

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

**KATEDRA BIOLOGICKÝCH A  
LÉKAŘSKÝCH VĚD**

**APOPTÓZA A PROLIFERACE  
V TESTIKULÁRNÍ TKÁNI PO  
EXPERIMENTÁLNÍM POŠKOZENÍ  
(RIGORÓZNÍ PRÁCE)**

Vědní obor : Farmakologie a toxikologie

Školitel : Doc. RNDr. Vladimír Semecký, Csc.

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

Hradec Králové, červen 2006

Mgr. Adéla Hradecká

Děkuji doc. RNDr. Vladimíru Semeckému, CSc. Za to, že mi poskytl mnoho cenných rad a zkušeností, za odborné vedení a pomoc v průběhu vzniku této rigorózní práce. Děkuji PharmDr. Petru Nachtigalovi, PhD a Mgr. Martinovi Kopeckému za pomoc, rady a trpělivost. Moje poděkování patří také všem ostatním pracovníkům Katedry lékařských a biologických věd, kteří se buď přímo podíleli na experimentu, nebo na vytváření příjemné pracovní atmosféry během celého experimentu.

## **OBSAH**

<b>ZKRATKY POUŽITÉ V TEXTU.....</b>	<b>4</b>
<b>ÚVOD.....</b>	<b>6</b>
<b>TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>8</b>
MORFOLOGIE VARLAT A NADVARLAT.....	8
FUNKČNÍ ORGANIZACE VARLAT.....	13
ŘÍZENÍ TESTIKULÁRNÍ FUNKCE.....	21
HEMATOTESTIKULÁRNÍ BARIÉRA.....	24
VIMENTIN.....	27
KRYPTORCHISMUS A APOPTÓZA .....	32
BUSULFAN.....	41
<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>	<b>51</b>
MATERIÁL A METODIKA.....	51
APLIKACE BUSULFANU.....	53
HISTOLOGICKÉ ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ.....	54
STATISTICKÉ HODNOCENÍ.....	66
<b>VÝSLEDKY.....</b>	<b>67</b>
KRYPTORCHISMUS.....	67
BUSULFAN.....	74
<b>OBRAZOVÁ PŘÍLOHA.....</b>	<b>82</b>
<b>DISKUSE.....</b>	<b>92</b>
<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>103</b>
<b>LITERATURA.....</b>	<b>106</b>

**ZKRATKY POUŽITÉ V TEXTU**

<b>ABP</b>	- androgen binding protein
<b>AMH</b>	- anti-Mülleriánský hormon
<b>AMP</b>	- adenosin monofosfát
<b>AP-1</b>	- aktivační protein 1
<b>ATP</b>	- adenosin trifosfát
<b>Bcl</b>	- B-cell lymphosoma
<b>BSA</b>	- bovine serum albumine
<b>BrdU</b>	- bromodeoxyuridin
<b>BTP</b>	- blood-testis barrier
<b>CENP-F</b>	- centromer protein F
<b>CRGP</b>	- calcitronin gene-related peptide
<b>CX</b>	- connexin
<b>DAB</b>	- diaminobenzidin
<b>DD</b>	- death domain (doména)
<b>DHT</b>	- dihydroxytestosteron
<b>DMSO</b>	- dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	- deoxyribonukleová kyselina
<b>DR</b>	- death domain receptor
<b>EDMS</b>	- ethandimathensulfonát
<b>FADD</b>	- Fas activating death domain
<b>FasL</b>	- Fas ligand
<b>FasR</b>	- Fas receptor
<b>FSH</b>	- folikulostimulační hormon
<b>GFAP</b>	- glial fibrilal acidic protein
<b>GLUT</b>	- glukózový transportér
<b>GMP</b>	- guanosin monofosfát
<b>GnRH</b>	- gonadoliberin
<b>hCG</b>	- human choriogonadoliberin
<b>HDL</b>	- high density lipoproteins
<b>HSP</b>	- heat shock protein
<b>IF</b>	- intermediární filamenta
<b>INSL-3</b>	- insulin like peptide hormon

<b>LH</b>	- luteinizační hormon
<b>PBS</b>	- fosforečnanový pufr
<b>PCNA</b>	- proliferation cell nuclear antigen
<b>SEM</b>	- standardní chyba průměru
<b>SHBG</b>	- steroid hormon binding globuline
<b>SO</b>	- sham-operated
<b>TeBG</b>	- testosteron binding globuline
<b>TM</b>	- transmembránový
<b>TNF</b>	- tumor necrosis factor
<b>TRADD</b>	- tumor necrosis receptor activating death domain
<b>UA</b>	- uranylacetát

## ÚVOD

Zhoubné bujení lze definovat jako výsledek místně regulovaného růstu autonomní povahy, který vede ke vzniku atypických struktur. Nádor je složen z buněk, které se množí nezávisle na vrozeném „stavebním plánu“ organismu. O maligním nádoru (rakovině) mluvíme v případě, proniká-li nádorová tkáň do sousední zdravé tkáně a odplavují-li se nádorové buňky do jiných orgánů, kde mohou vytvořit dceřinné nádory, tzv. metastáze. Cílem léčby je odstranit všechny maligní buňky (kurativní terapie). Není-li to možné, je třeba se pokusit o zpomalení růstu nádoru a nemocnému tak prodloužit život nebo alespoň zlepšit jeho kvalitu (paliativní terapie) (Lüllmann et al., 2001).

Po onemocněních kardiovaskulárního systému zaujímají v současné době druhé místo v příčinách úmrtí nádorová onemocnění. Přes obrovský pokrok v posledních desetiletích nejsou výsledky chemoterapie zhoubného bujení uspokojivé. Hlavním důvodem a dosud nevyřešeným problémem je fakt, že buněčný metabolismus zdravých i nádorových buněk je v podstatě shodný, z čehož plyne, že veškeré zásahy, které ovlivněním shodných metabolických dějů ničí nádorové buňky, mohou poškozovat i buňky zdravé.

Předpokladem úspěšné chemoterapie je nalezení odlišností mezi nádorovou a zdravou buňkou a cílený chemoterapeutický zásah do určitého metabolického procesu. Vždy je žádoucí kombinace více zásahů,

které všestrannějším způsobem naruší nádorový růst (Hynie et al., 1984).

Díky možnostem současné medicíny může být asi jedna třetina nemocných zhoubným nádorem vyléčena lokální terapií – chirurgickým zásahem nebo ozařováním. Problémem však zůstává, že velká část tumorů vytváří velmi brzy mikrometastázy, jejichž účinná léčba vyžaduje systémový přístup jakým je chemoterapie, obvykle doplněná chirurgickou léčbou či ozařováním.

Cílem této rigorózní práce je posouzení vlivu cytostatika busulfanu a vimentinu na morfologický obraz tkáně varlete potkana, stav zárodečného epitelu a spermatogenezi. K vyhodnocení experimentu je použito histologických a imunohistochemických metod.

# TEORETICKÁ ČÁST

## MORFOLOGIE VARLAT

### A NADVARLAT

#### VARLE

*Varle* (testis) je párová mužská pohlavní žláza ovoidního tvaru. Jeho délka je 4 – 5 cm a šířka 2 – 3 cm, hmotnost se pohybuje mezi 18 až 25 g. Zadní okraj varlete překrývá nadvarle, spolu s nímž je umístěno v šourku (skrotu). Testikulární obal tvoří tři vrstvy membrán – viscerální tunica vaginalis, tunica albuginea a tunica vasculosa.

Membrána tunica albuginea se do varlete rozšiřuje ve formě vazivových sept (septula testis), čímž dochází k vytvoření více než 250 pyramidálních lalůček (lobuli testis). Tyto lalůčky jsou orientovány bází směrem k povrchu varlete a jejich vrcholky směřují k hilu varlete. Uvnitř každého lalůčku jsou 2 - 3 stočené semenotvorné kanálky (tubuli seminiferi contori). Vnitřní stěna těchto kanálků je vystlána spermiogenním epitelem (epithelium spermatogenicum), ze kterého se v pubertě začínají diferencovat spermie.

V hilu varlete se stočené semenotvorné kanálky postupně spojují do 20 – 30 seminiferi recti, které jsou navzájem propojeny, takže tvoří síťovité rete testi. Z této sítě vzniká dalším spojováním 10 – 20 širších vývodných kanálků, ductuli efferentes testis, jež vstupují do nadvarlete. Vazivo, v němž leží tubuli recti, začátky ductuli efferentes a kde končí přepážky oddělující lalůčky varlete, se nazývá mediastinum



testis. V každém varleti je přes 300 m semenotvorných kanálků, přičemž představují 80 – 90 % testikulární hmoty. Tyto kanálky jsou tvořeny bazální membránou, na kterou nasedají buňky spermatogenní vývojové linie a specifické podpůrné Sertoliho buňky (epitheliocytus sustentans) (Dylevský et al., 2000).

Shluky vazivové tkáně, nervy, krevní a lymfatické cévy vyplňují prostor mezi semenotvornými kanálky. Testikulární kapiláry jsou fenestrované a dovolují volnou pasáž makromolekul, jako jsou např. krevní bílkoviny. Vazivo je složeno z různých typů buněk zahrnujících fibroblasty, nediferencované vazivové elementy, žírné buňky a mikrofégy. Během puberty se též objevují Leydigovy buňky (endocrinocytus interstitialis) (Junqueira et al., 1997).

V okolí nadvarlete vstupují do varlete tepny a nervy a vystupují z něj žíly a lymfatické cévy, formuje se zde tzv. hilus testis. Krví jsou varlata zásobena především z testikulárních tepen, které jsou větvemi arteria spermatica interna. Po přestupu složitou kapilární sítí vstupuje krev do četných testikulárních žil, které utvářejí anastomozující síť – plexus pampiniformis. Propojením této sítě vzniká vena spermatica interna. Pravá vena spermatica ústí přímo do vena cava, levá vstupuje do renální vény. Bohatá je také lymfatická drenáž varlete.

