cm
- předozadně 3 - 3,5 cm
- napříč 2,5 cm

Hmotnost varlete se pohybuje v rozmezí 18-25 g. Levé bývá větší a těžší a položeno asi o 1 cm níže než pravé. Varle je tuhé, pružné, citlivé na tlak a má hladký povrch. <sup>1</sup>

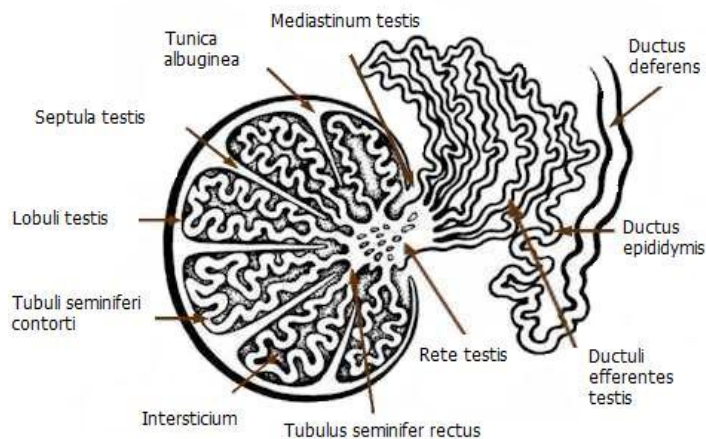
Většinu povrchu varlete a část nadvarlete kryje lesklý povlak – epiorchium, neboli *lamina visceralis*. Pod ní leží **tunica albuginea**, tuhá vazivová membrána, která tvoří vlastní povrch varlete. Na povrchu je bílá a její hlubší vrstvu tvoří cévnatá, a proto načervenalá, **tunica vasculosa**.

Na sagitálním řezu vidíme **septula testis** – vazivové přepážky, které se od stěn vějířovitě sbíhají na zadní okraj a rozdělují tkáň varlete na **lobuli testis**. Lobuli testis tvoří 200 - 300 lalůček kuželovitého tvaru, obrácené hrotem dozadu, kde se nachází **hilus varlete** (místo vstupu a výstupu cév a výstupu vývodných kanálků, na zadním okraji varlete). Ve svém parenchymu obsahují **tubuli seminiferi contorti** – mnohočetné stočené kanálky, kterých je více na bázi lalůčku a ke hrotu lalůčku se sbíhají v **tubulus seminifer rectus**, který pak přechází do sítě kanálků, kterou začínají odvodné cesty varlete.

Stočený kanálek je obklopen vrstvičkou vaziva, pod kterou je lamina basalis, na níž nasedá zárodečný (semenotvorný) epitel. Epitel se skládá z dvojích buněk:

- spermatogenní buňky
- podpůrné Sertoliho buňky

Ve stěně stočených kanálků probíhá spermatogeneze – proces dozrávání a tvarové přeměny nediferencovaných zárodečných buněk ve výsledné, tvarově a funkčně diferencované mužské pohlavní buňky schopné oplození, spermie. <sup>1</sup>



Obr. 1: Anatomie testis <sup>2</sup>

## 2.2. Vmezeřená tkáň varlete

Vmezeřená tkáň varlete vyplňuje prostory mezi kanálky a sestává z řídkého fibrilárního vaziva, bohatého na fibroblasty, žírné buňky a makrofágy. Ve vazivu se nacházejí nervy, krevní a lymfatické cévy. Kapiláry jsou fenestrované, dochází proto k průchodu krevních bílkovin stěnou. Za embryonálního vývoje, v pubertě a po ní se v intersticiu uplatňují Leydigovy buňky – nepravidelné buňky ovoidního tvaru, které představují přibližně 20% buněčné populace ve varleti. Obsahují enzymy, které syntetizují hormony – androgeny (hl. testosteron). <sup>1</sup>

## 2.3. Spermatogeneze

Spermatogeneze je složitý proces tvorby a vývoje mužských pohlavních buněk závislý na dostatečné stimulaci pohlavními hormony, zejména testosteronem. Na počátku vývoje jsou spermatogonie, primitivní zárodečné buňky nasedající na bazální membránu semenotvorných kanálků, které se mitoticky dělí v primární spermatocyty. Primární spermatocyty podstupují meiotické dělení, čímž se v nich redukuje počet chromozomů a vznikají tak sekundární spermatocyty, které následně projdou druhým meiotickým dělením,

jehož produktem jsou spermatidy. Spermatidy obsahují haploidní počet chromozomů (23) a dále zrají ve spermatozoa (spermie) v hlubokých záhybech cytoplazmy Sertoliho buněk.

Zralá spermatozoa jsou uvolňována ze Sertoliho buněk a stávají se volnými v lumen kanálků. Spermatozoa opouštějí varlata ne plně pohyblivá. Jejich zrání a získání pohyblivosti pokračuje během průchodu nadvarletem. Jsou důkazy o tom, že pohyblivost spermií je zlepšována relaxinem, který je pravděpodobně produkován prostatou.<sup>3</sup>

## 3. STRUKTURA A FUNKCE SERTOLIOH BUNĚK, HEMATOTESTIKULÁRNÍ BARIÉRA

### 3.1. Podpůrné Sertolihovy buňky

Sertolihovy buňky jsou vysoké, štíhlé buňky s jádrem při bázi a na luminální ploše mají rozvětvené plazmatické výběžky. Tvoří ochranné a výživu zajišťující prostředí a v jejich výklencích a záhybech probíhá spermatogeneze. Boční okraje Sertolihových buněk jsou spojené mezibuněčnými junkcemi, takže tyto buňky tvoří souvislou výstelku kanálků varlete. Mezi lamina basalis a Sertolihovými buňkami jsou uloženy spermatogonie.

V procesu spermatogeneze postupují vývojová stadia pohlavních buněk mezi Sertolihovými buňkami, hluboce zanořeny do jejich výběžků, až se spermatidy usadí v záhybech luminálních výběžků a zde se mění ve spermie. Propojení Sertolihových buněk je považováno za cestu iontových a chemických vlivů při koordinaci cyklu spermatogeneze. Sertolihovy buňky se v dospělosti u člověka nemnoží, jsou však odolné vůči noxám všeho druhu. <sup>1</sup>

### 3.2. Funkce Sertolihových buněk

Funkce Sertolihových buněk zahrnují: strukturální podporu; vytvoření neprostupné a imunologické bariéry; účast na pohybu zárodečných buněk a uvolňování zralých spermií; výživu zárodečných buněk díky produktům, které secernují a další.

#### 3.2.1. Strukturální podpora

Sertolihovy buňky poskytují podporu pro vyvíjející se zárodečné buňky uvnitř semenotvorného epitelu. Jejich význačným rysem je dobře propracovaná buněčná kostra, která je zodpovědná za uspořádání semenotvorného epitelu. Morfologické studie kázaly, že buněčná kostra Sertolihových buněk má tyto funkce:

- udržuje tvar
- zajišťuje polohu a transport organel uvnitř buňky

- vytváří a stabilizuje buněčnou membránu v místech kontaktu dvou buněk a buňky s extracelulární matrix
- zajišťuje polohu, ukotvení a pomoc při pohybu vyvíjejících se zárodečných buněk
- účastní se uvolňování zralých spermií ze semenotvorného epitelu

Cytoskelet Sertoliho buňky se skládá ze tří hlavních komponent, tedy aktin, intermediární filamenta a mikrotubuly. Tyto součásti hrají důležitou roli v usnadnění pohybu zárodečných buněk. <sup>4</sup>

#### **a) Aktin**

Aktinová vlákna jsou složena z aktinových monomerů o molekulové hmotnosti 42 kDa, z nichž každý polymeruje do lineárního řetězce šroubovitého tvaru, širokého přibližně 8 nm. V tkáních savců se vyskytuje v šesti různých izoformách. V Sertoliho buňce hraje aktin neobyčejně důležitou roli v udržení struktury a kontraktility buňky. Nalézáme zde dva soubory aktinu, totiž monomerní G-aktin a polymerní F-aktin, které spolu koexistují. Aktinová vlákna jsou také hlavní složkou ektoplazmatické specializace a tubulobulbárního komplexu. <sup>4</sup>

#### **b) Intermediární filamenta**

Intermediární filamenta jsou lokalizovaná v místech spojení dvou buněk a buňky s extracelulární matrix, kde spolupracují s dvěma druhy kotvicích juncí - *desmosomy* a *hemidesmosomy*. Ve varleti byla prokázána přítomnost několika druhů intermediárních filament, která se účastní juncí mezi Sertoliho buňkami a Sertoliho buňkou-spermií. Ačkoliv není přesně známa jejich úloha, rozložení naznačuje, že se podílejí na integritě semenotvorného epitelu. <sup>4</sup>

#### **c) Mikrotubuly**

Mikrotubuly jsou složeny z tubulinu. Doposud bylo identifikováno nejméně šest druhů tubulinu:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\zeta$ . Nejvýznamnější stavební



součástí mikrotubulů jsou ale tubulin  $\alpha$  a  $\beta$ . Funkce mikrotubulů je poměrně dobře prostudovaná. Podílejí se na:

- udržení sloupcovitého tvaru buňky
- uložení a transportu intracelulárních organel
- přemísťování spermatocytů uvnitř semenotvorného epitelu
- přizpůsobují tvar buněčné membrány Sertoliho buněk na nepravidelné hlavičky spermií během spermatogeneze

Mikrotubuly jsou také nalézány v místě ektoplazmatické specializace.<sup>4</sup>

### **3.2.2. Účast na pohybu zárodečných buněk**

Sertoliho buňky jsou přímo zapojeny do pohybu vyvíjejících se zárodečných buněk, protože tyto buňky postrádají vlastnosti migrujících buněk, jako jsou např. fibroblasty. Studie prokázaly, že přemísťování buněk přes semenotvorný epitel je velkou měrou zajištěno ektoplazmatickou specializací. Bylo dokázáno, že mikrotubuly, společně s několika proteiny typu dynein, myosinem VIIa, ATPázami a GTPázami přítomnými v místě ektoplazmatické specializace, pomáhají v migraci buněk přes semenotvorný epitel. Nicméně mnoho otázek ještě zůstává nezodpovězených.

Sertoliho buňky také pomáhají při přemísťování čerstvých meiotických spermatocytů z bazálního do adluminalního kompartmentu v semenotvorném epitelu. Zdá se, že tento děj probíhá bez porušení bariéry postupným zprůchodňováním těsných spojení nad zárodečnými buňkami a následnou tvorbou nových těsných spojení pod nimi.<sup>3,4</sup>

### **3.2.3. Uvolňování zralých spermií ze Sertoliho buněk**

Sertoliho buňky jsou nezbytně nutné k uvolňování zralých spermií ze semenotvorného epitelu. Tento proces zahrnuje kaskádu dějů, z nichž některé zahrnují:

- opouzdření hlavičky spermie cytoplazmatickými procesy Sertoliho buněk
- uvolnění hlaviček spermií
- vypuzení spermií z výklenků Sertoliho buněk

### **3.2.4. Fagocytóza**

Po uvolnění zralých spermií z výklenků Sertoliho buněk pohltí Sertoliho buňky zbytky, které byly uvolněny z poškozených či degenerovaných spermií. V tomto ohledu mají Sertoliho buňky funkci makrofágů, udržujících integritu semenotvorného epitelu. <sup>4</sup>

### **3.2.5. Sekreční funkce**

Sertoliho buňky jsou sekreční buňky. Přibližně 15% z jejich celkové produkce proteinů tvoří glykoproteiny. Produkují androgen-vázací protein (ABP), inhibin a Müllerovu inhibiční substanci (MIS). Nesyntetizují androgeny, ale obsahují aromatázu, enzym odpovědný za přeměnu androgenů na estrogeny, a mohou tak estrogeny produkovat. ABP pravděpodobně udržuje vysoké a trvalé zásobené tubulární tekutiny androgeny. Inhibin snižuje sekreci folikuly stimulujícího hormonu (FSH). MIS vyvolává u samčích fétů regresi Müllerových vývodů (embryonální párová struktura, která dává základ vývodným částem ženského pohlavního ústrojí).

Zbylé proteiny zahrnují: proteázy, inhibitory proteáz, hormony, energeticky bohaté látky, růstové faktory apod. <sup>3,4</sup>

#### **a) Proteázy a inhibitory proteáz**

Sertoliho buňky syntetizují a vylučují proteázy a inhibitory proteáz, které se účastní téměř všech buněčných procesů, zahrnujících tkáňovou podporu, růst a vývoj. Proteázy a jejich inhibitory jsou také zapletené do pohybu zárodečných buněk. Například: katepsin-L hraje roli v uvolňování zralých spermií.

#### **b) Růstové, autokrinní a parakrinní faktory**

Růstové, autokrinní a parakrinní faktory jsou sekreční molekuly schopné vázat se k povrchovým receptorům a navodit tak kaskádu dějů, které ovlivní buněčný růst, diferenciaci a funkci. Ve varlatech mají tyto faktory zásadní roli v podpoře spermatogeneze a pohybu zárodečných buněk.

### **c) Složky extracelulární matrix**

Je známé, že extracelulární matrix hraje důležitou roli v buněčném pohybu, nicméně její účast na pohybu zárodečných buněk je méně jasná. Ve varleti je extracelulární matrix v okolí lamina basalis semenotvorného kanálku spojena hlavně se Sertoliho buňkami a buňkami zárodečnými. Extracelulární matrix je z velké části tvořena lamininem, kolagenem typu IV, heparan sulfátem a entaktinem.

Sertoliho buňky produkují komponenty matrix, jako kolagen a laminin, které přispívají k strukturální integritě semenotvorného epitelu. Peritubulární myoidní buňky (v lamina basalis) pak produkují fibronektin. Studie prokázaly, že laminin je velmi důležitý v udržení integrity těsných junkcí Sertoliho buněk a tím pádem hematotestikulární bariéry. <sup>4</sup>

### **3.3. Hematotestikulární bariéra**

Hematotestikulární bariéra je představována těsnými junkcemi Sertoliho buněk lokalizovaných v první třetině semenotvorného epitelu. Rozděluje ho tak na dva základní kompartmenty:

- *bazální kompartment* (spermatogonie až primární spermatocyty)
- *adluminální kompartment* (sekundární spermatocyty až spermie)

#### **3.3.1. Koncept hematotestikulární bariéry**

První návrh, jak hematotestikulární bariéra vypadá, byl vyvinut již 70. letech 20. století a byl založen na dvou důležitých nálezech. Nejprve byly nalezeny velké rozdíly ve složení tekutiny z rete testis/lumen tubuli seminiferi contorti a krevní plazmy. Například se ukázalo, že tekutina odebraná z rete testis obsahovala více draslíku a chloridů než krevní plazma. A za druhé se našly změny v rychlosti, kterou radioaktivní indikátory či barviva mohla projít z krevní plazmy do testikulární tekutiny. Ačkoliv z těchto výsledků vyplývalo, že bariéra existuje, konkrétní důkaz z větší části chyběl až do 80. let, kdy se studiem morfologie a buněčnou biologii bariéra potvrdila. <sup>4</sup>

Dnes se už ví, že tekutina uvnitř semenotvorných kanálků obsahuje velmi málo bílkovin a glukosy, ale je bohatá na androgeny, estrogy, draslík,

inositol a kyseliny glutámovou a asparágovou. Udržení jejího složení závisí právě na bariéře. <sup>3</sup>

### 3.3.2. Funkce hematotestikulární bariéry

Hematotestikulární bariéry se připisují tři hlavní funkce:

- vytváří specializované prostředí
- řídí průchod molekul
- slouží jako imunologická bariéra

Hematotestikulární bariéra přímo vytváří komplexní strukturální uspořádání varlete, a to vytvořením specializovaného prostředí pro vývoj zárodečných buněk a jejich pohyb. Sertoliho buňky jako takové jsou povinny syntetizovat, secernovat a efektivně dodávat své produkty, které jsou nezbytné pro růst a diferenciaci vyvíjejících se zárodečných buněk. <sup>4</sup>

Těsná spojení mezi přilehlými Sertoliho buňkami blízko bazální membrány tvoří bariéru mezi krví a varletem. Ta brání nadměrnému průniku velkých molekul z intersticiální tkáně a z části tubulů blízko bazální membrány (bazální kompartment) do oblasti blízko tubulárního lumen (adluminální kompartment) a do vlastního lumen. Steroidy však pronikají touto bariérou snadno a je prokázáno, že některé proteiny pronikají ze Sertoliho buněk do Leydigových a naopak parakrinním způsobem.

Bariéra také chrání zárodečné buňky před působením toxických látek v krvi a brání antigenním produktům dělení zárodečných buněk vstupovat do cirkulace a vyvolávat autoimunitní odpověď. Bariéra též pomáhá vytvářet osmotický gradient, který podporuje pohyb tekutiny do tubulárního lumen. <sup>3</sup>

### 3.3.3. Regulace hematotestikulární bariéry

Hematotestikulární bariéra je jednou z nejtěsnějších bariér v těle savců. Je srovnatelná s hematoencefalickou bariérou a těsnými junkcemi v endotelu cév a epidermis. Nicméně hematotestikulární bariéra je odlišná v tom, že se musí pravidelně otvírat, aby mohlo dojít k průchodu jednotlivých vývojových stádií během spermatogeneze. Faktory, které řídí utváření a udržení hematotestikulární bariéry jsou stále neznámé. Nedostatek informací o

hematotestikulární bariéry pochází velkou měrou z nedostatku vhodných *in vitro* a *in vivo* modelů, které by mohly být použity ke studiu těsných juncí Sertoliho buněk. <sup>4</sup>

### 3.4. Buněčná spojení přítomná ve varleti

Speciální spojení se nachází mezi buňkami nebo mezi buňkou a buněčnou matrix ve všech tkáních. Představují způsob komunikace mezi buňkami a jejich okolím. Zjistilo se, že jsou v epitelu přítomny tři typy morfologicky a funkčně odlišných spojení:

a) Těsná spojení (tight junction – zonula occludens)

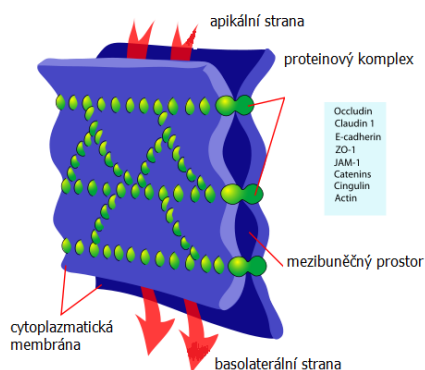
b) Ukotvující spojení, sestávající ze 4 typů:

- Adhezní spojení (zonula adherens)
- Fokální adheze
- Desmozomy (macula adherens)
- Hemidesmozomy

c) Komunikující spojení (gap junction)

#### 3.4.1. Těsná spojení

Příkladem mohou být těsná/úplná spojení (tight junctions). Ve varleti jsou tight junctions místem těsného kontaktu mezi plazmatickými membránami sousedících buněk. Jsou nejčastěji tvořeny 50-100 fibrilami. Ačkoliv není biochemické složení těchto fibril zcela objasněno, hypotézou je, že je v každém vlákně zastoupen occludin a claudin, které utěsňují paracelulární prostor. <sup>4</sup>



Obr. 2: Schematické znázornění těsného spojení <sup>5</sup>

## a) Funkce těsných spojení

Tight junctions mají dvě základní funkce:

- vytváří bariéru
- formují hranici rozdělující semenotvorný epitel na dva kompartmenty

Tight junctions tvoří nepropustnou bariéru, která omezuje průchod molekul. Nicméně průchod molekul závisí hlavně na jejich molekulové hmotnosti a chemické povaze.

Tight junctions dále tvoří hranici, rozdělující Sertoliho buňky do bazálního a adluminalního kompartmentu, které se od sebe odlišují. Tímto mechanismem v podstatě dochází k zabránění smísení sekrečních produktů Sertoliho buněk určených pro různá vývojová stádia zárodečných buněk.

## b) Proteiny těsných spojení

S membránou asociovaná guanylát kináza (MAGUK) je protein složený z několika jednotek, a to: zo-1, zo-2 a zo-3.

Jsou známy tím, že:

- regulují buněčnou proliferaci a diferenciaci
- kontrolují uspořádání membrány
- řídí signální transdukci
- regulují polaritu buňky.

### *i. ZO-1*

ZO-1 je periferní membránový protein o molekulové hmotnosti 210 - 225 kDa, který je spojován s těsnými juncemi v epiteliálních a endoteliálních buňkách. Vědci se domnívají, že jeho funkce jsou především stavební a signalizační (regulace transkripce). Je znám pro jeho přímé spojení/interakci s C-koncem occludinu. Je také asociován s aktinem a cateninem v epiteliálních a nonepiteliálních buňkách, což dokazuje, že ZO-1 může spolupracovat s adherentními spojeními. Ve varleti je ZO-1 lokalizován výhradně v Sertoliho těsných juncích a v místě hematotestikulární bariéry.

Studie prokázaly, že ZO-1 má dvě odlišné izoformy ZO-1<sup>+</sup> a ZO-1<sup>-</sup>, které jsou výsledkem alternativního sestřihu mRNA. Tyto dvě izoformy hrají různé role v kompletování, údržbě a regulaci těsných spojení.

#### *ii. ZO-2*

ZO-2 je protein o molekulové hmotnosti 160 kDa přítomný ve varleti. *In vitro* a *in vivo* studie demonstrovaly, že ZO-2 váže occludin a claudin.

#### *iii. ZO-3*

ZO-3 byl identifikován jako 130 kDa velký polypeptid a pojmenován p130. Následně byl přejmenován na ZO-3, když byla nalezená vysoká homologie s oběma ZO-1 a ZO-2. Imunofluorescencí a elektronovou mikroskopií se prokázala přítomnost ZO-3 v místě těsných juncí spolu se ZO-1. Dále byly nalezeny interakce s occludinem, claudinem a aktinem asociovaných v těsných spojeních, ale žádná interakce s ZO-2.

#### *iv. Occludin*

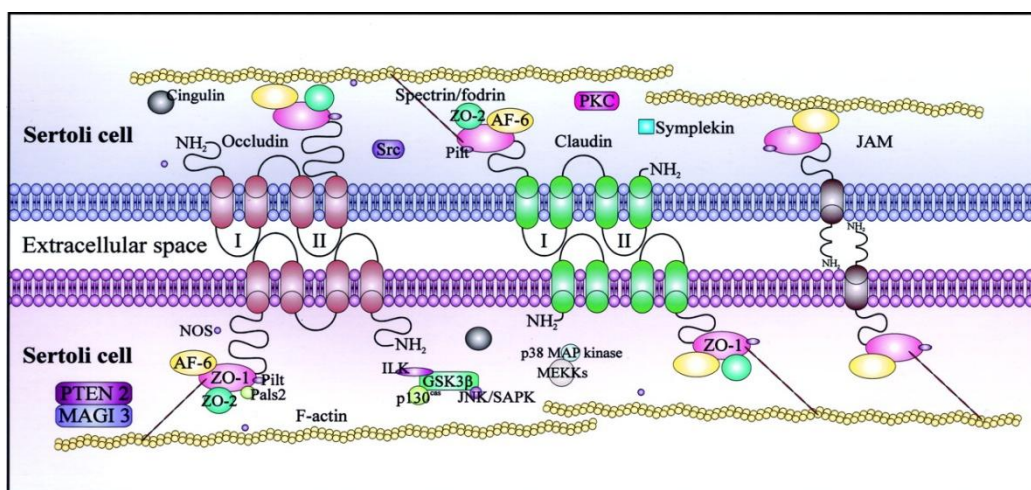
Doposud nejlépe prostudovaný transmembránový protein těsných juncí. Jeho molekulová hmotnost je 60 - 65 kDa a obsahuje čtyři transmembránové domény - dvě extracelulární smyčky a jednu intracelulární. První extracelulární smyčka occludinu je z 60% tvořena tyrosinovými a glycinovými zbytky, které se účastní buněčné adheze.

#### *v. Claudiny*

Claudinová rodina transmembránových proteinů těsných juncí má molekulovou hmotnost od 20 do 24 kDa a sestává přinejmenším z 24 členů. Claudiny jsou jedním z hlavních stavebních prvků těsných spojení. Ve varleti nacházíme sedm různých claudinů: claudin 1, 3, 4, 5, 7, 8 a 11. Claudin 11, jediný studovaný claudin v testis, je omezen na Sertoliho buňku v místě hematotestikulární bariéry.

## vi. JAMs

JAM, člen nedávno popsané rodiny Ig, byl nalezený v místě těsného spojení epitelálních a endotelálních buněk. Jde o integrální membránové proteiny nalézané i v testis. Bohužel není zcela jasné, zda je JAM skutečnou komponentou těsného spojení. K dnešnímu dni byly identifikovány JAM 1, JAM 2 a JAM 3. Exprese JAM 1 a 2 ve varleti byla demonstrována Northern blotem. Studia ukázala, že JAM bývá lokalizován spolu s occludinem a zo-1. Výsledky studií této rodiny prokazují, že JAM mají úlohu v pohybu buněk semenotvorným epitelem, ale není jednoznačně dokázáno, zda pohyb vyvíjejících se zárodečných buněk usnadňují či zpomalují.<sup>4</sup>



Obr. 3: Schematický náčrt demonstrující molekulární struktury tří multiproteinových komplexů, které se nachází v Sertoliho těsném buněčném spojení, představující hematotestikulární bariéru. Těsné spojení představují komplexy: 1) occludin-zo-1/zo-2; 2) claudin-zo-1/zo-2 a 3) JAM-zo-1.<sup>4</sup>

### 3.4.2. Ukotvující spojení

Existují čtyři typy ukotvujících spojení:

- adhesní spojení (zonula adherens)
- fokální adheze
- desmozomy (macula adherens)
- hemidesmozomy



Každý z těchto typů je strukturálně i biochemicky odlišný. Hlavním rozdílem mezi nimi může být, že adhesní spojení a fokální adheze využívají k připojení aktinová vlákna, zatímco desmozomy a hemidesmozomy intermediární filamenta. Ve varlatech jsou modifikována dvě adhesní spojení, jmenovitě ektoplazmatické specializace a tubulobulbární komplexy.