Inervace varlete je zajištěna nervovou pletení přicházející podél cév (plexus testicularis), která obsahuje vlákna senzitivní, sympatická a parasympatická. Stočeným kanálkům chybí senzitivní vlákna, obal varlete je bohatě inervován. Z tohoto důvodu jsou onemocnění nebo zranění varlete velice bolestivá (Dylevský et al., 2000).

## NADVARLE

*Nadvarle* (epididymidis) je protáhlý trubicovitý orgán umístěný na zadním obvodu varlete. Masivnější část, hlava (caput epididymidis), sestupuje po zadním obvodu varlete v tělo (corpus epididymidis) a zužuje se v ocas (cauda epididymidis), dále přecházející v chámovod. Povrch nadvarlete je tvořen silnou vazivovou membránou, která je pevně spojena s vazivem uvnitř nadvarlete. Do hlavy nadvarlete vstupuje 8 – 12 vývodných kanálků (ductuli efferentes testis). Tyto kanálky uvnitř nadvarlete formují lalůčky (lobuli epididymidis).

V každém lalůčku je točitý kanálek o délce asi 15 cm, do něhož ústí vždy několik vývodných kanálků varlete. Kanálky lalůček se ze strany napojují do jediného vývodu nadvarlete (ductus epididymidis). Kanálek může být až 6 m dlouhý, zpočátku je uložen na zadním obvodu hlavy, poté je mnohonásobně stočen a tvoří tělo a ocas nadvarlete, dále přechází v chámovod. Jeho vazivová stěna obsahuje množství cirkulárně uspořádané hladké svaloviny, vnitřní povrch kanálků je vystlán víceřadým cylindrickým epitelem vybaveným mikrokly. Epitel produkuje kyselý sekret, který znehybňuje spermatozoa (spermie) a šetří jejich minimální energetické rezervy. Před poškozením nízkým pH jsou spermatozoa chráněna zásaditým koloidním roztokem, který si přinášejí ze semenotvorných kanálků varlete. Tyto kanálky se vyprazdňují do vysoce propojené anastomozující sítě vývodů nazývaných rete testis.

Spermatozoa jsou dále transportována kanálky ductuli efferentes do ductus epididymidis prostřednictvím tlaku testikulární tekutiny, pohybu řasinek a stahů přívodních kanálků. Posun spermií celým nadvarletem trvá 12 – 14 dnů; během této doby podléhají spermatozoa morfologickým a funkčním změnám nutným pro zárodečné buňky, aby získaly schopnosti potřebné k oplození vajíčka. Nadvarle též slouží jako zásobník spermatu. Při déletrvajícím sexuální abstinenci se spermie rozpadají a jsou fagocytovány tzv. spermatofágy. Cévní zásobení i inervace nadvarlete jsou v principu stejné jako u varlete (Dylevský et al., 2000).

### **PŘÍDATNÉ STRUKTURY**

Varle s nadvarletem jsou uloženy pod stydkou sponou ve vaku zvaném *šourek* (scrotum). Má hruškovitý až kulovitý tvar a je rozdělen mediáním septem (septum scroti) na dvě poloviny; jeho polohu na kůži udává šev (raphe scroti). Stavba šourku je vrstevnatá, přičemž jednotlivé vrstvy odpovídají vrstvám břišní stěny (Zrzavý et al., 1978).

*Chámovod* (ductus efferentes) je párový orgán, dlouhý 35 – 40 cm, se silnou vrstvou hladké svaloviny. Tvoří součást semenného provazce spolu s testikulární arterií, plexus pampiniformis a svazky nervových vláken. Před vstupem do prostaty se chámovod rozšiřuje v úsek zvaný ampulla ductus deferentis, v jejíž koncové části vyúsťují do ductu semenné váčky (vesiculae seminales). Následně se ductus zanořuje do prostaty

segmentem zvaným ductus ejaculatorius a otevírá do příslušné části uretry.

*Semenné váčky* (vesiculae seminales) jsou přídatné pohlavní žlázy tvořené alveolárními žlázami, pojivovou tkání a svalovinou. Jsou párovým orgánem produkujícím viskózní nažloutlý sekret, který tvoří 60 – 70 % ejakulátu člověka. Obsahuje látky aktivující spermie jako je fruktóza, kyselina askorbová, fosforylcholin, ergothionein, flaviny a prostaglandiny.

Další přídatnou pohlavní žlázou je *prostata*. Jedná se o tuhý svalově žlaznatý orgán, který obklopuje fibroelastické pouzdro bohaté na hladkou svalovinu. Představuje soubor 30 – 50 větvených tuboalveolárních žlázek, jejichž vývody se otevírají do prostatické části uretry. Mezi tyto žlázy patří slizniční, submukózní a hlavní žlázy. Prostata vytváří tekutinu specifické vůně, která obsahuje spermin, kyselinu citronovou, cholesterol, fosfolipidy, fibrinolysin, fibrinogenázu, zinek a kyselou fosfatázu, přičemž ji v sobě skladuje až do okamžiku ejakulace.

Další kapalina pro semennou plasmu pochází z *Cowperovy žlázy* (glandulae bulbourethrales) umístěné proximálně od membranózního úseku uretry, do které se vyprazdňuje. Jedná se tuboalveolární žlázu produkující hlen, který má lubrikační funkci (Junqueira et al., 1997).

## FUNKČNÍ ORGANIZACE VARLAT

Mezi základní funkce varlat patří spermatogeneze a steroidogeneze, odehrávají se ve dvou různých kompartmentech varlat, které se od sebe liší morfologicky i funkčně. Přesto, že jsou anatomicky odděleny, ve své činnosti na sebe úzce navazují. Spermatogeneze se odehrává v tubulárním kompartmentu – semenotvorných kanálcích, steroidogeneze převážně v intersticiu mezi kanálky. Oba tyto děje jsou řízeny jednak z vyšší etáže hypothalamo-hypofyzární, jednak lokálními faktory parakrinně a autokrinně (Pacík, publikace v tisku).

### INTERSTICIUM

U člověka představuje intersticiu 12 – 15 % celkového objemu varlat a zahrnuje endokrinní funkci spočívající v tvorbě steroidních androgenů. Vlastními endokrinními elementy jsou *Leydigovy buňky*. Ve většině případů jsou zakulacené či polygonální, obsahují centrálně uložené jádro a eosinofilní cytoplazmu bohatou na malé tukové kapénky obsahující cholesterol. Ten je substrátem pro enzymy štěpící postranní řetězce, které jsou přítomné v mitochondriích Leydigových buněk. Produktem této reakce je pregnenolon, který dále prochází řadou proměn vrcholících v syntézu mužského pohlavního hormonu testosteronu. Syntéza je zprostředkována enzymy hladkého endoplazmatického retikula.

Činnost i počet Leydigových buněk závisí na hormonálních podnětech. V průběhu těhotenství přechází z mateřské krve do plodu placentární gonadotropní hormon a stimuluje početné intersticiální buňky fetálního varlete k produkci androgenů (fetální Leydigovy buňky). Tyto intersticiální buňky zůstávají plně diferencovány až do poloviny pátého měsíce těhotenství, poté regredují. Po zbytek těhotenství zůstávají vlastní Leydigovy buňky v klidu a to až do prepubertálního období, kdy znovu začnou syntetizovat testosteron jako odpověď na podněty luteizačního hormonu hypofýzy. Testosteron zajišťuje přímo nebo nepřímo embryonální diferenciaci vnějšího a vnitřního genitálu mužským směrem, mužský sekundární vývoj v pubertě a uchování libida a potence v dospělosti u mužů.

Kromě vlastních endokrinních elementů, Leydigových buněk, jsou ostatními součástmi vmezeřené tkáně elementy krevního a lymfatického oběhu, nervy, pojivo a buňky imunitního systému – makrofágy a lymfocyty (Junqueira et al., 1997).

### **TUBULÁRNÍ SLOŽKA**

Funkcí tubulární složky je spermatogeneze, která probíhá v hlavní části varlat – výstelce semenotvorných kanálků. Do terminativního epitelu jsou vnořeny *Sertoliho buňky*, jež představují 35 – 40 % jeho objemu. Tvoří podpůrnou strukturu ve stavbě kanálků a jejich úkolem je podporovat spermatogenezi jak topograficky, tak metabolicky (Pacík, publikace v tisku).

Sertoliho buňky jsou podlouhlé elementy tvaru pyramidy, z části obklopující buňky semenotvorné linie četnými postranními výběžky. Jejich báze přisedají k bazální lamině, zatímco jejich volné apikální konce často vyčnívají do lumen semenotvorných kanálků. Tyto buňky obsahují hojné hladké endoplazmatické retikulum, mitochondrie, lysozomy, drsné endoplazmatické retikulum a dobře vyvinutý Golgiho komplex. Mají protáhlé jádro, které často nabývá trojúhelníkového tvaru. Na úrovni spermatogonií jsou přiléhající Sertoliho buňky k sobě poutány pomocí těsných spojení (tight junctions), které zprostředkovávají jejich iontové a elektrické propojení (Junqueira et al., 1997).

Funkční i morfologická diferenciací a zrání zárodečných buněk odehrávající se mezi Sertoliho buňkami je koordinována prostřednictvím řady působků jimi produkovány – steroidy, proteiny, cytokiny, růstovými faktory, opioidy, prostaglandiny a modulátory buněčného dělení. Objem varlat u člověka je výrazně ovlivněn počtem Sertoliho buněk, který roste až do 15. roku věku. Jejich proliferační aktivita je stimulována androgeny a folitropinem (FSH). Jakmile první zárodečné buňky podstoupí první meiotické dělení, dělení Sertoliho buněk je ukončeno.

Sertoliho buňky rozdělují semenotvorný epitel na dva hlavní prostory, bazální a adluminální prostor. Spermatogonie ležící v bazálním kompartmentu mají volný přístup k látkám obsaženým v krvi. V průběhu spermatogeneze postupuje potomstvo spermatogonií tímto systémem mezibuněčných kontaktů a ocitá se v adluminálním kompartmentu.