#### **a) Funkce ukotvujících spojení**

Ačkoliv se od sebe jednotlivá ukotvující spojení liší, mají jednu hlavní funkci shodnou. Spojují vnitřní buněčný prostor nebo cytoskelet k jiné buňce nebo extracelulární matrix, a to vytvořením sítě, která udržuje tkáňovou integritu.

#### **b) Proteiny ukotvujících spojení**

Byly nalezeny čtyři funkční jednotky na aktinu založených buněčných adhezí:

- cadherin-catenin
- nectin-afadin-ponsin
- integrin-laminin
- vezatin-myosin

Pouze cadherin-catenin a integrin-laminin byly pozitivně identifikovány ve varleti.

##### *i. Cadherin-catenin*

Cadheriny, nejlépe prostudované proteiny adhesních junkcí, jsou transmembránové proteiny s molekulovou hmotností od 115 do 140 kDa. Jsou známy tím, že regulují buněčnou strukturu, morfologii a funkci. Doposud bylo identifikováno více než šest tuctů cadherinů. Většina z nich jsou glykoproteiny a bývají složeny z několika domén: dvě domény cytoplazmatické, jedna doména transmembránová a pět domén vázajících kalcium (bez přítomnosti kalcia jsou cadheriny inaktivní a náchylné k proteolýze). Funkce cadherinu závisí na navázané cytoplazmatické doméně, a to buď  $\beta$ - nebo  $\gamma$ -catenin.  $\gamma$ -catenin, blízký příbuzný  $\beta$ -catenin, je také znám jako plakoglobin.  $\beta$ -catenin se může

chovat jako transkripční kofaktor. Komplex cadherin-catenin je nepřímo spojen k aktinu cytoskeletu přes  $\alpha$ -catenin.

#### *ii. Integrin-laminin*

Integriny jsou známy jako molekuly buněčné adheze mezi buňkami a extracelulární matrix a interagující s kolageny a lamininy v extracelulární matrix v místě fokální adheze a hemidesmozomů. <sup>4</sup>

### **3.4.2.1. Modifikovaná adhesní spojení**

#### **a) Ektoplazmatické specializace**

Ektoplazmatické specializace (ES) jsou modifikovaným typem adhesní junkce nalézané pouze v testis.<sup>4</sup> Vyskytují se v submembránových oblastech a v podstatě přiléhají na tight junctions (hematotestikulární bariéru) a k místům adheze vyvíjejících se buněk během spermatogeneze. Ektoplazmatické specializace se skládají ze svazků aktinových filament vložených mezi plazmatickou membránu a cisterny endoplazmatického retikula. Vlákna uvnitř každého svazku jsou organizována do pravidelných hexagonálních seskupení a mají unipolární orientaci. Ektoplazmatické specializace nalézáme na bázi buněk přiléhajících k hematotestikulární bariéře – *bazální ES* - a ve vrcholu buňky asociované se spermií – *apikální ES*.<sup>17, 18</sup>

Jsou důležité pro uvolnění zralých spermií, přemísťování spermatid a možná i pro stabilizaci dalších typů junkcí přítomných mezi Sertoliho buňkami a Sertoliho-zárodečnou buňkou, jako tight junctions nebo desmozomy. Ektoplazmatické specializace v podstatě zabraňují předčasnému uvolnění spermií do lumen tubulu.

Ektoplazmatické specializace mezi Sertoliho a zárodečnými buňkami se neustále během spermatogeneze mění, kvůli nepřetržitému pohybu zárodečných buněk semenotvorným epitelem. Proteiny spojované s ektoplazmatickou specializací jsou:  $\alpha 6\beta 1$ -integrin,  $\alpha 4\beta 1$ -integrin, aktin, actinin, myosin VIIa, fimbrin, espin, vinculin, paxilin, gelsolin, testin apod. <sup>4</sup>

### **b) Tubulobulbární komplexy**

Další specifickou strukturou ve varleti, která je upraveným typem adhesní junkce, jsou tubulobulbární komplexy (TK) nalezené mezi Sertoliho buňkami na úrovni těsných junkcí a mezi Sertoliho buňkami a spermii připravenými k uvolnění do lumen tubulu. Tento komplex existuje jako dvojice tubulárních struktur obklopených aktinem. Vyskytuje se opět jako *bazální a apikální TK*.

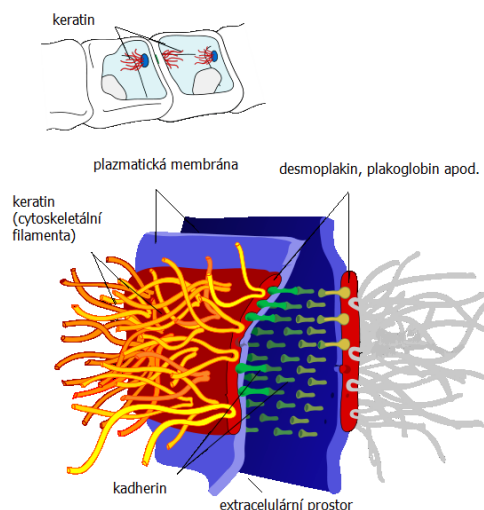
Funkce tubulobulbárního komplexu není zcela známa, ačkoliv je navrženo několik možností. Jednou z možností je, že jsou jakýmsi kotvicím zařízením mezi Sertoliho buňkou a spermii, které zabraňuje předčasnému uvolnění spermií do lumen kanálku. Další možností je, že jsou součástí mechanismu, kterým jsou mezibuněčná spojení, zvláště pak ektoplazmatické specializace, demontovány během spermatogeneze. Po uvolnění je tubulobulbární komplex rychle pohlcen Sertoliho buňkou a uvnitř ní degradován lysozomy.<sup>4, 21</sup>

#### **3.4.2.2. Fokální kontakty**

Fokální kontakty, také známy jako fokální adheze, jsou na aktinu založené adherentní junkce mezi buňkou a extracelulární matrix. Fokální adheze, z velké míry tvořené integriny, spojují buněčná aktinová vlákna s extracelulární matrix. Jsou to dynamické struktury regulující buněčný pohyb a nalézáme je prakticky ve všech epitelech.<sup>4</sup>

#### **3.4.2.3. Desmozomy**

Desmozomy jsou druhem ukotvujících junkcí mezi buňkami, které k připojení využívají intermediárních filament. Nejrozsáhleji byly zkoumány v epidermis, kde mají důležité funkce v udržování tkáňové integrity. Ačkoliv je přítomnost tohoto typu spojení ve varleti známá, jeho biochemická struktura není dosud prozkoumaná.<sup>4</sup>

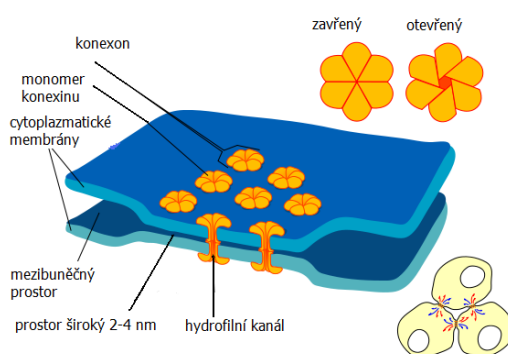


Obr. 4: Schematické znázornění desmozomu <sup>6</sup>

#### 3.4.2.4. Hemidesmozomy

Hemidesmozomy se od desmozomů liší strukturálně i funkčně. Spojují cytoskelet buňky s bazální membránou. Jsou v podstatě obdobou fokálních adhezí, až na to, že jsou s cytoskeletem spojeny přes intermediární filamenta, ne aktin. <sup>4</sup>

#### 3.4.3. Komunikující (mezerové) spojení



Obr. 5: Schematické znázornění mezerového spojení <sup>7</sup>

##### a) Funkce mezerových spojení (gap junction)

Gap junction je prostředek, kterým jsou ionty a malé molekuly vyměňovány mezi dvěma sousedními buňkami. Jsou to mezibuněčné kanály tvořeny nekovalentní interakcí dvou hemikanálů - konexonů. Každý

konexon je složen ze šesti podjednotek, tzv. konexinů. Protože gap junction zprostředkovává signály mezi Sertoliho a zárodečnými buňkami, mají rozhodující úlohu v koordinačních událostech souvisejících s pohybem zárodečných buněk semenotvorným epitelem.

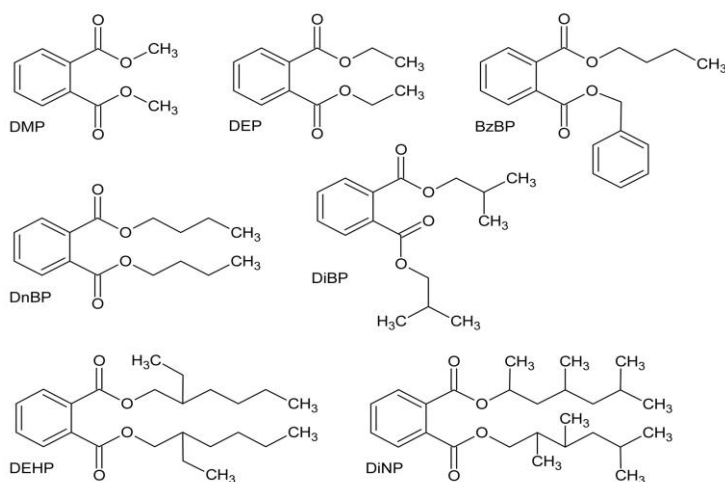
#### **b) Proteiny gap junction**

Gap junction je spojen z proteinů konexinů. Každý konexin prochází plazmatickou membránou čtyřikrát. Morfologický důkaz pro přítomnost gap junction mezi Sertoliho buňkami je znám od 70. let. <sup>4</sup>

## 4. FTALÁTY

Ftaláty jsou skupinou průmyslových látek. Jedná se nejčastěji o dialkyl nebo alkyl-aryl estery 1,2 - benzendikarboxylové kyseliny. Od 30. let 20. století jsou používány pro různé účely, včetně výroby prostředků osobní hygieny (parfémů, kosmetiky, mycích prostředků). Dále jsou součástí barev, průmyslových umělých hmot, podlahových materiálů, nepromokavých oděvů, dětských hraček, potravinových obalů, vaků krevních konzerv, plastických lékařských pomůcek a některých léčiv.<sup>8, 9, 10</sup>

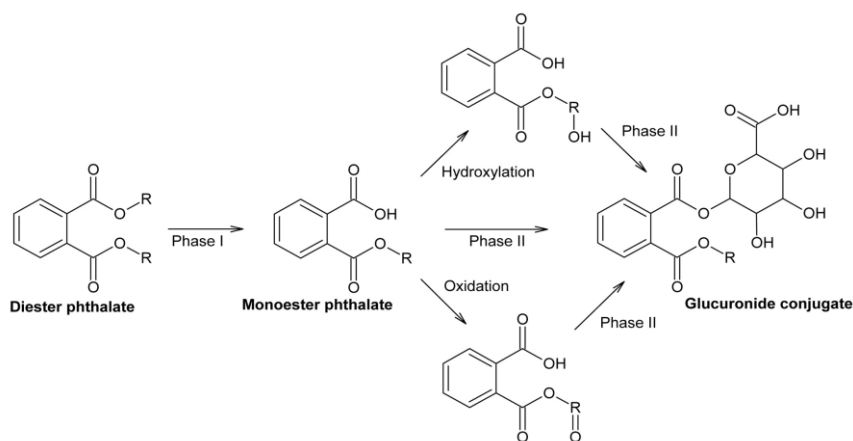
Fyzikální vlastnosti závisí na délce a větvení postranních řetězců. Některé ftaláty zajišťují prodloužení trvalosti barvy nebo vůně, poskytují lesk nebo v případě některých léků zajišťují jeho postupné uvolňování. Nicméně ftaláty jsou v první řadě používány jako změkčovadla, udělující flexibilitu jinak tuhému polyvinylchloridu (PVC). Ukázalo se, že tato změkčovadla se v prostředí z plastových produktů vyluhují, následkem čehož jsou široce distribuovány v ekosystému a byly proto zahrnuty do skupiny nejrozšířenějších syntetických environmentálních polutantů. Zvláště di-(2-ethylhexyl)ftalát (DEHP) je nejběžněji užívaným změkčovadlem. Dalšími důležitými ftaláty jsou: diethylftalát (DEP), dibutylftalát (DBP), di-iso- a di-n-butylftalát (DiBP, DnBP), butyl-benzylftalát (BBzP), di-isononylftalát (DiNP) nebo di-n-octylftalát (DnOP).<sup>8</sup>



Obr. 6: Chemické struktury jednotlivých esterů kyseliny ftalové<sup>11</sup>

#### 4.1. Metabolismus ftalátů

Ftaláty jsou rychle metabolizovány a vylučovány močí, v menší míře stolicí. Jejich metabolismus probíhá v závislosti na délce postranního řetězce. V lidském organismu jsou ftaláty v 1. fázi biotransformace metabolizovány na příslušný monoester. Tyto monoestery dialkyl ftalátu s kratším postranním řetězcem (DEP, DBP) jsou poté v 2. fázi biotransformace konjugovány s kyselinou glukuronovou a vyloučeny močí. Zatímco dialkyl ftaláty s delším postranním řetězcem (DEHP, DnOP, DiNP apod.) hydrolyzují na příslušný monoester, dále pak na oxidační produkty a až poté podléhají konjugaci s kyselinou glukuronovou a jsou vyloučeny. Konjugace je nejčastěji katalyzována enzymem uridin-5`-difosfoglukuronyl transferázou. Volné i konjugované metabolity jsou vylučovány močí a stolicí. <sup>8, 11, 12</sup>



Obr. 7: Metabolismus ftalátů <sup>11</sup>

#### 4.2. Expozice ftalátům

Lidé jsou těmto látkám vystaveni skrz přijímání potravy, inhalaci a dermální expozici po celý život, a to již od intrauterinního života. Ftaláty nejsou kovalentně vázány ve směsích nebo materiálech, ve kterých jsou používány. Dochází proto k jejich vyluhování do prostředí. <sup>8, 9</sup>

Do životního prostředí se dostávají několika možnými cestami. Během výroby a použití PVC materiálů, vyluhováním na městských skládkách a

spalováním odpadu. Nejvíce dochází k přijímání ftalátů potravinami a inhalací vzduchu.

Pracovní expozice nastává během výroby a zpracování ftalátů, například během slučování DEHP s PVC pryskyřicí. Hlavní cesta vystavení je inhalace. Lékařská expozice nastává u procedur, které využívají materiály obsahující PVC (hemodialýza; transfuze plné krve, destiček nebo plazmy; mimotělní okysličování; kardiopulmonální bypass; intravenózní podání tekutin; enterální a parenterální výživa; umělá ventilace, apod.).

Ftaláty byly objeveny v mnoha biologických tekutinách v běžné populaci, a to v moči dospělých i dětí, v séru, spermatu, plodové vodě, mateřském mléce i slinách. <sup>8, 9, 13</sup>

### 4.3. Toxicita ftalátů

Bylo popsáno mnoho nepříznivých účinků na plodnost a reprodukci u zvířecích modelů při podávání ftalátů před pubertou. Expozice esterům ftalátu (např. DEHP, DBP a BBP) během sexuální diferenciaci inhibuje hladiny fetálního testosteronu z Leydigových buněk a inzulin-like growth faktoru 3 (InsI3), což má za následek malformace na androgenu a InsI3 dependentních tkání. Soubor těchto příznaků se označuje jako „ftalátový syndrom“. Rozsah jejich toxicit pro člověka ale prozatím zůstává neúplně charakterizovaný a sporný. <sup>8, 7, 13</sup>

„Ftalátový syndrom“ se u potkanů vyznačuje deformacemi epididymis, chámovodů, semenných váčků, prostaty, externího genitálu, dále kryptorchidismem a testikulárním poškozením. Jsou také uváděny změny v zárodečných semenotvorných kanálcích po podávání ftalátů v intrauterinním období. Ftaláty jsou dále známy svojí schopností vyvolat: *peroxisomovou proliferaci* zvýšením počtu a velikosti peroxisomů (malá buněčná organela obsahující oxidoredukční enzymy, v níž probíhají některé oxidační reakce, vč. odbourávání peroxidů), *hepatomegalii*, příp. *hepatocelulární karcinom*. <sup>10</sup>



#### 4.4. Mechanismus působení ftalátů

Mnoho důsledků expozice ftalátům je zprostředkováno podskupinou jaderných receptorů tzv. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs). Rodina PPARs zahrnuje tři rozdílné podtypy: PPAR $\alpha$  a PPAR $\beta$  (také známé jako NUC1) a PPAR $\gamma$  kódovaný jinými geny.<sup>10, 25</sup>

Leydigovy buňky a další testikulární buňky exprimují různé PPARs podtypy v závislosti na vývojovém stádiu. Před narozením jsou na fetálních Leydigových buňkách silně exprimované PPAR  $\alpha$  a PPAR  $\gamma$ . V postnatálním období je PPAR  $\alpha$  exprimován na Leydigových i Sertoliho buňkách dospělých potkanů. PPAR  $\beta$  je také exprimován na Sertoliho i Leydigových buňkách. PPAR  $\gamma$  je buď exprimován velmi slabě nebo vůbec.<sup>25</sup>

Ftaláty jsou známy tím, že mění expresi genů kódujících enzymy spojené s biosyntézou testosteronu. Je nutné zdůraznit, že PPARs působí společně a snižují aktivitu dalších nukleárních receptorů, které mají roli ve vývoji testis, ovlivňují receptory pro estrogen, thyroïdní hormony a kyselinu retinovou. Pravděpodobně díky těmto mechanismům mohou PPARs, aktivované ftaláty, měnit testikulární funkce *in vivo*.

Nedávné studie prokázaly, že expozice některým ftalátům má za následek vážné a ireverzibilní změny ve vývoji reprodukčního traktu, hlavně u mužů. Díky těmto studiím roste předpoklad, že expozice ftalátům by mohla být jednou z hlavních příčin reprodukčních poruch u lidí. Zvláště prenatální expozice k těmto environmentálním chemikáliím se zdá být nepříznivým faktorem na reprodukční vývoj a koresponduje s progresivním poklesem mužské plodnosti za posledních několik dekad.<sup>10</sup>

##### 4.4.1. Vliv ftalátů na vývoj testis

Vývoj mužského reprodukčního traktu je dynamický proces, vyžadující interakce mnoha faktorů a hormonů. Je potřebná aktivace specifických cest, zahrnující produkci a působení hormonů, zejména androgenů. Androgeny, testosteron a dihydrotestosteron (DHT), jsou nejvýznamnějšími základními faktory pro vývoj mužského vnitřního i vnějšího genitálu. Během fetálního a neonatálního vývoje jsou androgeny produkované testis nezbytné pro

diferenciaci epididymis, chámovodů a semenných váčků. Testosteron podporuje maskulinizaci těchto reprodukčních struktur.<sup>10</sup>

Maskulinizace externího genitálu a prostaty je velkou měrou zprostředkována DHT, účinnějším metabolitem testosteronu, který vzniká působením 5 $\alpha$ -reduktázy. Z tohoto důvodu je expozice chemickým látkám, interferujícím s produkcí nebo účinkem těchto hormonů, zodpovědná za částečnou či úplnou zábranu maskulinizačního procesu.

Poruchy testikulárního vývoje nebo funkce na začátku života mohou mít nepříznivé účinky ve smyslu abnormálního vývoje dalších orgánů reprodukčního systému nebo i jinde v těle. Navíc, hematotestikulární bariéra se plně vyvíjí až před pubertou. V dětství je známa svou zvýšenou permeabilitou, z čehož vyplývá, že právě dětství a předpubertální období je nejcitlivější k poruchám endokrinního systému způsobeného ftaláty.<sup>10</sup>

#### **4.4.2. Vliv ftalátů na mužskou plodnost**

Mužskou plodnost ovlivňuje mnoho faktorů. Jsou to např.: věk, životní styl (kouření, konzumace alkoholu), environmentální faktory. Odhady rizika jsou většinou založené na výsledcích zvířecích studií. V dnešní době existuje jen málo informací o působení environmentálních chemikálií na lidskou (mužskou) plodnost.

Ftaláty mohou porušit endokrinní rovnováhu a tedy zasahovat do produkce, sekrece, transportu, metabolismu, receptorové vazby a zprostředkování efektů přirozených hormonů, které řídí vývojové procesy a podporují endokrinní homeostázu v organismu. Tyto chemikálie mohou mít estrogení a antiandrogení účinky a jsou považovány za látky napodobující endogenní hormony.

Substance s estrogeními a antiandrogeními vlastnostmi byly hlášeny pro příčinnou souvislost s hypospadií (abnormální vyústění močové trubice na spodní straně pohlavního údu), kryptorchidismem, redukcí spermatické density a zvýšeného výskytu testikulárních nádorů u zvířecích modelů.<sup>10, 13</sup>

#### 4.5. Alternativní materiály

Zavedení plastických hmot představuje jeden z nejvýznamnějších vědeckých pokroků. V průběhu let ale mnoho vědců navrhovalo zastavit použití plastových předmětů obsahující extrahovatelné látky, které by mohly přijít do kontaktu s lidskými tkáněmi, a byl proto zahájen výzkum alternativ nahrazujících ftaláty (zejména DEHP).

V průběhu let 2001 - 2004 byl Evropskou unií schválen a financován projekt na studování nových možností ve výrobě PVC. Cílem tohoto projektu bylo vyvinout průmyslové technologie pro nahrazení ftalátů ve výrobě flexibilního PVC, zejména ve výrobě spotřebního zboží, které přichází do kontaktu s lidskými tekutinami či tkáněmi, zvláště pak lékařské pomůcky.<sup>8</sup>

Příkladem jedné z alternativ může být produkt firmy Danisco a.s. z Kodaně, která vynalezla alternativní změkčovadlo, které dokáže plně nahradit základní ftaláty, zejména pak DEHP. Produkt Grindsted Soft-N-Safe byl vyvinut na bázi rostlinného oleje. Je netoxický, nenarušuje hormonální rovnováhu a vyhovuje směrnici REACH. Uděluje větší měkkost PVC a na konci doby trvanlivosti je plně schopný rozkladu. Grindsted Soft-N-Safe byl schválen pro použití v produktech, které přichází do kontaktu s potravinami, v Evropské unii i USA.<sup>19</sup>

## 5. DIETHYLFTALÁT

Diethylftalát (DEP; CAS No. 84-66-2), známý též jako diethylester kyseliny 1,2-benzendikarboxylové, je bezbarvá olejovitá kapalina s nepatrným zápachem, nízkou těkavostí a nahořklou chutí. Je komerčně vyráběn reakcí ftalanhydridu s acetaldehydem v přítomnosti kyseliny sírové jako katalyzátoru. DEP se používá jako rozpouštědlo a vehikulum do parfémů a kosmetických přípravků a jako denaturační prostředek.

Výrobky obsahující DEP jsou např.: koupelové přípravky (mýdla, oleje, soli), oční stíny, parfémy a jiné vůně, vlasové spreje, laky na nehty, saponáty, vody po holení, pleťové krémy a také se využívá jako změkčovač plastů (zubní kartáčky, dětské hračky, apod.).<sup>15, 16</sup>

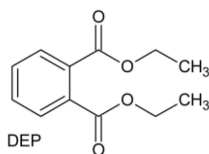
### 5.1. Fyzikální a chemické vlastnosti

Název: diethylftalát

Chemické názvy: diethyl-o-ftalát, diethylester ftalové kyseliny, diethylester kyseliny 1,2-benzendikarboxylové

Obchodní název a zkratky: Anozol, DPX-F5384, Estol 1550, Neantine, Palatinol A, Phthalol, Placidol E, Solvanol, Unimoll DA, DEP<sup>17</sup>

Struktura:<sup>11</sup>



Empirický vzorec: C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>

Molekulová hmotnost: 222,26<sup>17</sup>

Savčí metabolity: ethanol, monoethyl ftalát, ftalová kyselina

Produkty biodegradace: oxid uhličitý a methan (aerobní a anaerobní degradace půdou nebo aktivovaným kalem), kyselina ftalová (primární degradací v půdě) <sup>22</sup>

#### Čistota, složení a kód látky

Čistota vyráběného esteru ftalátu je odhadována mezi 99,7% a 99,97%. Hlavními znečišťujícími látkami jsou potom kyselina izoftalová, kyselina tereftalová a maleinanhydrid.

#### Fyzikální vlastnosti

Vzhled: průhledná, bezbarvá kapalina bez zápachu

Bod tání: -40,5°C

Bod varu: 298°C

Teplota vznícení: 161°C

Hustota: 1,120 g/ml při 25°C

Tlak páry: pod 0,001 torr při 20°C

#### Rozpustnost

Voda: mírně rozpustný; 1,08 g/l

Mísitelný v alkoholu, éterech, ketonech, aromatických uhlovodících, benzenu, alifatických rozpouštědlech a rostlinných olejích. <sup>17</sup>

### **5.2. Expozice diethylftalátu**

DEP se může do prostředí dostat ze vzdušných emisí, průmyslovými odpadními vodami nebo pevnými odpadními produkty z výroby a zpracování plastů. Do atmosféry může vstupovat v podobě páry nebo specificky při zpopelnění plastů obsahujících diethylftalát, případně těkáním nebo vyluhováním z produktů, ve kterých je užit.