V něm jsou pokročilejší stádia buněk spermatogenní linie chráněna před produkty přinášenými krví bariérou krev-testis. Tato bariéra je vytvářena právě těsným spojením Sertoliho buněk a procházejí přes ní androgeny, méně progesteron a estrogeny, přičemž zabraňuje přechodu krevních bílkovin, cholesterolu nebo kortikoidů z intersticiálního prostoru do lumina semenotvorných kanálků (Pacík, publikace v tisku ).

**Hlavní funkce** Sertoliho buněk jsou :

- mechanická podpora, ochrana před metabolity z krve nebo před imunologickým atakem, regulace výživy vyvíjejících se spermií
- fagocytóza přebytku cytoplazmatických fragmentů spermatid pomocí lysozomů Sertoliho buněk
- sekrece tekutiny do lumina semenotvorných kanálků, která odtéká směrem k vývodním cestám pohlavním a je využívána k transportu spermií
- produkce anti-mülleriánského hormonu (glykoproteinu, který vyvolává v embryonálním vývoji u mužských plodů regresi Müllerových vývodů)

Mezi další funkce Sertoliho buněk patří jejich schopnost konvertovat testosteron na estradiol, vylučování vazebného proteinu pro androgeny a vylučování inhibinu (pod kontrolou FSH a testosteronu) a omezování syntézy a uvolňování FSH v adenohipofýze. Všechny tyto jejich funkce



jsou nezbytné pro zdárný průběh spermatogeneze. Sertoliho buňky jsou neobyčejně odolné vůči nepříznivým podmínkám jako je infekce, malnutrice nebo pronikavá radiace.

Kromě Sertoliho buněk se v tabulární části vyskytují peritubulární buňky (myofibroblasty), které obsahují aktin a mají schopnost spontánní kontrakce. Jsou prostupné pro androgeny a metabolické složky nutné pro vývoj germinativního epitelu.

*Buňky spermatogenní vývojové linie* jsou seskupeny do 4 – 8 řad, které zaujmají prostor mezi bazální laminou a průsvitem tubulu. Tyto buňky se několikrát opětovně dělí a nakonec diferencují ve spermie v procesu spermatogeneze.

Vývoj spermií, který je základní tubulární funkcí, je zahajován dělením kmenových buněk a končí tvorbou zralých spermatozoí. Probíhá v semenotvorných kanálcích varlete, a to ve dvou po sobě následujících etapách – *spermatocytogenezi* a *spermiogenezi*.

Při *spermatocytogenezi* spermatogonie (primitivní zárodečné buňky nasedající na bazální membránu semenotvorných kanálků) při dosažení pohlavní zralosti procházejí řadou mitotických dělení a nově vzniklé elementy sledují jednu ze dvou následujících cest :

- po jedné či dvou mitózách mohou zůstat jako nediferencované kmenové buňky – spermatogonie typu A
- v průběhu následujících mitotických cyklů se diferencují na spermatogonie typu B schopné dalšího vývoje

Spermatogonie typu B se vyvíjejí v zárodečné buňky s diploidní sadou chromozómů v jádře (spermatocyty prvního řádu), které vstupují do miózy zahrnující dvě po sobě následující dělení – první a druhé zrací dělení (perioda zrání). Ke zdvojení DNA (4N DNA) dochází krátce před zdvojením miózy, tudíž každý spermatocyt obsahuje dvojnásobné množství DNA (46 chromozómů), přičemž každý chromozóm je tvořen dvěma chromatidami. Mezi největší buňky spermatogenní linie patří primární spermatocyty, zaujímají střední vrstvu semenotvorných kanálků a jejich jádra jsou charakteristická přítomností chromozómů v různých fázích spiralizace. Primární spermatocyty vstupují do první meiotické profáze, během níž prochází čtyřmi stádii – leptogenní, zygotení, pachytenní a diplotenní. Tato profáze dospívá do stádia diakineze ústící v separaci chromozómů. Celá profáze trvá okolo 22dnů, poté buňky vstupují do metafáze a v následující anafázi postupují chromozómy k protilehlým pólům.

Jako výsledek prvního meiotického dělení vznikají menší buňky, tzv. sekundární spermatocyty (presmermatidy), které obsahují 23 jaderných chromozómů zdvojených ve 2 chromatidy (2N DNA). Tyto buňky jsou uloženy v germinativním epitelu ve 2 – 3 vrstvách a rychle vstupují do druhé fáze meiotického dělení. Jejich rozdělením vznikají spermatidy obsahující 23 jednotlivých chromozómů tvořených jednou chromatidou (1N DNA). Výsledkem celého meiotického dělení jsou buňky s haploidním počtem chromozómů. (Při oplození pak splývají

haploidní spermie s haploidním oocytem v diploidní buňku – zygotu).

Dále spermatidy procházejí složitým vývojem zvaným *spermiogeneze*. Dochází k diferenciaci zahrnující tvorbu akrosomu, kondenzaci a protažení jádra, vývoji bičíku a ztrátě většiny cytoplazmy. Výsledkem je spermie (spermatozoon), která je následně uvolněna do lumen semenotvorného kanálku. Poslední fáze dozrávání spermií se odehrává v nadvarleti. Formování a zrání lidských spermií tímto uspořádaným procesem spermatogeneze z primitivních zárodečných buněk trvá asi 74 dní (Junqueira et al., 1997).

U potkana kmene *Wistar* trvá tento proces přibližně 42 dní. Leblond et al. Rozlišili 19 stupňů spermiogeneze a 14 stádií semenotvorného epitelu, přičemž se několik generací vyvíjí současně – čím je buňka zralejší, tím se vyskytuje blíže k lumen tubulu (Leblond et al., 1952).

U potkana je semenotvorný epitel složen z různě vyzářlých typů pohlavních buněk, které jsou uloženy nad sebou směrem od bazální membrány do lumen kanálků – spermatogonie, spermatocyty I. řádu, spermatocyty II. řádu, spermatidy a spermatozoa. Z některých typů spermatogonií, z tzv. kmenových buněk, vznikají proliferující spermatogonie označované jako  $A_0$  a  $A_1$  typ.  $A_1$  typ se 4krát mitoticky dělí a vznikají  $A_1$  –  $A_4$  generace. Z typu  $A_4$  vznikají buď nové  $A_1$  spermatogonie jako neustále se obnovující zdroj nových pohlavních buněk, nebo se dále vyvíjejí do intermediálního typu. Z intermediálního typu

vzniká miózou B typ spermatogonií, který je četnější než typ A a je kompletněji obklopen Sertoliho buňkami (Johnson, 1970). Mitotickým dělením spermatogonií typu B vznikají primární spermatocyty, které se meioticky dělí a počet jejich chromozómů se redukuje na polovinu – vznikají sekundární spermatocyty. Ty se rychle dělí a vznikají populace haploidních spermatid. Nově vytvořené spermatidy se už nedělí a v procesu spermiogeneze se z nich tvoří zralé gamety – spermatozoa, uvolňující se do lumen kanálků (Maršala, 1983).

K hodnocení proliferační aktivity zárodečných buněk v průběhu spermatogeneze se používalo morfometrické hodnocení histologických řezů nebo hodnocení počtu zárodečných buněk po jejich zničení ozářením rentgenovým zářením. Metodou, která se stále využívá, je audiografická detekce  $^{13}\text{C}$ -thymidinu nebo  $^3\text{H}$ -thymidinu. Častěji se však používá imunohistochemický průkaz bromodeoxyuridinu (BrdU), který se zabudovává v průběhu S-fáze buněčného cyklu do DNA. V současné době se k experimentálnímu určování buněčné proliferace používá zejména detekce antigenů, které jsou selektivně exprimovány v průběhu různých fází buněčného cyklu. Jako markery proliferační aktivity buněk jsou dnes využívány např. tyto proteiny – **PCNA** (Proliferating cell nuclear antigen), **Ki-67**, méně často potom **G<sub>1</sub>/S** cykliny nebo **CENP-F** (Centromere protein F).

## ŘÍZENÍ TESTIKULÁRNÍ FUNKCE

Vedle spermiogeneze je nejdůležitějším procesem, který probíhá ve tkáni varlat tvorba steroidních androgenních hormonů. *Androgeny* hrají klíčovou roli v regulaci vývoje kmenových buněk, přičemž jsou tyto účinky zprostředkovány androgenními receptory v semenotvorných tubulech. Primární úloha je připisována Sertoliho buňkám, ačkoli existují doklady o přítomnosti androgenních receptorů i v populaci kmenových buněk (Winters, 1987). Androgenní receptory se nacházejí také v peritubulárních myoidních buňkách kolem semenotvorných kanálků (Suaréz-Quian et al., 1999).

Jako u většiny ostatních živočichů je hlavním androgenem u člověka testosteron; kromě testosteronu se do krve z varlat dostávají i některé další androgeny, zejména dehydroepiandrosteron. Podobně jako ostatní steroidní hormony se testosteron váže v krvi na protein, který se nazývá steroidní hormon-vázající globulin (Steroid Hormon Binding Globulin – SHBG nebo Testosteron Binding Globuline – TeBG). Testosteron má povahu prohormonu, který je v tkáních metabolizován 5- $\alpha$ -reduktázou na mnohem účinnější metabolit – dihydrotestosteron (5- $\alpha$ -DHT) (Trávníček et al., 1978).

Testosteron, popř. dihydrotestosteron, vznikající v Sertoliho buňkách a v některých orgánech, podporuje růst penisu, semenotvorných kanálků a šourku. Testosteron i FSH jsou potřebné pro

tvorbu a zrání spermií, podporují sekreční činnost prostaty (snížením viskozity ejakulátu) a semenných váčků (přimícháním fruktózy a prostaglandinů) a také podporují sekreční činnost mazových a potních žláz v oblasti podpaží a genitálu. Testosteron zvyšuje tloušťku kůže, pigmentaci skrota, stimuluje růst hrtanu – mutování, ochlupení stydké krajiny, podpaží, hrudníku a vousů, jeho přítomnost je odpovědná za vypadávání vlasů u mužů. Rovněž podporuje libido a agresivní chování, snižuje koncentraci HDL (high density lipoproteins) (Silbernagel et al., 2001). V ledvinách stimuluje renální retenci elektrolytů a tvorbu erytropoetinu, který je hlavním růstovým faktorem pro kmenové buňky krvinek červené řady (Čihák, 1988). Podporou růstu svalů a kostí (tvorbou proteinů), růstu kostí do délky, jejich mineralizací a uzavřením epifyzárních štěrbin ovlivňuje testosteron tělesnou výšku a stavbu, mužské pohlavní znaky lebky a pánve, větší robustnost kostí apod.