Pracovní expozice, především inhalačně nebo dermálně, se vyskytuje na pracovištích spojených s výrobou a použitím DEP. Nejpravděpodobnější zdroj expozice je v dnešní době spotřební zboží obsahující DEP. <sup>16</sup>

### 5.3. Toxikokinetika a metabolismus diethylftalátu

#### 5.3.1. Absorpce

Informace z pokusů na zvířatech ukázaly, že DEP se absorbuje orální nebo dermální cestou. Myši vylučovaly velké množství orálně podaného DEP močí, což ukazuje na rozsáhlou absorpci. 24h po dermálním podání <sup>14</sup>C-diethylftalátu bylo 9% radioaktivity naměřeno v moči králíků, 24% v moči myši a 1% v myších výkalech. <sup>16, 18</sup>

#### 5.3.2. Distribuce

Absorbovaný DEP je distribuován skrz tělesné tkáně s největší akumulací v ledvinách a játrech. V experimentech s králíky Dillingham a Pesh-Imam byla objevena radioaktivita v plicích, srdci, játrech, ledvinách, gonádách a mozku po dermální aplikaci <sup>14</sup>C-diethylftalátu. Méně než 1% bylo nalezeno v tukové tkáni, svalech a kůži potkanů po 7 dnech od aplikace nárazové dávky DEP. Intraperitoneální injekce <sup>14</sup>C-diethylftalátu podané gravidním myším, prokázaly radioaktivitu v plodové vodě, placentě a fetálních tkáních, což dokazuje, že látka může projít skrz placentu k vyvíjejícímu se plodu. <sup>16, 18</sup>

#### 5.3.3. Metabolismus

Metabolismus spočívá v hydrolýze DEP na ethanol a MEP, který je poměrně rychle vylučován močí. Při studiích na myších byl MEP primární metabolit nalezený v moči, dále pak byla nalezena volná kyselina ftalová. K hydrolýze dochází v lumen gastrointestinálního traktu nebo v buňkách střevní mukosy po orální aplikaci stejně jako v játrech, ledvinách či plicích po systémové absorpci. DEP je hydrolyzován na monoester karboxyesterázou z lidských/potkaních jater. <sup>16, 18</sup>

#### 5.3.4. Exkrece

Při pokusech na zvířatech se moč jeví jako nejvýznamnější cesta vylučování DEP. Potkani vylučovaly 77% orálně podaného DEP právě močí. <sup>16, 18</sup>

#### 5.4. Toxicita diethylftalátu

V nedávné době (2003) publikovala Světová zdravotnická organizace práci o diethylftalátu. Tento dokument obsahuje závěry publikací na téma týkající se diethylftalátu vydané do října roku 2001 a shrnuje že:

- a) Následkem rozšířeného používání DEP se očekává, že projevy na lidech budou významné (i když lidé dostávají dávky podstatně nižší, než zvířata v toxikologických studiích).
- b) DEP podstupuje biodegradaci v prostředí a má nižší kapacitu vázat se na usazeniny a kumulovat se ve zvířatech v potravním řetězci, než mají ostatní ftaláty.
- c) Ačkoliv DEP hydrolyzuje v těle na monoester a nekumuluje se v tkáních, je jasné, že při dermální expozici může kůži penetrovat a široce se tak distribuovat po těle každou následující expozicí.
- d) DEP je slabé kožní a oční dráždidlo u zvířat a jsou popsány i ojedinělé případy kožního dráždění nebo přecitlivělosti u lidí vystavených DEP.
- e) Ačkoliv se mohou vyskytovat změny hmotnosti jater či ledvin po orálním podání, nebyly ve většině studií objeveny žádné významné klinické nebo histopatologické změny.
- f) Nebyly pozorovány žádné karcinogenní efekty u potkanů po kožní expozici, ale přesto bylo získáno mnoho nejednoznačných výsledků po kožní expozici u myší a v *in vitro* mutagenních studiích.
- g) Perinatální vystavení DEP nenavodilo žádné nepříznivé účinky v matkách ani potomstvu; ani malformace mužských reprodukčních orgánů, jak bylo pozorováno při laboratorních zvířecích studiích jiných ftalátů.

- h)** Nicméně v nepřetržitých plemenných studiích byla pozorována snížená epididymální spermatická koncentrace v F1 generaci a snížení počtu živých F2 mláďat na vrh byla pozorována ve vyšších dávkách. Dále byly pozorovány změny ultrastruktury v Leydigových buňkách potkanů a to jen po dvou dnech orálního podávání DEP v dávce 2000 mg/kg/den.
  
- i)** Do dnešní doby nebyly hlášeny žádné nepříznivé imunologické či neurologické účinky.
  
- j)** Ačkoliv rizika odhadovaná pro vodní organismy jsou považována za relativně nízká (použitím standardních metod odhadování rizika), nejsou k dispozici dostatečné informace k odhadnutí rizika pro půdní nebo mořské organismy.

Počet studií publikovaných do roku 2001 zvýšilo další znepokojující zájem týkající se esterů ftalátu, včetně DEP, v souvislosti s jejich rozšířenou distribucí a jejich vlivem na lidské zdraví a životní prostředí.<sup>23</sup>



## EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 6. EXPERIMENT

### 6.1. Použitá zvířata

Pro experiment byli použiti samci potkana kmene Wistar o průměrné hmotnosti 260 g. Zvířata byla chována za standardních podmínek ve viváriu Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové s volným přístupem k vodě a potravě.

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.

### 6.2. Vlastní experiment

V experimentu bylo použito celkem 10 potkanů, kteří byli rozděleni do dvou skupin. Každý byl označen kyselinou pikrovou na různých částech těla pro pozdější identifikaci: vždy HL, PP, PZ, LP, LZ. Diethylftalát byl oběma skupinám podán jednorázově. Použili jsme dvě varianty diethylftalátu a to Oekanal a Pestanal od firmy Sigma-Aldrich.

Skupině C byl intraperitoneálně podán Oekanal. 10 mg Oekalanu jsme podávali ředěný s 1 ml aqua pro injectione a 1 ml 100% ethanolu. Každému potkanovi bylo do peritonea injekčně vpraveno 0,4 ml této směsi. Skupině D byl subkutánně podán Pestanal do kožní řasy. Pestanal, v celkovém množství 1g, byl podán nezředěný, každému potkanovi 0,2 ml.

Po 12 - ti dnech byla potkanům provedena euthanázie předávkováním celkovým inhalačním anestetikem. Použit byl Aether pro narcosi v uzavřeném prostoru exsikátoru. Po usmrcení jsme provedli otevření dutiny břišní a odebrali jsme:

- skupině C: varle, příp. hematom na varleti, vazivo varlete, hrot varlete
- skupině D: varlata, prostatu, močový měchýř, játra, ledvinu

Orgány a tkáně jsme histologicky zpracovali a pozorovali pod světelným mikroskopem.

### 6.3. Histologické zpracování vzorků skupiny C

Vzorky odebrané potkanům skupiny C jsme zalévali do epoxidových pryskyřic. V prvním dnu, hned po odběru, jsme tkáň nakrájeli acetonem odmaštěnou žiletkou na malé vzorky a poté je nechali fixovat v 3% roztoku glutaraldehydu (GA) v pufru. Druhý den jsme pasterkou odsáli glutaraldehyd, vzorky propláchli Millonogovým pufrem a následovala fixace 2% kyselinou osmičelou. Poté jsme vzorky opět propláchli Millonogovým roztokem, odvodnili v zestupnou alkoholovou řadou a převedly je do pryskyřice. Třetí den jsme ze vzorků opatrně odstranili pryskyřici znehodnocenou vzduchem. Vzorek byl vpraven do špičky kapsle a byl zalit čerstvou pryskyřicí. Formu se zalitými vzorky jsme dali na tácek se silikagelem a umístili do termostatu na 3 dny při teplotě 58-60°C.

Poté jsme vzorky opracovali a krájeli polosilné řezy na mikrotomu. Na 96% alkoholem odmaštěné podložní sklo jsme nanесли 2 kapky 2% alkoholu a preparační jehlou (wolframovým vláknem) přenesli z vaničky nože polosilné řezy. Následovalo vlastní barvení.

#### 6.3.1. Fixace a zalití do epoxidové pryskyřice

##### Fixace:

Fixace v glutaraldehydu	1 den
Millonogův pufr	3 – 4 x 15 minut
2% kyselina osmičelá	1,5 – 2 hodiny
Millonogův pufr	4 x 15 minut

##### Odvodňování:

25% alkohol (vychlazený)	15 min
50% alkohol (vychlazený)	15 min
75% alkohol (s 1% uranyl acetátu, vychlazený)	15 min
96% alkohol (s 1% UA, pokojová teplota)	15 min
100% alkohol (s 1% UA pokojová teplota)	15 min
100% alkohol (čistý pokojová teplota)	2x15 min

### **Převod do pryskyřice:**

Aceton : Epon+Durkupan (2:1)	1 hodina
Aceton : Epon+Durkupan (1:2)	1 hodina
Epon+Durkupan (čistý)	přes noc

### **6.3.2. Barvení polosilných řezů**

Nechali jsme odpařit 2% alkohol nad kahanem, preparáty se napnuly a přischly. Na řezy jsme nakapali barvicí roztok toluidinové modři s pyroninem a 10 – 20 sekund žíhali nad plamenem. Po 6 – 8 minutách jsme barvičku slili, preparáty jsme opláchli redestilovanou vodou, 50% alkoholem a ještě jednou redestilovanou vodou. Sklíčko jsme sušili nad plamenem. Poté jsme řezy prohlédli pod světelným mikroskopem a zamontovali se do Entalánu.

#### **Barvení:**

Toluidinová modř – pyronin	6 – 8 minut
Redestilovaná voda	opláchnutí
50% alkohol	opláchnutí
Redestilovaná voda	opláchnutí

#### **Zamontování:**

Entalán

### **6.4. Histologické zpracování vzorků skupiny D**

Vzorky skupiny D jsme zalévali do parafínu. Po odebrání jsme tkáň nechali po 2-3 dny fixovat v Bouinově fixační tekutině. Bouinova fixační tekutina brání samovolnému rozkladu tkáň enzymy. Po uplynutí doby jsme tkáň odvodnili acetonem, projasnili xylenem a po prosycení parafinem zalévali do bločků.

Po ztuhnutí jsme bločky krájeli na sáňkovém mikrotomu Leitz - Wetzlar na řezy tenké 5 - 7  $\mu\text{m}$ . Na podložní sklíčko jsme aplikovali kapičku směsi

glycerinu s bílkem, rozetřeli, nakapali destilovanou vodu, do které jsme řezy pomocí preparačních jehel přenesli.

Před barvením jsme řezy odparafinovali xylenem a sestupnou alkoholovou řadou. Polovinu řezů jsme barvili hematoxylin – eosinem, druhou polovinu zeleným trichromem. Po barvení jsme řezy odvodnili pomocí vzestupné alkoholové řady a projasnili xylenem. Obarvené řezy jsme zamontovali do kanadského balzámu a vyhodnotili pod světelným mikroskopem.

#### **6.4.1. Fixace a zalití do parafínu**

Bouinův roztok	3 dny
Ethanol 80%	1 hodina
3x aceton	během 24 hodin
Xylen	2x15 minut
Parafín (56°C)	2 hodiny
Parafín (56°C)	2 hodiny
Zalití do parafínu a vytvoření bločků.	

#### **6.4.2. Barvení hematoxylin – eosin**

##### **Odparafinování:**

xylen	3x5 minut
96% ethanol	5 minut
70% ethanol	5 minut
Destilovaná voda	5 minut
Otření sklíček buničinou.	

##### **Barvení:**

Hematoxylin	6-8 minut
Pramennitá voda	10 minut
Eosin	2 minuty
Destilovaná voda	opláchnutí

**Odvodnění:**

96% ethanol	2x opláchnutí
Ethanol : xylen (2:1)	3 minuty
Xylen : ethanol (1:2)	3 minuty

**Projasnění:**

Xylen	3x3 minuty
Otření sklíček buničinou.	

**Zamontování do kanadského balzámu.****Výsledek barvení:**

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

**6.4.3. Barvení na kolagen – zelený trichrom****Odparafinování:**

xylen	3x5 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.	
Pramennitá 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 : xylen (2:1)	3 minuty
Xylen : ethanol (1:2)	3 minuty

**Projasnění:**

Xylen	3x3 minuty
Otření sklíček buničinou.	

**Zamontování do kanadského balzámu.**

**Výsledek barvení:**

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

## 6.5. Roztoky a chemikálie

- **Diethylftalát**

Diethyl phthalate Pestanal (Sigma – Aldrich)	1 g
Diethyl phthalate Oekanal (Sigma – Aldrich)	10 mg

(naředěný do 1 ml aqua pro injectione a 1ml 100% ethanolu)

- **Příprava fixačních roztoků**

**a) Příprava Millonogova pufru**

Roztok A: NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	22,6 g na 1 l redestilované vody
Roztok B: NaOH	12,6 g na 1 l redestilované vody
Roztok C: glukóza	5,4 g na 100 ml redestil. vody

**Uchovávací roztok:**

Roztok A	415 ml
Roztok B	85 ml

Upravit pH na 7,1 – 7,3.