Gonadotropní hormony adenohipofýzy řídí uvolňování testosteronu a činnost varlat. Plzní sekrece gonadoliberinu (GnRH) vyvolává v předním laloku hypofýzy výdej folitropinu (FSH) a lutropinu (LH), přičemž je tato sekrece inhibována prolaktinem. LH pak podporuje růst Leydigových intersticiálních buněk varlete a sekreci testosteronu, což zpětnovazebně inhibuje uvolňování GnRH a LH. FSH podporuje v Sertoliho buňkách tvorbu inhibinu, který tlumí uvolňování FSH i proteinu vázajícího androgen (ABP).

*Snížená sekrece androgenů* může být zapříčiněna nedostatkem GnRH, např. při poškození hypotalamu (tumory, ozařování, genetické defekty) či při fyzické a psychické zátěži. Další příčinnou může být inhibice pulzního uvolňování gonadotropinu prolaktinem a rovněž poškození hypofýzy (tumory, hyperplazie, traumata) nebo varlete (geneticky, celková těžká onemocnění). Dále mohou účinek androgenů ovlivňovat enzymatické defekty v hormonální syntéze nebo defekty receptoru pro testosteron.

Možnými příčinami *nadbytku androgenů* může být enzymatický defekt v syntéze steroidních hormonů, tumor produkující testosteron nebo iatrogenní podávání. Nadměrná produkce androgenů nebo umělá aplikace testosteronu může mít za následek omezenou fertilitu u mužů i žen a maskulinizaci (virilizaci) ženského organismu.

Generativní porucha varlete však může být omezena i bez znatelných poruch produkce pohlavních hormonů, např. při chybějícím sestupu varlete (kryptorchismus), při genetických defektech nebo poškození varlete (záněty, ozařování, poruchy prokrvení) (Silbernagl et al., 2001).

Kromě testosteronu jsou pro řízení testikulární funkce nezbytné některé *lokální faktory* s parakrinním, autokrinním a intrakrinním působením, jako např. růstové faktory, interleukiny a inhibin s aktivinem (Pacík, publikace v tisku).



## HEMATOTESTIKULÁRNÍ BARIÉRA

Morfologickým podkladem hematotestikulární bariéry (blood-testis barrier, BTB) je uspořádání Sertoliho buněk. Tato bariéra se funkčně projevuje rozdílným složením extracelulárních tekutin na obou stranách – mezi krví a lumen semenotvorných kanálků varlete. Prokázána byla pozorováním, že testikulární tekutina obsahuje jen velice málo látek, které jsou přítomné v krvi. Za tuto bariéru je zodpovědný systém těsných spojení, tight junctions, vytvořený mezi Sertoliho buňkami. Spojení jsou vytvořena blízkými membránami protilehlých Sertoliho buněk, ukazují místa vymizení intracelulárních prostor, což viditelně přispívá k účinnosti BTB (Johnson et al., 1977).

Mezibuněčná spojení ve varlatech jsou :

- **tight junction** – vytvářejí souvislý pás, a tím obkružují obvod buňky, jsou vytvářeny prostřednictvím integrálních membránových proteinů, jako je např. occludin nebo claudiny
- **adherens junction** – obkružuje jako pás jednotlivé buňky, přispívá k jejich soudržnosti a zajišťuje tak mechanické spojení těchto buněk
- **desmosom** – struktura vytvořená na povrchu buňky, je přiřazena k podobné struktuře buňky sousední; jsou rozmístěny podél postranních membrán většiny epitelových buněk; zajišťují bodové, obzvláště pevné spojení buněk



- **gap junction** – volné spojení, vyskytující se prakticky kdekoli podél bočních membrán epitelových buněk; toto spojení zajišťuje metabolické a elektrické propojení buněk, jejich kooperaci a předávání informací během vývoje i během funkce jednotlivých orgánů; jsou tvořeny integrálními membránovými proteiny – coonexiny.

Kromě cytoplazmatických membrán Sertoliho buněk a tight junctions tvoří složitou morfologickou a funkční jednotku endotolvé buňky kapilár, včetně jejich bazálních membrán, peritubulárních myoidních buněk nacházejících se kolem semenotvorných kanálků a vlastní bazální membrána kanálků.

Takto funkčně propojené komplexy se u potkana vyvíjejí mezi 15. – 18. dnem po narození, tudíž ve stejný čas, kdy se v semenotvorných kanálcích objevují spermatocyty. Diferencující se spermie by mohly být organismem rozpoznány jako cizorodé a provokovat imunitní odpověď vedoucí k jejich zničení. BTB vylučuje jakýkoli kontakt mezi vyvíjející se spermii a imunitním systémem, zamezuje prostupu imunoglobulinů do lumen semenotvorných kanálků. Navíc bariéra chrání zárodečné buňky před působením toxických látek obsažených v krvi (Junqueira et al., 1997).

Tekutina obsažená v lumen semenotvorných kanálků obsahuje malé množství glukózy a bílkovin, je bohatá na androgeny, estrogeny, draslík, inositol a na kyselinu glutamovou a asparagovou. Toto složení se liší od složení

krevní plazmy či lymfy a je závislé na funkci hematotestikulární bariéry (Ganong, 1997).

## **VIMENTIN**

Intermediární filamenta jsou jednou z hlavních strukturálních složek cytoskeletonu spolu s aktiniovými mikrofilamenty a s mikrotubuly. Cytoskeleton hraje důležitou roli při kontrole a regulaci mnoha buněčných funkcí zahrnujících kontrakci, migraci, proliferaci, syntézu proteinů, genovou expresi a apoptózu. V buňkách jsou intermediární filamenta relativně hojná, přičemž se v nich vyskytují od jádra až po buněčnou membránu. To naznačuje, že intermediární filamenta mají důležité mechanické vlastnosti v poskytování strukturální stability buněk a ve vysílání nebo transdukci mechanických signálů na biologické odpovědi (reakce) (Wang et al., 2002).

### **Intermediární filamenta (IF)**

Svoji tloušťkou (10 – 12 nm) stojí IF mezi mikrofilamenty (7nm) a mikrotubuly (23 nm). IF se nacházejí v cytoplasmě a také v jádře (laminy – IF typu V). Na rozdíl od mikrofilament a mikrotubulů jsou IF tvořena z různých typů vláken, která jsou specifická pro daný typ buněk. Podle struktury se IF dělí do šesti skupin : IF typu I a II zahrnují cytokeratiny, kterých je známo více než 20 typů. Mezi IF typu III jsou řazeny **vimentin**, desmin, GFAP (glial fibrilal acidic protein) a peripherin. IF typu IV se nacházejí v neuronech, jedná se o neurofilamentový protein a  $\alpha$ -internexin. Další nově popsaná IF se většinou označují jako IF typu VI – nestin, synemin, paranemin a tanabin (Evans, 1998; Paramio et al., 2002).

Hlavní funkcí IF je funkce strukturní. Podílí se na udržování tvaru buněk, rozmístění některých organel, na propojení buněk ve tkáních a tvoří základní zpevňovací síť a organizační základ celého cytoskeletu. Na rozdíl od dřívějších názorů, že se IF nepodílejí na pohybových funkcích buňky, se ukazuje, že i některá IF jsou dynamickou strukturou, podílející se na transportních funkcích uvnitř buňky, interagují s různými molekulami – kinázy, fosfatázy – a mají tudíž také schopnost modulovat jejich funkce (např. vimentin ovlivňuje funkci fosfolipázy  $A_2$ ) (Helfand et al., 2004; Junqueira et al., 1999; Paramio et al., 2002).

**Vimentin** vytváří filamenta, která jsou typická pro buňky mezenchymového původu (např. fibroblasty, chondroblasty, mikrofégy, endotelové buňky, hladká svalovina cév) a embryonální nebo nediferencované buňky. Molekulová hmotnost vimentinu je 56 – 58 kDa (Junqueira et al., 1999). Je nezbytný při vitálních mechanických a biologických funkcích jako jsou kontraktilita, migrace, rigidita buněk, výztuha buněk a proliferace.

Na základě dřívějších výzkumů se vědci domnívali, že vimentin má pouze minoritní roli při buněčných funkcích a jeho role byla spíše kontroverzní. Objevilo se několik důkazů, že vimentin není nezbytně nutný pro některé buněčné funkce. Např. kolaps vimentinových vláken ve fibroblastech nezpůsobil žádné zjevné změny ve změnách tvaru buněk. Buněčný růst a proliferace nejsou ovlivněny nedostatečností vimentinových sítí. Na úrovni celých zvířat a tkání, se myši s nedostatkem vimentinu nevyznačují zřejmými rozdíly ve vyvinu, množení a

strukturálními nebo fyziologickými odlišnostmi různých tkání a orgánů (Wang et al., 2002).

Spousta současných prací však silně naznačuje, že vimentin je opravdu nezbytný pro mnoho životních funkcí buněk. Je dokázáno, že mikroinjikování peptidů intermediárních filament do kultury fibroblastů způsobí hluboké změny ve tvarech buněk, mikrofilament a mikrotubulů. Porovnávají-li se primární fibroblasty odebrané z vimentin-deficitních myších embryí s fibroblasty z normálních myších embryí, zjistí se, že vimentin-deficitní buňky se vyznačují úbytkem motility, chemotaktické migrace a opožděným hojením ran. Také buněčná proliferace vimentin-deficitních buněk je pomalejší v důsledku poklesu syntézy DNA. Tento výsledek popírá dřívější názor, že mitóza není u buněk s nedostatkem vimentinu změněna (Wang et al., 2002).

### **Struktura a motilita vimentinu v buňkách**

Široká škála metod molekulární biologie poskytuje pohled na mechanismy podílející se na dynamických vlastnostech vimentinu. Je-li vimentin mikroinjikován do buněk, rychle se formují oddělené částice, které jsou později inkorporovány do sítě endogenního vimentinu. To ukazuje, že se exogenní vimentin může inkorporovat do endogenního vimentinu, což naznačuje, že jejich rovnováha je regulována rovnováhou mezi podjednotkami vimentinu a vimentinem polymerizovaným do vláken. Výměna podjednotek je nepolární a vyskytuje se podél celé délky polymerizovaných intermediárních filament (Helfand et al., 2004).

Studie prováděná na nehybných buňkách zpracovaných pro imunofluorescenci, v určitých

časových intervalech rozkladného procesu, následovaného trypsinizací a rozmístováním buněk, odhaluje, že formace sítě intermediárních filament je komplexní proces s mnoha dílčími kroky. Krátce po rozmístění buněk začíná vimentin formovat juxt nukleární „čepičku“ a početné ne-filamentové a s membránou nevázané proteinové agregáty („částičky“), které se dispergují do celé cytoplazmy. Během 1 – 2 hodin se počet vimentinových částic snižuje. Po 4 – 6 hodinách jsou vimentinové částice zřejmě pouze v některých periferních částech, pravděpodobně vzhledem k hojnosti dlouhých fibril, které jsou příkladem mezifáze sítě intermediárních filament v cytoplazmě. Proto mohou být tyto částice považovány za prekurzory shromažďování dlouhých intermediárních filament. Výsledek tohoto experimentu naznačuje, že nejméně 2 morfologicky zřetelné strukturální formy (částice vimentinu a dlouhá intermediární filamenta) se shromažďují ve vysoce regulovaném procesu, aby formovaly rozsáhlou cytoskeletární síť (Helfand et al., 2004).

Strukturální uspořádání vimentinových intermediárních filament v buňkách naznačuje, že snesou stres vyvolaný tahem. Fyzikální interakce buňka-buňka se dramaticky snižují u vimentin-deficitních buněk na rozdíl od buněk bez deficitu vimentinu. Z toho plyne, že vimentin je důležitý pro udržování mechanických interakcí mezi buňkami, pravděpodobně přenosem některých kontraktilních sil generovaných buňkami. Tyto výsledky ukazují, že vimentinová intermediární filamenta jsou potřebná pro mechanickou sílu buněčného cytoskeletonu a pro ochranu buněčné strukturální integrity (Helfand et al., 2004).

Intermediární filamenta v dospělých Sertoliho buňkách jsou vimentinového typu (Franke et al., 1979). Vimentin se vyskytuje v bazální a perinukleární oblasti Sertoliho buněk a vyzařuje do apikální cytoplazmy, kde se spojuje se specializovanými membránovými strukturami – něco jako dezmosomy – mezi Sertoliho buňkami a sousedními zárodečnými buňkami. Zdá se, že vimentinová filamenta hrají roli při zakotvení zárodečných buněk v semenotvorném epitelu (Amlani and Vogl, 1988). Distribuce vimentinu v Sertoliho buňkách je závislá na fázi spermatogenního cyklu, a vypadá to, že souvisí s místem prodlužování hlaviček spermatid (Amlani and Vogl, 1988; Hall et al., 1991; Allard et al., 1993; Zhu et al., 1997).

## KRYPTORCHISMUS

Kryptorchismus (rete testis) je vývojově podmíněná porucha sestupu varlete z retroperitoneálního prostoru cestou kanálu tříselného do šourku. Varle může být zadrženo v retroperitoneu, tříselném kanálu nebo před ním. Častěji je retinováno jen jedno varle, ale mohou být retinována obě. Odhaduje se, že 1 – 7 % mužů má nesestoupilé varle. Nesestoupí-li varle do šourku do konce prvního roku života dítěte, později už nesestoupí (Štork et al., 1981).

Sestup varlete do šourku v průběhu nitroděložního vývoje plodu je děj několika stupňový, na kterém se podílejí : některé anatomické struktury (gubernaculum,...), mechanické vlivy (tlak v dutině břišní) a podléhá také látkové regulaci (INSL-3 – insulin like peptide hormone, peptid tvořený fetalními Leydigovými buňkami, který stimuluje růst gubernakula; dále androgeny, AMH – anti – Mülleriánský hormon, CGRP – calcitonin gene-related peptide) (Klonisch et al., 2004).

Jedním z hlavních etiologických faktorů kryptorchismu je přechodný hypogonadotropní stav v době sestupu varlat, kdy má funkci mateřského hCG přebírat LH. Vzácně dochází k ektopickému kryptorchismu. V 85 % se jedná o jednostranný kryptorchismus postihující asi 3 % donošených novorozených chlapců, u nedonošených je prevalence kolem 30 % (Hadziselimovic, 2002; Leissner et al., 1999).

*Hormonální terapie* gonadotropiny (GnRH nebo hCG – pokud se po čtyřtýdenní léčbě GnRH ve



formě nasálního spreje nedostaví efekt – asi v 50 %, je nutno navázat bezprostředně terapií pomocí hCG, který má výrazný aditivní efekt, jeho nevýhodou však je biologický charakter preparátu a nutnost bolestivého intramuskulárního podání – s úspěšností kolem 70 %) je indikována tehdy, jsou-li přítomny i jiné známky endokrinní poruchy, anebo jako pokus o ovlivnění – v útlém dětství při oboustranném kryptorchismu.

V *operační léčbě* byla navržena celá řada různých, leckdy velmi složitých způsobů orchidopexe. Předpokladem úspěchu takové operace je uvolnění spermatického provazce v dostatečném rozsahu a délce tak, aby varle bylo možné přesunout bez tahu do skrota. Orchidopexe by měla být provedena nejdéle do věku pěti let. Biopsie retinovaných varlat totiž prokázaly, že později provedená orchidopexe nezabrání poruše spermiogeneze. Kryptorchické varle je třeba operovat i v pozdějším dospělém věku, neboť je prokázáno, že riziko vzniku nádoru v retinovaném varleti je 30krát větší než ve varleti uloženém v šourku. Proto kryptorchismu rozpoznáný až v dospělosti může být i indikací k orchidektomii (Štork et al., 1981).

Produkce testosteronu v době dospívání u chlapců s jednostrannou poruchou sestupu varlat nebo poruchou oboustrannou se začíná rozvíjet jako u přiměřeně vyvinutých jedinců, avšak již od 13 let výše jsou hodnoty mužského pohlavního hormonu v krvi výrazně nižší než u dobře plodných a potentních mužů. V ejakulátech mužů, kteří byli léčeni pro oboustrannou poruchu sestupu varlat, se nejčastěji setkáváme s nálezem azospermie nebo těžké oligospermie. Také u jednostranných

kryptorchiků asi v polovině případů je spermiogenní funkce i v sestouplém varleti nedokonalá. Heterosexuální vývoj je u kryptorchiků oproti dobře plodným a potentním mužům jen nevýrazně opožděnější. Při rozboru pohlavní aktivity mužů s uvedenou vývojovou poruchou se však ukázalo, že u nich dochází k mírnému opoždění prvního výronu semene a frekvence polucí je v době dospívání nižší. V dospělém věku u kryptorchiků je méně projevů vysoké sexuální aktivity, např. opakování koitu týž den, a dříve se u nich dostavují období dleších sexuálních abstinencí (Štork et al., 1981).

Pokud není kryptorchismus léčen, objevují se :

- degenerace zárodečných buněk již 6 – 12 měsíců po narození
- morfologické změny na úrovni elektronové mikroskopie v 1 – 2 letech
- morfologické změny na úrovni světelné mikroskopie ve 3 – 4 letech
- klinicky manifestovaná atrofie varlete v 5 – 7 letech.

Velmi závažnou komplikací kryptorchismu je nádor, nejčastěji seminom a maligní teratom, a infertilita (v kryptorchickém varleti je zpomalena až zastavena maturace gonocytů ve spermatogonie typu A, gonocyty po čase degenerují) (Huff et al., 1993; Leissner et al., 1999).

Je-li kryptorchismus operativně navozen u experimentálních zvířat, dochází v jeho důsledku k rychlé degeneraci zárodečných buněk a infertilitě. Z tohoto důvodu je používán jako model pro sledování mechanismů vedoucích k poškození spermatogeneze. Poškození zárodečného epitelu

kryptorchického varlete je zapříčiněno vlivem vyšší teploty v břišní dutině. Mechanismy vedoucí k tomuto poškození nejsou ještě dosud zcela vysvětleny, přesto, že z několika prací, které byly publikovány za posledních 10 let vyplývá, že jejich výsledkem je apoptóza zárodečných buněk (Barqawi et al., 2004; Heiskanen et al., 1996; Henriksen et al., 1995; Ikeda et al., 1999; Kumagai et al., 2002).

Působením zvýšené teploty na varle dochází k řadě morfologických a funkčních změn nejen v zárodečném kanálu a intersticiální tkáni varlete, ale také k systémovým změnám hladin některých hormonů. Je-li myš v experimentu postižena oboustranným kryptorchismem, stoupá u ní sérová hladina FSH, přičemž sérové hladiny LH a testosteronu zůstávají nezměněny. V případě jednostranného kryptorchismu myši dochází také pouze ke zvýšení FSH a jeho hladiny dosahují po 28 dnech stejné úrovně jako u hemikastrovaných jedinců (Mendis-Handagama et al., 1990). U jednostranně kryptorchických potkanů dochází po 28 dnech ke zvýšení sérových hladin FSH a k mírnému poklesu hladiny testosteronu v séru (na rozdíl od myši) (Aumuller et al., 1980). Další změnou je zvýšení exprese mRNA receptorů pro LH i FSH a pokles androgenních receptorů (Winters, 1987).