**Pufr s glukózou:**

Uchovávací roztok	90 ml
Roztok C	10ml

Upravit pH na 7,2 – 7,3.

**b) Příprava fixačního roztoku 3% GA v Millonogově pufru**

Ampule s 8% roztokem GA	10 ml
Millonogův pufr	16,7 ml

(na 3 ml 8% GA potřeba 5 ml Millonogova pufru)

**c) Příprava 2% kyseliny osmičelé ze 4% roztoku v ampuli**

Obsah ampule se 4% roztokem kyseliny osmičelé se ředí ve stejném poměru Millonogovým pufrům na 2% roztok do váženky se zábrusem a víčkem. Roztok vydrží použitelný nejdéle týden, a proto se vždy připravuje množství, které se



spotřebuje celé (cca 0,5 ml na 1 vzorek). Zbytek se uchovává ve váženice v boxu v lednici.

#### **d) Příprava Bouinovy fixační tekutiny**

Nasyčený roztok kyseliny pikrové	300 ml
Neutrální formol	100 ml
Před použitím: kyselina octová	3 ml

#### **• Příprava zásobních roztoků**

Příprava alkoholů s 1% UA:

Do 100 ml alkoholu o určité koncentraci jsme přisypali 1 g UA, důkladně rozpustili a potom přefiltrovali do tmavé lahvičky se zábrusem. Roztoky se uchovávali v lednici ve tmě.

#### **• Příprava epoxidových pryskyřic**

**Směs Epon – Durkupan:**

Epon 812	2,5 ml	5 ml
D modrý (B)	5,5 ml	11 ml
D červený (A/M)	1,5 ml	3 ml
D žlutý (C)	0,2 ml	0,4 ml
D zelený – pohyb. složka podle vlhkosti vzduchu v boxu		0,1 - 0,35 ml/1 dávka
Vlhkost:	pod 25%	0,35 ml
	35 - 40%	0,3 ml
	50%	0,15 ml
	Nad 60%	neužívat D zelený

Durkupan:

D červený (A nebo A/M)	vlastní pryskyřice	10ml
D modrý (B)	katalyzátor č. 1	10 ml
D zelený (D)	změkčovač	0,2 ml
D žlutý (C)	katalyzátor č. 2	0,3 ml

Směs č. I: A+B+D lze skladovat v uzavřené stříkačce v lednici nebo digestoři.

Směs č. II: A+B+D+C nelze skladovat, sama tvrdne.

Epon:		
Epon 812	vlastní pryskyřice	26,7 g
DDSA	plastifikátor	18,5 g
MNA	plastifikátor	11,6 g
BDMA/DPM-30	katalyzátor	0,8 ml

Po smísení 10 min intenzivně protřepávat, pak 10 min předpolymerovat při teplotě 58°C a uchovávat při 40°C.

- **Příprava parafínu**

Tuhý parafín zkvalitněný 3 – 5% bílého včelího vosku.

- **Příprava barvicího roztoku toluidinové modři s pyroninem**

1) 1% toluidinová modř

Toluidinová modř	1 g
Boritan sodný	1 g
Redestilovaná voda	100 ml

2) 1% pyronin

Pyronin	0,5 g
Boritan sodný	0,5 g
Redestilovaná voda	50 ml

3) barvicí roztok

Toluidinová modř 1%	40 ml
Pyronin 1%	10 ml
Redestilovaná voda	30 ml

Barvička musí několik dní zrát, skladuje se v lednici při 5°C, před použitím je nutné jí přefiltrovat.

- **Příprava barvicího roztoku Hematoxylin - eosin**

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
1% roztok eosinu v destilované vodě.	

- **Příprava barvicího roztoku zelený trichrom**

**Goldner I.:**

a) Ponceu de xylidin	1g
Koncentrovaná kyselina octová	1 ml
Destilovaná voda	100 ml
b) Oranž G	1 g
Koncentrovaná kyselina octová	1 ml
Destilovaná voda	100 ml
c) Fuchsin S	1 ml
Koncentrovaná kyselina 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% vodného roztoku kyseliny fosfowolframové.

**Goldner III.:**

Světlá zeleň	1,5 g
Ledová kyselina octová	1 ml
Destilovaná voda	100 ml

## 7. VÝSLEDKY

Na začátku experimentu jsme obě skupiny po pěti potkanech označili kyselinou pikrovou, vždy: hlava (HL), pravá přední (PP), pravá zadní (PZ), levá přední (LP), levá zadní (LZ). Před vlastním podání diethylftalátu byli potkani zváženi. Souhrn hmotností je uveden v tabulce 1.

SKUPINA C		SKUPINA D	
Potkan	Hmotnost	Potkan	Hmotnost
HL	240 g	HL	240 g
PP	280 g	PP	260 g
PZ	240 g	PZ	240 g
LP	260 g	LP	240 g
LZ	260 g	LZ	260 g

Tab. 1: Tabulka hmotností potkanů obou skupin před provedením experimentu.

Dne 26. 11. 2008 byl potkanům jednorázově aplikován diethylftalát. Skupině C byl intraperitoneálně podán ředěný Oekanal, 10 mg Oekanalů s 1 ml aqua pro injectione a 1 ml 100% ethanolu. Všem pěti potkanům skupiny C bylo nadávkováno 0,4 ml této směsi. Skupině D byl subkutánně do kožní řasy podán Pestanal. Pestanal, v celkovém množství 1g, byl podán nezředěný. Každému potkanovi 0,2 ml.

Po 12-ti dnech (8. 12. 2008) byli potkani usmrceni a byli jim odebrány orgány. Skupině C jsme odebrali varlata, skupině D kromě varlat ještě ledvinu, prostatu, močový měchýř a vzorek jater. Přehled odebraných orgánů pro všechny skupiny jsou shrnuty v následujících tabulkách.

SKUPINA C – PARAMETRY ODEBANÝCH ORGÁNŮ		
Potkan	Odebraný orgán	Parametry sledovaných orgánů
HL	Pravé varle (tkáň a hematom)	Pravé varle: 17 mm Levé varle: 21 mm
PP	Pravé varle (hematom, vazivo z hrotu varlete) Levé varle	Pravé varle: 18 mm Levé varle: 21 mm
PZ (Kontrola)	Pravé varle	Pravé varle: 20 mm
LP	Pravé varle (hrot varlete, tkáň varlete)	Pravé varle: 20 mm Levé varle: 20 mm
LZ	Pravé varle (hematom, vazivo varlete)	Pravé varle: 16 mm Levé varle: 20 mm

Tab. 2: Parametry odebraných a sledovaných orgánů skupiny C.

Popis orgánů při odběru:

- HL: pravé varle menší, na jeho hrotu hematom
- PP: pravé varle menší s vazivovými srůsty a hematodem; odebrána obě varlata, levé jako kontrola
- PZ: kontrolní (KK)
- LP: hrana pravého varlete přerostlá
- LZ: pravé varle přerostlé s velkým hematodem na hrotu

<b>SKUPINA D – PARAMETRY ODEBRANÝCH ORGÁNŮ</b>		
<b>Potkan</b>	<b>Odebraný orgán</b>	<b>Parametry sledovaných orgánů</b>
HL	Varlata, prostata, močový měchýř, játra, ledvina	Pravé varle: 20 mm; 1,7 g (mokrý váha) Levé varle: 21 mm; 1,9 g (mokrý váha)
PP	Varlata, prostata, močový měchýř, játra, ledvina	Pravé varle: 21 mm; 1,6 g (mokrý váha) Levé varle: 21 mm; 1,6 g (mokrý váha)
PZ	Varlata, prostata, močový měchýř, játra, ledvina	Pravé varle: 20 mm; 1,7 g (mokrý váha) Levé varle: 22 mm; 1,7 g (mokrý váha)
LP	Varlata, prostata, močový měchýř, játra, ledvina	Pravé varle: 22 mm; 1,9 g (mokrý váha) Levé varle: 21 mm; 1,8 g (mokrý váha)
LZ	Varlata, prostata, močový měchýř, játra, ledvina	Pravé varle: 21 mm; 1,6 g (mokrý váha) Levé varle: 21 mm; 1,6 g (mokrý váha)

Tab. 3: Tabulka odebraných orgánů skupiny D, s největší pozorností věnovanou varlatům.

Odebrané orgány hmotnostně i velikostně odpovídaly fyziologickým rozměrům.

### **7.1. Výsledky histologického hodnocení**

Histologické preparáty jsme dokumentovali na mikroskopu Olympus Provis AX 70 pomocí počítačového programu NIS – Elements AR 2.30.

### 7.1.1. Potkani skupiny C

Této skupině byl jednorázově podán diethylftalát Oekanal 10 mg ředěný 1 ml aqua pro injectione a 1 ml 100% ethanolu. Potkanům bylo intraperitoneálně podáno 0,4 ml této směsi. Odebraná varlata se hmotnostně a rozměrově shodovala s fyziologickými hodnotami. Na polosilných preparátech pro elektronovou mikroskopii byly nalezeny artefakty, které ale zřejmě souvisely se špatnou fixací.

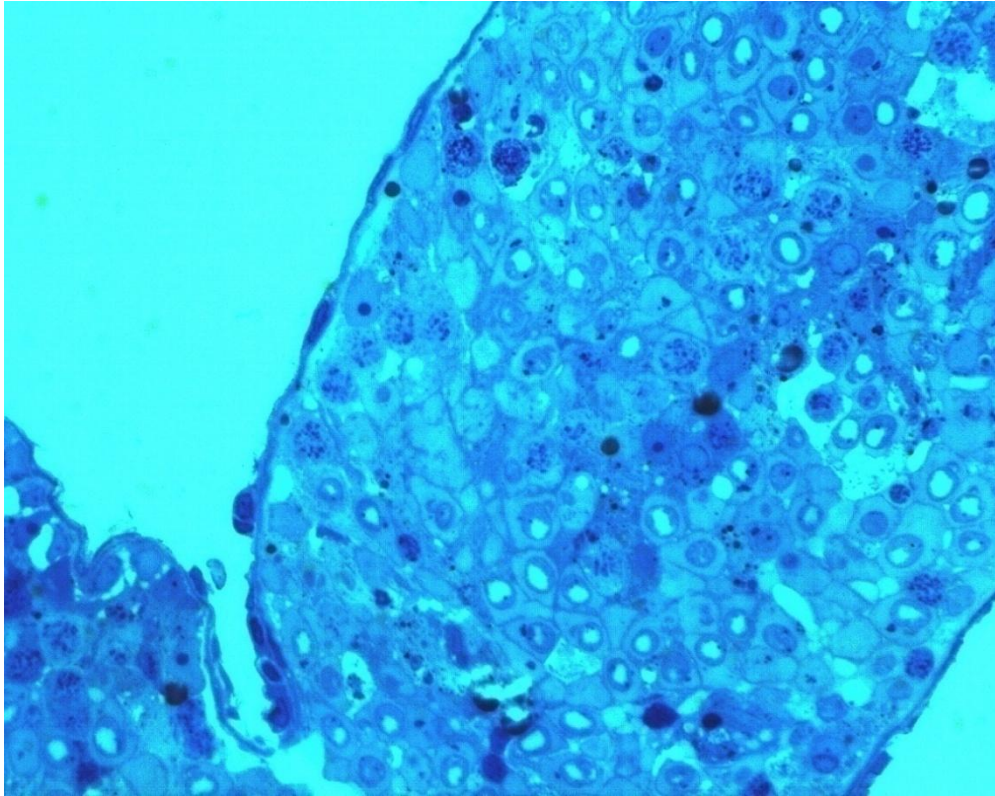
### 7.1.2. Potkani skupiny D

Této skupině byl jednorázově podán diethylftalát Pestanal nezředitelný. Každému zvířeti bylo subkutánně podáno 0,2 ml do kožní řasy. Stejně jako ve skupině C byly odebrané orgány ve fyziologickém rozmezí.

- Preparáty varlat byly fyziologické, bez jakéhokoliv patologického nálezu. V několika z nich byly nalezeny zánětlivé buňky, jejichž přítomnost ovšem nemůže být s jistotou přisouzena účinkům podaného diethylftalátu.
- V parenchymu jater byly nalezeny rozdílné velikosti jader Kupferových buněk, překrvené sinusoidy se stínovitým obrazem erytrocytů. Kupferovy buňky vypadaly aktivované, často prominovaly do sinusoidních prostorů.
- Preparáty ledvin měly opět fyziologickou stavbu, bylo ovšem pozorováno nápadné překrvení glomerulů. Často byla až uzavřená močová štěrbina.
- Morfologie koagulační žlázy byla ve fyziologickém stavu.