Sertoliho buňky ve varleti jeví známky regrese, dochází také k vymizení endoplazmatického retikula aktinových vláken v okolí membrány. Kryptorchismus trvající 7 dní vede k poškození struktury aktinových vláken nejen v Sertoliho buňkách, ale také v peritubulárních myoidních buňkách (Maekawa et al., 1995). Dochází také ke změnám v uspořádání

intermediárních filament v Sertoliho buňkách – vimentin (Wang et al., 2002b).

Exprese nebo funkce mnoha signálních, transportních, receptorových a dalších proteinů, enzymů apod. se v kryptorchickém varleti zvyšuje i snižuje, např. :

- snižuje se koncentrace ABP (androgen binding protein) v abdominálním varleti, což svědčí o poškození Sertoliho buněk
- klesá aktivita DNA polymerázy  $\beta$  a  $\gamma$ , přičemž se nemění aktivita DNA polymerázy a topoizomerázy I
- klesá aktivita cholesterylester hydrolázy (již po 24 hodinách po navození kryptorchismu)
- klesá exprese fosfodiesterázy 4 a glukózového transportéru GLUT-3 při současném zvýšení exprese GLUT-2
- klesá hladina HSP-70 (heat shock protein)
- zvyšuje se peroxidace lipidů a produkce volných kyslíkových radikálů, atd.

Otázka ovlivnění spermatogeneze v kontralaterálním skrotálním varleti kryptorchismem je stále diskutovaná a dosud nebyl nalezen jednoznačný závěr (Lee and Coughlin, 2001; Wang et al., 2002b; Watts et al., 2000).

## **APOPTÓZA**

Apoptóza je jednou z forem buněčné smrti. Pod pojmem buněčná smrt se rozumí ireverzibilní ztráta vitálních buněčných funkcí. Zjednodušeně ji můžeme dělit na nekrózu ( z řeckého „nekrosis“ – mrtvost ) a

apoptózu ( z řeckého „apo“ – od, pryč, z + „ptosis“ – pád ). **Nekróza** vzniká jako výsledek patologických dějů a je pro ni charakteristická ztráta integrity plazmatické membrány, rozvrat membránového elektrochemického gradientu a únik intracelulárního obsahu. **Apoptóza** je formou buněčné smrti, díky které jsou z organismu odstraňovány zničené, poškozené nebo nechtěné buňky bez poškození celulárního mikroprostředí. Morfologicky je apoptóza popisována smrštěním buňky, ztrátou kontaktu se sousedními buňkami, kondenzací chromatinu a jeho marginací ( nahuštění na okraji jádra ), fragmentací DNA. V pozdějších stádiích dochází k tvorbě apoptotických tělísek ( ve fragmentech jsou obsaženy celé orgány, popř. také části kondenzovaného a rozpadlého jaderného materiálu ). Tato tělíška jsou rychle fagocytována. Apoptóza jedné buňky je proces, který trvá 2 až 4 hodiny.

Regulace apoptózy je složitý proces a zahrnuje mnoho různých proteinů, které jsou lokalizované v buněčné membráně, cytosolu, endoplazmatickém retikulu, mitochondriích a jádře. Výkonnými proteiny jsou kaspázy (cystein-aspartyl proteasy), které jsou dvojího druhu – efektorové a iniciátorové. Efektorové kaspázy (např. kaspázy 3, 6 a 7) jsou zodpovědné za rozklad buněčných součástí a iniciátorové kaspázy (např. kaspázy 2, 8, 9 a 10) za aktivaci efektorových kaspáz (Thornberry et al., 1998). Kaspázy jsou produkovány jako inaktivní proenzymy známé jako prokaspázy. Aktivace kaspáz může být vyvolána dvěma různými mechanismy, a to tzv. mitochondriální (neboli vnitřní) cestou nebo death receptorem zprostředkovanou (neboli vnější) cestou. Komunikace mezi oběma cestami je rozsáhlá,

příčemž každá z nich je reprezentována různými iniciátorovými kaspázami, obě cesty se však sbíhají na úrovni aktivace efektorové kaspázy 3 (Saldago et al., 2002).

### **MITOCHONDRIÁLNÍ (VNITŘNÍ) CESTA**

Mitochondriální cesta je spuštěna uvolněním proapoptotických proteinů z vnitřního mezimembránového mitochondriálního prostoru. Z mitochondrie se uvolní cytochrom c a za přítomnosti dalšího faktoru AP-1, prokaspázy 9 a ATP se vytváří apoptozom aktivující kaspázu 9, která dále štěpí efektorovou kaspázu 3. Uvolňování proapoptotických faktorů je kontrolováno proteiny Bcl-2 skupiny. Do této skupiny patří proteiny proapoptotické (Bcl-2, Bcl-w, Bcl-xL), schopné apoptózu vyvolat, ale také antiapoptotické (Bax, Bac, Bid, Bik, Bcl-IS), apoptózu inhibující. Inhibice či aktivace závisí na vzájemné rovnováze mezi nimi (Keleklar and Thompson, 1998).

### **DEATH RECEPTOROVÁ (VNĚJŠÍ) CESTA**

Death receptorová cesta zahrnuje tzv. death receptory a jejich ligandy. Death receptory jsou buněčné povrchové receptory, které jsou schopné aktivovat kaspázovou kaskádu během několika sekund po navázání ligandu.

Death receptory patří do rodiny TNF (tumor nekrotizující faktor) genů. Ovlivňují proliferaci, diferenciaci a apoptózu buněk. Bylo identifikováno asi 30 různých TNF receptorů a 19 ligandů. Nejznámějšími death receptory jsou Fas, TNFR 1 a

TNF-příbuzný apoptózu indukující ligand (TRAIL) receptory DR4 a DR5. Charakteristické pro tyto receptory je přítomnost tzv. death domény (DD) uvnitř buňky, která umožňuje napojení dalších signalizačních proteinů (Gaur and Aggarwal, 2003).

TNF- $\alpha$  svůj účinek uplatňuje spojením s TNFR1, přítomným v mnoha typech buněk, a TNRF2, který se nachází převážně v leukocytech a endoteliálních buňkách. Při spuštění apoptózy dochází po spojení ligandu a TNFR1 k interakci s adaptorovými proteiny TRADD (TNF-receptor associated death domain) a FADD a aktivaci kaspázy 8. Oproti tomu, TNF- $\alpha$  může figurovat také jako antiapoptotický faktor (Wang et al., 2003).

Asociace Fas ligandu s Fas receptorem vede k napojení adaptorového proteinu FADD a následně prokaspázy 8, která je tímto aktivována a může aktivovat efektorové kaspázy.

TRAIL spojením se svými receptory DR4 a DR5 navozuje apoptózu v mnoha buňkách. Dosud však nebyly identifikovány adaptorové molekuly (jako TRADD, FADD). I zde byly nalezeny mechanismy, které brání apoptóze (Gaur and Aggarwal, 2003).

Během spermatogeneze je apoptóza považována za běžný jev, díky ní dochází k redukování produkce spermií. Díky apoptóze je odstraněna více než polovina spermií. Apoptoticky zanikají zejména spermatocyty, příležitostně také spermatogonie. Takto zanikající buňky jsou rychle fagocytovány Sertoliho buňkami, proto je obtížné je zachytit pomocí histochemických metod (Savill and Fadok, 2000).



Experimentálně bylo prokázáno, že se s časem významně zvyšuje počet apoptotických buněk v sementvorných kanálcích v porovnání s kontrolou a kontralaterálním skrotálním varletem (u jednostranného kryptorchismu). Zvýšený počet apoptotických buněk proti kontrole jemožné pozorovat nejen v kryptorchickém varleti, ale i v kontralaterálním skrotálním varleti (Wang et al., 1998).

Na rozsáhlé apoptóze v kryptorchickém varleti se pravděpodobně podílí více mechanismů, přičemž její příčina není zcela objasněna.



## **BUSULFAN**

*Synonyma* : Busulphan, Busulphanum, Myelosan, BSF.

Busulfan je bifunkční alkylační činidlo, látka s cytostatickým účinkem, která byla syntetizována na základě zjištění, že dichloridethylsulfid (yperit) vede k atrofii lymfoidní tkáně a kostní dřeně (Hynie et al., 1984). Po stránce chemické se jedná o diester kyseliny methansulfonové s dvojsytným alkoholem, 1,4 – dihydroxybutanem (Melichar et al., 1987), tudíž o 1,4 – butandiol dimethansulfonát (Hartl et al., 1992). V klinické praxi se používá od roku 1959.

### **Mechanismus účinku**

Busulfan je chemicky labilní sloučenina, po jejíž systémové absorpci se rychle tvoří radikály – karboniové ionty. Navázáním methylové skupiny tohoto radikálu na DNA dochází k interferenci s replikací DNA i s transkripcí RNA. Tím dochází ke zlomům v jejich struktuře a inhibici procesů buněčného dělení, což je požadovaný terapeutický účinek na maligní tumory.

Protinádorová aktivita busulfanu není specifická na fáze buněčného cyklu, jeho postavení je výjimečné díky účinku i na buňky klidové (v G<sub>0</sub>-fázi buněčného cyklu). To vysvětluje jeho vysokou hematologickou toxicitu – ničí pluripotentní hemopoetické buňky, které jsou z 90 % v klidové fázi (AISLP, 2004).

### **Fyzikální vlastnosti**

Busulfan není dobře rozpustný ve vodě, z tohoto důvodu je třeba ho nejprve rozpustit v nepolárním prostředí – např. ve směsi dimethylacetamidu a polyethylenglykolu nebo v dimethylsulfoxidu, a poté aplikovat ve vodném roztoku. Zkoumána je také možnost přípravy busulfanu ve formě liposomálních „kapslí“ v intravenózní formě.