## 8. OBRÁZKOVÁ PŘÍLOHA

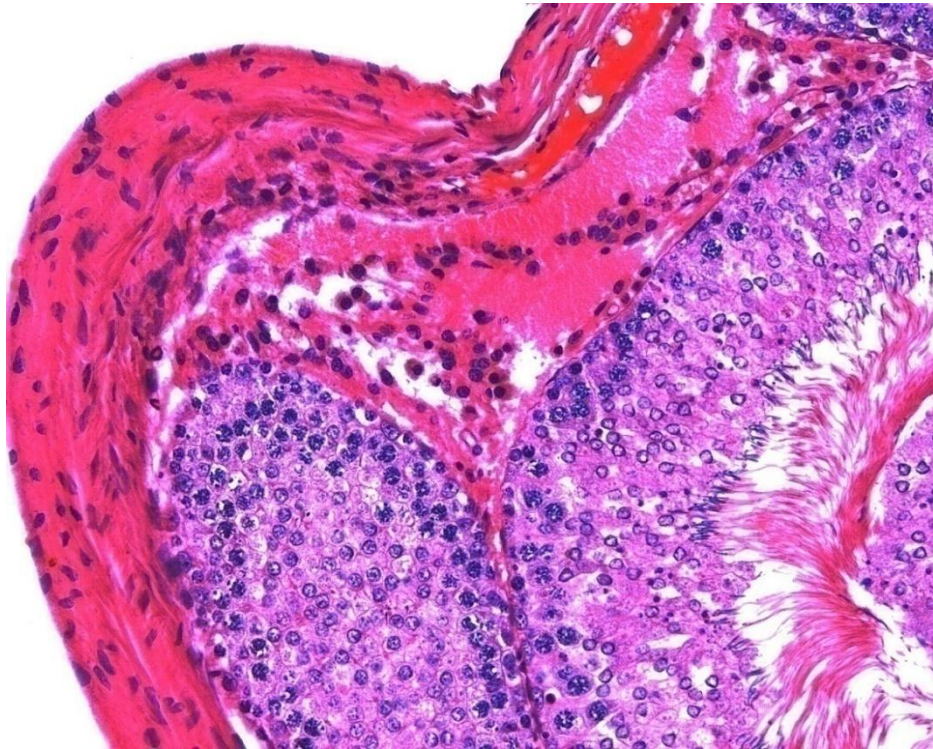
### Skupina C



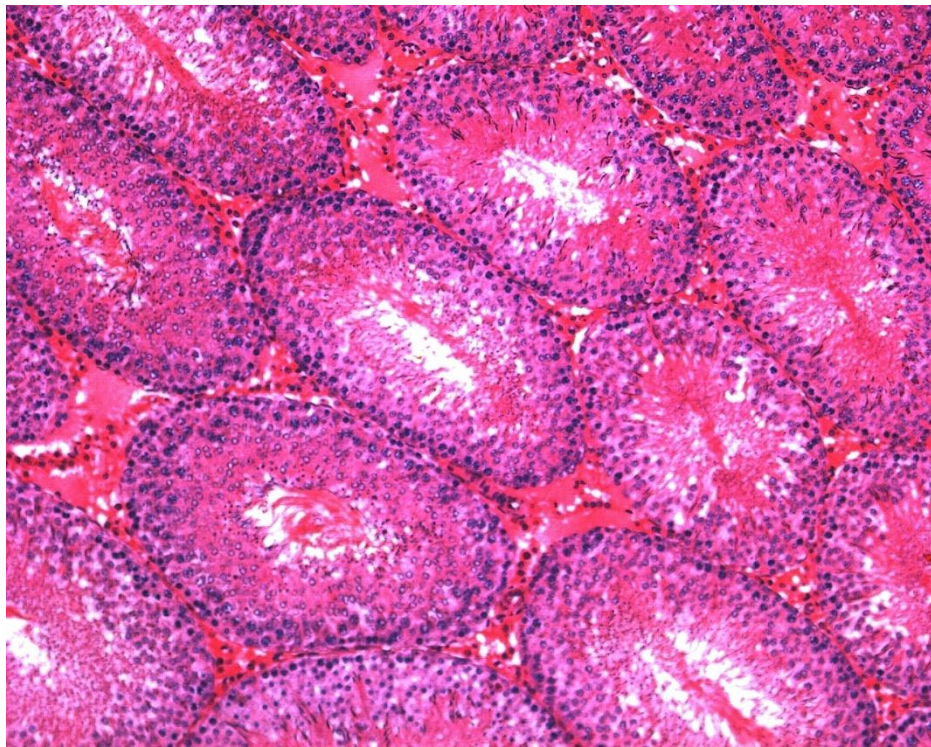
Obrázek 1.: Řez varletem s nálezem artefaktů, toluidinová modř - pyronin, zvětšeno 400x



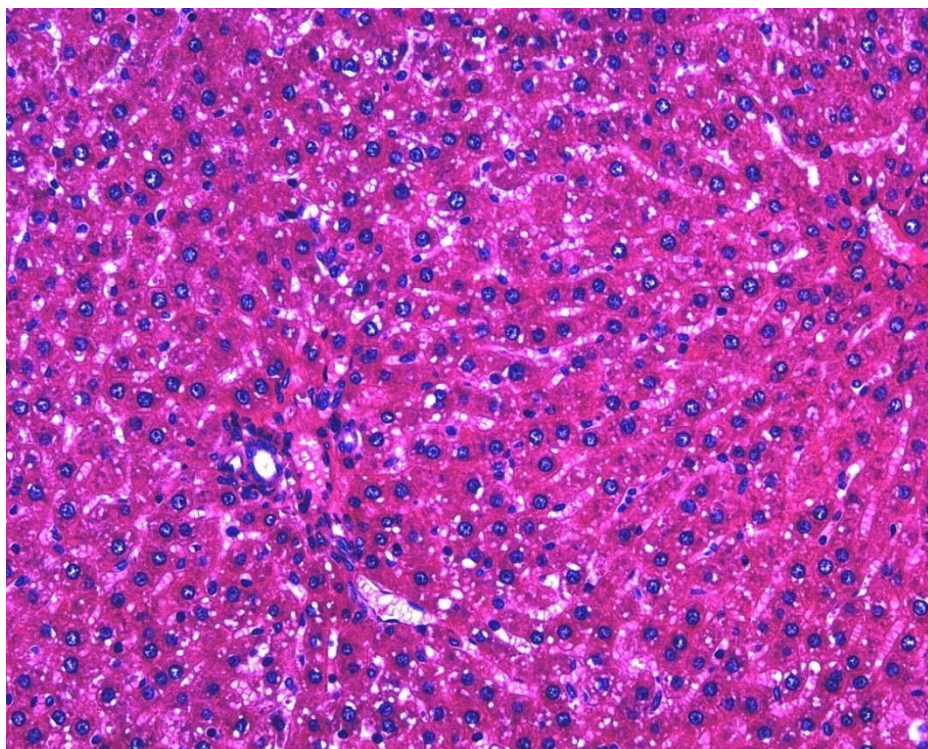
## Skupina D



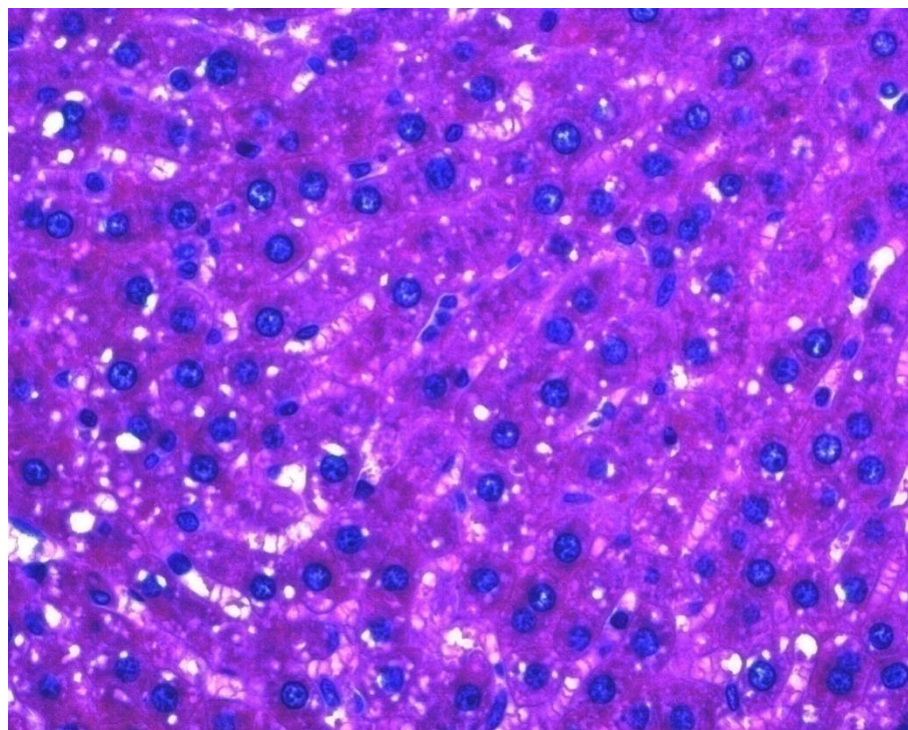
Obrázek 2.: Příčný řez varletem s nálezem zánětlivé infiltrace v intersticiu, HE, zvětšeno 200x



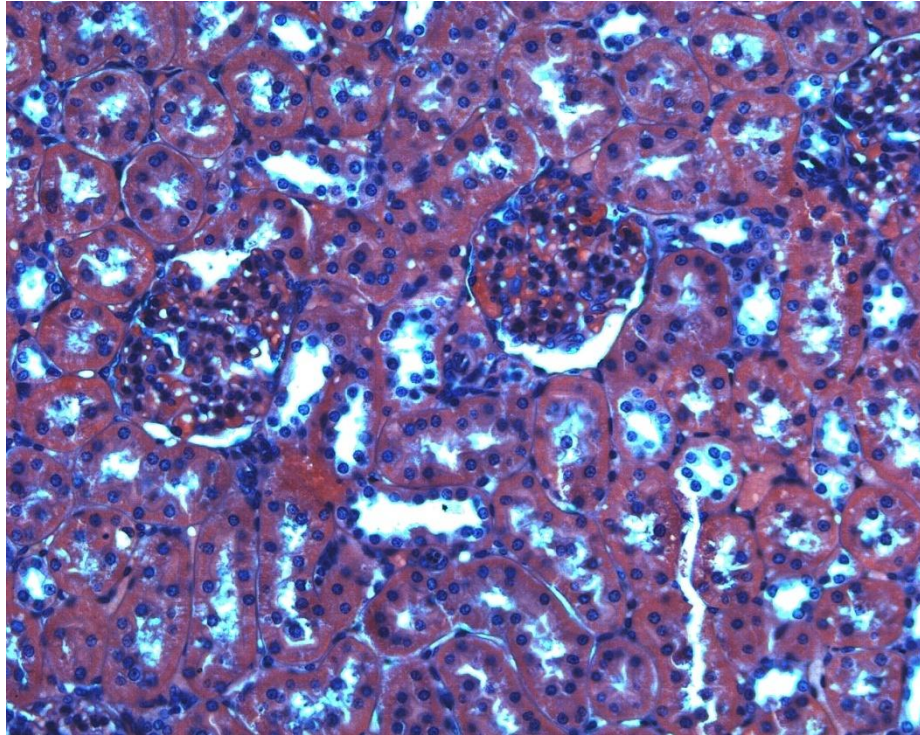
Obrázek 3.: Přehledný řez stočenými kanálky varlete, HE, zvětšeno 100x



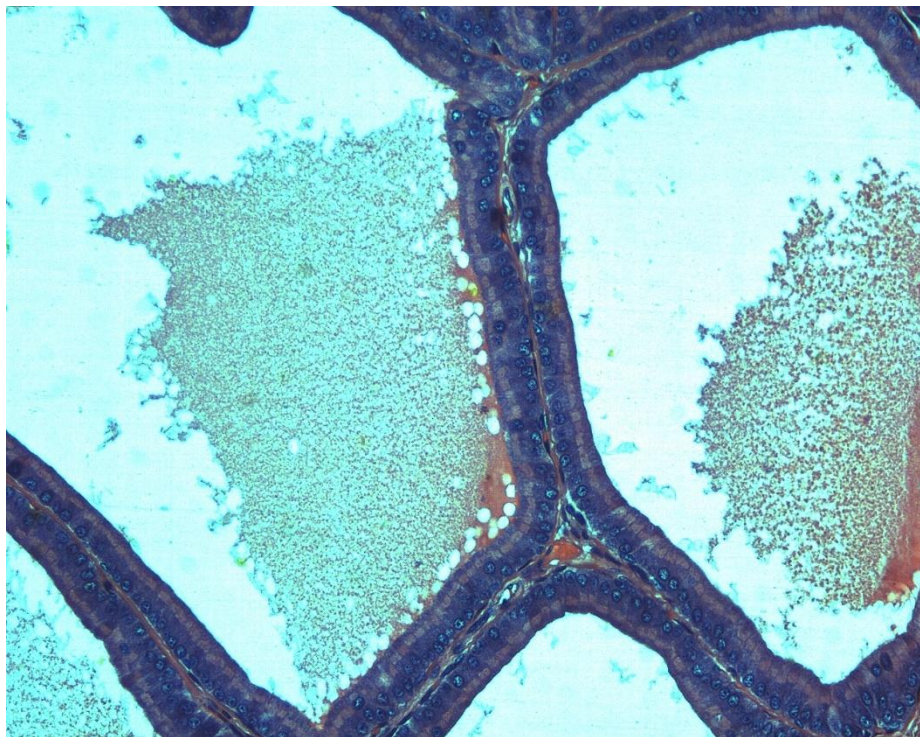
Obrázek 4.: Jaterní tkáň vykazující rozdílné velikosti jader Kupferových buněk, HE, zvětšeno 200x