### **Farmakokinetické vlastnosti**

Dávky busulfanu od 2 do 6 mg se podle prováděných farmakokinetických studií velmi dobře vstřebávají a kinetická data mohou být přizpůsobena absorpci podle 0. řádu jednodílného modelu, průměrný eliminační poločas látky je 2, 57 hod, u malých dětí do 5 let věku je nižší – přibližně 2 hod (Hassan et al., 1991). Po perorálním podání busulfanu dochází v trávicím ústrojí rychle k hydrolyze, k resorpci a k okamžitému vytvoření karboniového iontu, který způsobuje alkylaci. Po i.v. aplikaci byly nejvyšší koncentrace dosaženy v játrech, mozku, plicích a ledvinách a to 15 minut po podání (20 % z dávky se dostává do mozku) (Hassan et al., 1992). Reverzibilní vazba busulfanu na plazmatické bílkoviny se pohybuje v rozmezí hodnot do 55 % (ireverzibilně vazba kolem 32 %), ireverzibilní vazba na krevní elementy je 47 %. Rozsáhle je metabolizován v játrech prostřednictvím glutathionové dráhy na nejméně 12 metabolitů. Z organismu je vylučován močí, pouze 1 – 2 % v nezměněné formě.

Farmakokinetické parametry busulfanu byly také sledovány u pacientů s vysokodávkovou terapií – 1mg / kg podávaný perorálně každých 6 hodin po

dobu 4 dnů. Byla zjištěna střední hodnota eliminačního poločasu, a to 2,3 hod po poslední dávce (po první dávce byl eliminační poločas busulfanu 3,4 hod). Močové metabolity busulfanu byly u těchto pacientů identifikovány jako 3-hydroxysulpholan, tetrahydrothiofen-1-oxid a sulpholan, přičemž aktivita těchto sloučenin po klinické stránce zůstává nejasná. Bylo zjištěno, že busulfan ve vysokých dávkách prochází placentou a prostupuje do cerebrospinální tekutiny v koncentracích srovnatelných s plazmatickými.

Ve farmakokinetických vlastnostech busulfanu je možné pozorovat velké inter – i intraindividuální rozdíly. Podobně je můžeme pozorovat u pacientů s přidruženými nemocemi, u jednotlivých interakcí busulfanu s dalšími léky (např. fenytoin zrychluje jeho farmakokinetiku, itrakonazol a metoklopramid jeho farmakokinetiku zpomalují) a také v závislosti na cirkadiálním rytmu (Hassan et al., 2001).

### **Indikace a klinické využití**

Busulfan nemá s výjimkou deprese myeloidní složky prakticky žádné farmakologické účinky (u chronické myeloidní leukémie byl dlouho lékem volby). Již nízké dávky vedou k depresi granulocytů a trombocytopenii, vysoké dávky mohou způsobovat pancytopenii. Lymfoidní tkáň a epitele trávicího traktu nejsou příliš ovlivněny (Hynie et al., 1984).

Busulfan je používán k dlouhodobé regulaci počtu leukocytů, proto je vhodný k léčbě chronické myeloidní (granulocytické) leukémie, polycythemia rubra vera, primární trombocytémie, Non-Hodgkinova lymfomu a je často používanou součástí přípravného

režimu před transplantací (Kalous et al., 2001). Při indukční léčbě se používá dávka 4 – 8 mg denně, k udržovací léčbě stačí 2 mg denně nebo obden. Dnes je v těchto indikacích používán omezeně. Před transplantací kostní dřeně se používají vysoké dávky busulfanu a to 14 – 16 mg/kg perorálně (3,5 až mg/kg/den , 4 po sobě následující dny), v kombinaci s dalšími cytostatiky (cyklofosfamidem, amsakrinem).

### **Nežádoucí účinky busulfanu**

Deprese kostní dřeně, zvláště trombocytopenie, se klinicky manifestuje jako horečka, bolesti v krku, lokální hemoragie či anémie a může vyústit v pancytopenii. Proto je při léčbě nutné pravidelná kontrola krevního obrazu, zejména počtu leukocytů.

Obvykle po několika letech se ve 3 % vyskytla difúzní intersticiální plicní fibróza spolu s progresivní dyspnoí, horečkou, šelesty a přetrvávajícím neproduktivním kašlem. Toto poškození může komplikovat superinfekce či kalcifikace. Při zjištění plicní toxicity je prognóza i přes ukončení léčby busulfanem špatná.

Zvláště u pacientů s tmavou pletí se v 5 – 10 % vyskytla hyperpigmentace, která byla nejvýraznější v oblastech krku, loktů, kolen, bradavek, na břicho a dlaňových rýhách ruky. V některých případech se po delší terapii busulfanem vyskytuje hyperpigmentace jako součást klinického syndromu připomínajícího Addisonovu chorobu, přičemž po vysazení je možné, že příznaky ustoupí. Z kožních reakcí se velmi vzácně vyskytuje kopřivka, erythema multiforme, erythema nodosum, alopecie, vyrážka „alopurinového typu“ a nadměrná suchost kůže

s úplnou anhydrózou, vysušením sliznice dutiny ústní a cheilózou.

Nevýznamné jsou hepatotoxické účinky při běžných dávkách busulfanu. Ojediněle se objevily zprávy o cholestatické žloutence a abnormální funkci jater. Byly-li k léčbě používány vysoké dávky, byla zaznamenána hyperbilirubinémie, žloutenka, hepatální venookluzivní onemocnění a centrilobulární sinusoidní fibróza s hepatocelulární atrofií a nekrózou (AISPL, 2004).

Busulfan je schopný indukovat změnu čočky či kataraktu u potkanů, vzácně i u člověka. Po transplantaci kostní dřeně, které předcházela léčba vysokými dávkami busulfanem, bylo popsáno ztenčení rohovky.

Ojediněle byly při podávání běžných dávek popsány nežádoucí účinky na gastrointestinální trakt, jako je nauzea, zvracení, průjem, úbytek hmotnosti, anorexie a slabost. Někdy je možné je odstranit podáváním dělených dávek.

Při podávání vysokých dávek busulfanu dospělým pacientům byly pozorovány křeče. Potenciální výskyt křečí po terapii busulfanem je možné očekávat zejména u pacientů s předcházejícími projevy či úrazy hlavy.

Rychlá destrukce granulocytů může na počátku chemoterapie způsobit hyperurikémii. Nebezpečí následně vzniklé nefropatie lze minimalizovat zvýšenou hydratací, alkalizací močmoči u hospitalizovaných pacientů a profylaktickým podáním alopurinolu nebo jiných inhibitorů xanthinoxidasy.

U malého počtu pacientů s thalasémií léčených vysokými dávkami busulfanu byla popsána srdeční tamponáda. Vzácně je zmiňována také

gynekomastie, myasthenia gravis a hemoragická cystitida (AISLP, 2004).

### **Mutagenita**

Mutagenita busulfanu byla popsána v různých experimentálních testech, a to včetně testů s bakteriemi (Amesův test), drozofilou i tkáňovými kulturami buněk myšího lymfomu. U hlodavců prokázaly cytogenetické studie po podávání busulfanu zvýšenou incidenci chromozomálních aberací v zárodečných i somatických buňkách. Také v buňkách, které byly odebrány pacientům léčených busulfanem, byly pozorovány různé chromozomální aberace.

### **Kancerogenita**

Busulfan byl na základě krátkodobých studií IARC (International Agency for Research on Cancer) označen za potenciálně karcinogenní. Světová zdravotnická organizace WHO dospěla k názoru, že existuje kauzální vztah mezi podáváním busulfanu a vznikem zhoubného nádoru.

Dále byla u pacientů léčených busulfanem popsána řada histologických a cytologických změn, včetně častých dysplazií postihujících epitel děložního čípku nebo bronchů. Některé z těchto změn připomínaly prekancerózní léze. Nejvíce zpráv se týká dlouhodobé léčby, avšak přechodné abnormality byly popsány i po krátkodobé léčbě vysokými dávkami. Objevuje se stále více důkazů o tom, že busulfan, stejně jako ostatní alkylující látky, iniciuje leukemickou proliferaci (AISLP, 2004).

### **Teratogenita**

Teratogenita busulfanu byla prokázána ve studiích na zvířatech, potenciálně teratogenní je busulfan i u lidí. Popsáno bylo i několik případů vrozených abnormalit, přičemž podmínkou jejich vzniku nemuselo být použití busulfanu (AISLP, 2004).

V 1. trimestru těhotenství může mít podávání busulfanu za následek smrt plodu nebo vrozené malformace, ve 2. a 3. trimestru může vést k poruše nitroděložního růstu nebo poškození gonád plodu. U gravidních potkanů způsobuje busulfan sterilitu kvůli nepřítomnosti zárodečných buněk ve varlatech a vaječnicích u samčích i samičích potomků. Tato vrozená aplázie zárodečných buněk či sterilita však nebyla prokázána u lidí.

Existuje ale i mnoho případů narození zjevně zdravých dětí přesto, že byly *in utero* vystaveny účinkům busulfanu, a to dokonce i v průběhu prvního trimestru (AISLP, 2004).

### **Reprotoxicita**

U experimentálních zvířat busulfan interferuje se spermatogenezí a existují klinické zprávy o sterilitě, azospermii a testikulární atrofii u mužských pacientů. U pacientek před menopauzou se běžně vyskytuje suprese funkce vaječníků a amenorea se symptomy menopauzy. Dále může busulfan způsobit opožděný nástup puberty nebo sníženou funkci gonád (AISLP, 2004).

Busulfan je považován za teratogenní, mutagenní a kancerogenní látku, což je hlavním důvodem odklonu



od jeho používání při léčbě chronické myeloidní leukémie (AISLP, 2004).

U experimentálních zvířat brání aplikovaný busulfan spermatogenezi. Jeho toxické působení je přednostní na spermatogonie, a to více na kmenové než diferencované. V zachovalých kmenových spermatogoniích nebyly sledovány letální mutace ani chromosomální aberace, přesto ještě po 44 týdnech od aplikace busulfanu se objevovaly abnormality v morfologii hlav spermií. Dávka busulfanu nad 30 mg/kg má za následek azospermii a sterilitu (Bucci a Meistrich, 1987). Závislost dávky busulfanu na spermatogenezi byl pozorován u myši. Po jedné dávce 15, 30 nebo 45 mg/kg byla spermatogeneze pozorována po 30 dnech v 63 %, 8 %, resp. 0,8 % a po 70 dnech v 98 %, 47%, resp. 3 % zárodečných kanálků (Kanastu-Shinohara et al., 2003).