Obrázek 5.: Parenchym jaterních buněk a překrvené sinusoidy se stínovitým obrazem erytrocytů. Kupferovy buňky se zdají být aktivované, HE, zvětšeno 400x



Obrázek 6.: Přehledný řez ledvinou s normální morfologickou stavbou. Pozorováno pouze nápadné překrvení glomerulů, které často utlačují močovou štěrbinu, HE, zvětšeno 200x



Obrázek 7.: Detailní pohled na glandula vesiculosa (koagulační žlázu), jejíž morfologická stavba byla ve fyziologickém stavu, HE, 200x

## 9. DISKUZE

V dnešní době je sledování účinků ftalátů velmi probíraným tématem. Mnoho vědců považuje za výhodnější nahradit používání těchto látek jinými, lidskému zdraví méně škodlivými látkami.<sup>8-10, 19</sup>

Diethylftalát je velice používanou látkou, zejména v kosmetických a hygienických produktech a jako vehikulum vůní. Díky tomu s ním člověk přichází do kontaktu prakticky denně.<sup>15, 16</sup>

A. M. Api experimentálně zkoušela toxicitu diethylftalátu, jako vehikula vůní, na potkanech a králících. Diethylftalát v těchto testech prokázal nízkou úroveň toxicity. Testování jeho případného kožního dráždění a přecitlivělosti u lidí a zvířat, stejně jako jeho fototoxicity a fotosenzitivity, demonstrovalo jeho bezpečné použití. Dokonce při použití neředěného diethylftalátu nebyly pozorovány žádné nebo jen minimální efekty. Výsledky subchronických a reprodukčních studií neukázaly žádné nepříznivé účinky. Testy zkoušející případnou embryotoxicitu či teratogenitu diethylftalátu neprokázaly v tomto ohledu jeho jedovatost.<sup>18</sup>

I když mnoho studií na zvířecích modelech, zabývajících se diethylftalátem, neprokázaly žádné specifické toxické účinky, přesto je oprávněné se domnívat, že i diethylftalát může být pro člověka nebezpečný. Lze tak usuzovat z jeho rozšířeného použití a dennodenního kontaktu. Není se proto čemu divit, že ho lze najít třeba v plodové vodě těhotných žen.<sup>8, 9, 13, 23</sup>

Vyvíjející se organismus je k působení ftalátu velice citlivý. Zvláště citlivý je pak vývoj mužského pohlavního ústrojí. Hematotestikulární bariéra, tvořena těsnými junkcemi Sertoliho buněk, se plně vyvíjí až v předpubertálním období, z čehož vyplývá zvýšená citlivost testikulárních buněk k působení toxických látek v dětském a předpubertálním věku. Jmenovitě di(2-ethylhexyl)ftalát je toxický pro reprodukční vývoj. Působí přes PPARs receptory přítomné na Leydigových, ale i Sertoliho buňkách. Pokud dojde k ovlivnění těchto buněk v intrauterinním období, zvláště během organogeneze, může dojít ke vzniku tzv. „Ftalátového

syndromu“. Ten se u modelových organismů projevuje deformacemi epididymis, chámovodů, prostaty, externího genitálu a kryptorchidismem.<sup>7, 8, 10, 13, 25</sup>

Tuto skutečnost v nedávném studiu demonstrovali V. S. Wilson et al. Exponovali gravidní samice Sprague - Dawley a Wistar potkanů di(2-ethylhexyl) ftalátu během období pohlavního derivování. Včetně fyzických změn samčích pohlavních orgánů prokázali i rozdílné hodnoty testosteronu a Insl3, které řídí vývoj těchto tkání. *In utero* ftalátem snížené úrovně testosteronu v samčích féttech, omezilo derivování epididymis ze základních Wolfových kanálků během organogeneze. Samci F1 generace vykazovali kompletní agenzi epididymální tkáně.<sup>14</sup>

V loňském roce byla na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové provedena první studie, jejímž cílem bylo prokázat, zda bude mít podání diethylftalátu gastrickou sondou vliv na samčí reprodukční orgány. Ftalát byl takto podáván po 10 dnů, během nichž byla sledována hmotnost zvířat a jejich potravní návyky. Po ukončení experimentu a usmrcení zvířat se zkoumala varlata i jiné orgány (ledviny, játra, duodenum a slezina). Odebrané orgány měly fyziologickou stavbu i velikost. V ledvinách bylo nalezeno překrvení glomerulárních kapilár, v červené pulpě sleziny se také vyskytlo výrazné překrvení a v parenchymu jater se našly místní změny zejména v cévní části lalůčků. Jaterní buňky lemující tyto sinusy jevily známky degenerace. Tato studie však neprokázala žádný vliv diethylftalátu na produkci zárodečných buněk.<sup>24</sup>

My jsme na toto téma navázali experimentem, ve kterém jsme prověřovali, zda při jednorázovém podání diethylftalátu intraperitoneálně a subkutánně bude mít tato látka nějaký vliv na spermatogenezi či nikoliv. Ftalát byl oběma skupinám podán ve stejný den. Po 12 – ti dnech jsme provedli euthanázii a odebrali potřebné orgány, které měli fyziologickou stavbu i velikost. V histologických preparátech zkoumaných pod světelným mikroskopem, byly, podobně jako v předchozí studii, v parenchymu jater nalezeny rozdílné velikosti jader Kupferových buněk a překrvené sinusoidy. V preparátech ledvin jsme pozorovali nápadné překrvení glomerulů. Preparáty varlat potvrdily výsledky z předchozí studie, tedy že spermatogeneze porušena nebyla.

## 10. ZÁVĚR

Zvířecím modelem v našem experimentu bylo deset samců potkana kmene Wistar o hmotnostech 240 – 280 g, na kterých jsme zkoušeli účinky jednorázového podání diethylftalátu. Potkani byli rozděleni do dvou skupin, označeni, zváženi a poté jim byl naaplikován diethylftalát. Skupině C byl do intraperitonea injekčně aplikován ředěný Oekanal v množství 0,2 ml, skupině D byl podán subkutánně neředěný Pestanal v množství 0,4 ml.

Po 12 - ti dnech byli potkani usmrceni a byly jim odebrány orgány. Skupině C varlata, skupině D kromě varlat i vzorek jaterní tkáně, ledvina, prostata a močový měchýř. Odebrané orgány měly fyziologickou stavbu a velikost. Z těchto orgánů jsme zhotovili histologické preparáty, které jsme prohlíželi pod světelným mikroskopem.

Výsledky v obou skupinách prokázaly, že v příslušných koncentracích neměl diethylftalát žádný vliv na spermatogenezi. V několika preparátech varlat skupiny D jsme našli infiltraci zánětlivými buňkami, jejichž přítomnost ovšem nemůže být s jistotou přisouzena působení diethylftalátu. Dále jsme našli nápadné překrvení glomerulů v ledvinách, které často až utlačovalo močovou štěrbinu, a v parenchymu jater jsme pozorovali rozdílné velikosti jader Kupferových buněk a překrvené sinusoidy.

## 11. SEZNAM LITERATURY

- <sup>1</sup> R. Čihák: Anatomie 2, Druhé, upravené a doplněné vydání; Grada Publishing Praha, 2002: 298-303 s.
- <sup>2</sup> <http://instruction.cvhs.okstate.edu/Histology/mr/HiMRP2.htm> (12. 2. 2009)
- <sup>3</sup> W. F. Ganong: Přehled lékařské fyziologie; Nakladatelství a vydavatelství H&H, 1995: 358 – 360 s.
- <sup>4</sup> D. D. Mruk, C. Yan Cheng: Sertoli-Sertoli and Sertoli-Germ Cell Interactions and Their Significance in Germ Cell Movement in the Seminiferous Epithelium during Spermatogenesis; Endocrine Reviews 2004; 25 (5): 747-806 p.
- <sup>5</sup> [http://en.wikipedia.org/wiki/Tight\\_junction](http://en.wikipedia.org/wiki/Tight_junction) (3. 2. 2009)
- <sup>6</sup> <http://en.wikipedia.org/wiki/Desmosomes> (3. 2. 2009)
- <sup>7</sup> [http://en.wikipedia.org/wiki/Gap\\_junction](http://en.wikipedia.org/wiki/Gap_junction) (3. 2. 2009)
- <sup>8</sup> G. Latini: Monitoring phthalate exposure in humans; Clin. Chim. Acta 2005; 361(1-2): 20-29 p.
- <sup>9</sup> G. Lottrup et al.: Possible impact of phthalates on infant reproductive health; Int. J. Androl. 2006; 29(1): 172–180 p.
- <sup>10</sup> G. Latini et al.: Phthalate exposure and male infertility; Toxicology 2006; 226(2-3): 90-98 p.
- <sup>11</sup> H. Frederiksen et al.: Metabolism of phthalates in humans; Mol. Nutr. Food Res. 2007; 51(7): 899 - 911 p.
- <sup>12</sup> R. Hauser and A. M. Calafat: Phthalates and human health; Occup. Environ. Med. 2005; 62(11): 806 - 818 p.
- <sup>13</sup> R. Kavlock et al.: NTP Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate; Reprod Toxicol. 2002; 16(5): 721 – 734 p.
- <sup>14</sup> V. S. Wilson et al.: Differential expression of the phthalate syndrome in male Sprague–Dawley and Wistar rats after in utero DEHP exposure; Toxicol Lett. 2007; 170(3): 177-184 p.

- <sup>15</sup> WHO: Diethyl phthalate; Concise International Chemical Assessment Document 52; ISBN 92 4 153052 9 (LC/NLM Classification: QV 612). ISSN 1020-6167, Geneva, 2003; final: 43 pp.
- <sup>16</sup> R. A. Faust et al.: Toxicity summary for diethyl phthalate; Prepared for: Oak Ridge Reservation Environmental Restoration Program 1994; final: 10 pp.
- <sup>17</sup> SCCNFP: Opinion of the Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products Intended for Consumers concerning Diethyl Phthalate, adopted by the SCCNFP during the 20th Plenary Meeting of 4 June 2002; final: 36 pp.
- <sup>18</sup> A. M. Api: Toxicological profile of diethyl phthalate: a vehicle for fragrance and cosmetic ingredients; Food Chem Toxicol. 2001; 39(2): 97-108 p.
- <sup>19</sup> <http://www.devicelink.com/emdm/archive/09/01/004.html> (17. 2. 2009)
- <sup>20</sup> B. D. Grove and A. W. Vogl: Sertoli cell ectoplasmic specializations: a type of actin-associated adhesion junction?; Journal of Cell Science 1989; 93(2): 309-323 p.
- <sup>21</sup> J. A. Guttman et al.: Evidence That Tubulobulbar Complexes in the Seminiferous Epithelium Are Involved with Internalization of Adhesion Junctions; Biol Reprod. 2004; 71: 548–559 p.
- <sup>22</sup> Chemical Information Profile for Diethyl Phthalate [CAS No. 84-66-2], Supporting Nomination for Toxicological Evaluation by the National Toxicology Program 2006; final: 16 pp.
- <sup>23</sup> I. Labunska, D. Santillo: Environmental and human health concerns relating to diethyl phthalate (DEP), a common ingredient in cosmetics and other personal care products; Greenpeace Research Laboratories Technical Note 06/2004, final: 5 pp.
- <sup>24</sup> M. Kohoutová: Poškození funkce spermií po krátkodobém působení ftalátu; Bakalářská práce; 2008: s. 44
- <sup>25</sup> Ren-Shan Ge et al: Phthalate ester toxicity in Leydig cells: Developmental timing and dosage considerations; Reprod Toxicol. 2007; 23(3): 366–373 p.



## 12. SEZNAM ZKRATEK

ABP – Androgen vázající protein

MIS – Müllerova inhibiční substance

FSH – Folikuly stimulující hormon

MAGUK – S membránou asociovaná guanylát kináza

ES – Ektoplazmatická specializace

TK – Tubulobulbární komplex

PVC – Polyvinylchlorid

DEHP – Di(2-ethylhexyl)ftalát

DEP – Diethylftalát

DBP - Dibutylftalát

DiBP – Di-iso-butylftalát

DnBP – Di-n-butylftalát

BBzP – Butyl-benzylftalát

DiNP – Di-iso-nonylftalát

DnOP – Di-n-octylftalát

InsI3 – Insulin like growth faktor 3

PPARs – Peroxisome Proliferator-Activated Receptors

DHT – Dihydrotestosteron

REACH - Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals

GA – Glutaraldehyd

UA – Uranyl acetát

ED – Epon-Durkupan