Jiang (1998) experimentálně zkoušel působení busulfanu na spermatogenezi u potkanů kmene Long Evans, kterým byly aplikovány intraperitoneálně 2 dávky busulfanu (10 mg/kg) v rozmezí 21 dnů. Po 2. dávce (20. den) došlo ve varlatech ke ztrátě většiny zárodečných buněk. Zachováno zůstalo pouze několik jednotlivých spermatogonií v bazálním kompartmentu semenotvorného kanálu. Symetricky a asymetricky dělicí se spermatogonie A a diferencující se spermatogonie B byly pozorovány 48. den. V některých kanálcích se objevily již plereptotenní a pachytenní spermatocyty, Sertoliho buňky byly stále silně vakualizované. K obnovení spermatogeneze ve většině kanálků došlo až 74. den. Přítomny byly diferencující se spermatidy, při bazální membráně bylo více spermatogonií B,



Sertoliho buňky obsahovaly mnohem méně vakuol. 96. den nabylo znovu normální funkce 80 % kanálků, ve zbytku zůstaly pouze Sertoliho buňky (Jiang, 1998).

Aich a Manna (2001) testovali vliv jedné dávky busulfanu (10 mg/kg) podávané perorálně na samcích potkana kmene Indian house rat – *Rattus Raptus*. Busulfan byl podáván v časových intervalech 10, 40, 70 a 100 dní od aplikace cytostatika. Po 40 dnech byly v semenotvorných kanálcích přítomny pouze spermatogonie, Sertoliho buňky a zygotenní spermatocyty. V intervalu 70 dní byly pozorovány pouze spermatogonie a zygotenní spermatocyty, nebyly přítomny pachytenní spermatocyty, spermatidy a spermatozoa. 100.den po aplikaci busulfanu byla spermatogeneze obnovena ve většině semenotvorných kanálků (Aich and Manna, 2001).

Haddad a kol. (1997) zkoumali působení busulfanu na zárodečnou tkáň varlete potkanů kmene Wistar. Busulfan byl podán v jedné intraperitoneální dávce v časových intervalech 8, 10, 11 a 17 týdnů od aplikace. K maximálnímu poškození zárodečného epitelu došlo v 8. týdnu. V 55 % semenotvorných kanálků obsahoval zárodečný epitel zárodečné buňky pouze do stádia primárních spermatocytů. 23 % kanálků obsahovalo pouze Sertoliho buňky a spermatogonie. Od 10. týdne byly zaznamenány progresivní změny v zárodečném epitelu. Spermatogeneze se nevrátila na úroveň kontrolní skupiny ani do 17. týdne (Haddad et al., 1997).

K dalšímu experimentálnímu použití busulfanu patří transplantace kmenových zárodečných buněk – tzv. kmenová spermatogonie. Ve varleti zvířete, které

slouží jako příjemce zárodečných buněk, je třeba před transplantací zničit všechny zárodečné buňky. V tomto případě je busulfan podáván dospělým samcům – u potkan v dávce 20 – 45 mg/kg (Moisan et al., 2003). Další možností je aplikace busulfanu březím samicím (10,5 – 12,5. den březosti, v dávce 15 mg/kg), čímž dochází ke zničení samčích plodů již *in utero*. Transplantace se následně provádí mezi 5. až 12. dnem po narození ( Brinster et al., 2003).

Dojde-li po aplikaci busulfanu k eliminaci zárodečných buněk pouze z části, zbývající složky kmenových buněk, které léčbu přežily, mohou kompetovat s transplantovanými buňkami donora. Z tohot důvodu byly spolu busulfanem testovány ještě jiné látky. V kombinaci estradiolu, busulfanu a leuprolidu (antagonista choriogonadotropin-uvolňujícího hormonu) dojde ke zničení endogenních zárodečných buněk, a to beze změny Sertoliho buněk při zachování optimální prostředí potřebného k rozvoji transplantovaných buněk (Vecino et al., 2001).

## **EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **MATERIÁL A METODIKA**

Experimentální část této práce byla prováděna na dospělých samcích laboratorního potkana kmene Wistar (chovná stanice Velaz s. r. o., Únětice). Během experimentu byla zvířata chována za standardních podmínek ve viváriu FaF UK s volným přístupem k vodě, krmena byla standardní potravou (Velas a.s., Lysá nad Labem). V týdenních intervalech byla pravidelně kontrolována jejich hmotnost (na laboratorních vahách Transporta), jejich zdravotní stav a chování. Chov a zacházení s pokusnými zvířaty bylo prováděno v souladu s pravidly schválenými Odbornou komisí pro ochranu zvířat proti týrání FaF UK.

#### **Operací navozený kryptorchismus**

Používaná zvířata při experimentech vážila v době operace 200 - 250g. U zvířat bylo provedeno chirurgické navození unilaterálního kryptorchismu na dobu 1 hodiny, 2 hodin, 6 hodin, 12 hodin, 24 hodin, 48 hodin, 3 dnů, 5 dnů, 11 dnů, 22 dnů, 44 dnů, 85 dnů a 121 dnů. V každé skupině (s výjimkou krátkých intervalů – 1, 2, 6 a 12 hodin) bylo operováno minimálně 5 zvířat, 1 další zvíře v každé skupině bylo operováno pouze provedením řezu do kůže a svaloviny, s následným opětovným sešitím bez přemístění varlete do břišní dutiny – operovaná kontrola (sham-operated jedinci – SO). Skupina dalších 5 zvířat sloužila jako kontrolní skupina. Za kryptorchické zvíře bylo považováno pouze takové

zvíře, u něhož nedošlo po operaci k sestupu varlete zpět do šourku.

Operace všech zvířat byla prováděna v celkové anestézii za podmínek relativní asepse, k anestézii byl použit pentobarbital, v množství 30-50 mg na zvíře, aplikovaný intraperitoneálně. Řez o velikosti asi 2 cm byl veden kůží a svalovinou na břichu. Lehkým tlakem na skrotum došlo k vytlačení levého varlete a nadvarlete do otevřené břišní dutiny. Po přestřížení m. cremaster a gubernakula bylo varle vyjmuto z břišní dutiny a změřeno. Poté bylo opatrně uloženo zpět do břišní dutiny a za tukové těleso přišito ke svalovině stěny břišní, aby nedocházelo k sestupu varlete zpět do inguinálního kanálu a skrota. Sešitím svaloviny a kůže byla operační rána uzavřena. Po operaci byla zvířata umístěna zpět do klecí. SO zvířata byla operována za použití stejných materiálů i technik jako zvířata pokusná.

## **APLIKACE BUSULFANU**

Pro experiment byli použiti dospělí samci potkana kmene Wistar (chovná stanice Velaz s. r. o., Únětice) o hmotnosti 200 – 230 g. V experimentu bylo použito celkem 65 laboratorních potkanů. 15 potkanům byla aplikována 1 dávka busulfanu 40 mg/kg hmotnosti zvířete, 15 potkanům byla aplikována 1 dávka busulfanu 10 mg/kg hmotnosti a 30 potkanům byly intraperitoneálně aplikovány 2 dávky busulfanu 10 mg/kg hmotnosti v odstupu 21 dnů (1. a 21. den) (Jiang, 1998). Busulfan (Acros, Giel, Belgie) byl pro aplikaci rozpouštěn v dimethylsulfoxidu (DMSO) a aplikován jako 2% roztok. Zbylým 5 potkanům byl aplikován pouze DMSO 1. a 21. den (kontrolní skupina) – tato zvířata byla usmrcena 3 týdny po aplikaci druhé dávky DMSO.

Potkani byli rozděleny do experimentálních skupin po 5 jedincích.

## HISTOLOGICKÉ ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ

### ODBĚR VZORKŮ

Na konci daného intervalu byla provedena euthanasie zvířat předávkováním celého inhalačního anestetika (Aether pro narcosi, Synthesia, Pardubice-Semtín) s následným přerušením míchy. Po usmrcení potkanů byla ihned provedeno otevření břišní dutiny a vyjmutí varlat a nadvarlat. Po jejich očištění byla zaznamenána délka varlat s přesností na milimetry a hmotnost (váhy Scaltec, Sartorius AG, Goettingen, Německo) s přesností na setiny gramu. Varlata i nadvarlata byla dále ihned podrobena histologickému zpracování.

Každý odebraný orgán byl rozdělen na několik částí z důvodu různých vyšetření tkání. Pro histologické i imunohistochemické hodnocení byly orgány fixovány v Bouinově roztoku nebo ve 4% paraformaldehydu (4°C) po dobu 48 – 72 hodin; poté byly odvodněny acetonem, projasněny xylenem a po prosycení parafínem zality do bločků. Histologické řezy o tloušťce 5 – 6 µm byly krájeny na diskovém mikrotomu Leica DSC1 (Leica Microsystems GmbH, Nussloch, Německo).

### FIXACE, ZALITÍ DO PARAFÍNU

<u>4% paraformaldehyd</u>	48 – 72 hodin
fyzilogický roztok	1 hodina
3krát aceton	během 16 hodin
xylen	2krát 15 minut
parafín (56°C)	2krát 2 hodiny
zalití do parafínu	

nebo :

<u>Bouinův roztok</u>	48 – 72 hodin
ethanol 80%	1 hodina
3krát aceton	během 16 hodin
xylén	2krát 15 minut
parafín (56°C)	2krát 2 hodiny
zalití do parafínu	

#### **4% paraformaldehyd**

Roztok se připraví rozpuštěním 4 g paraformaldehydu v 96 ml PBS při zahřívání na maximálně 60°C, poté se nechá zchladnout a zfiltruje se. Uchovává se v lednici.

#### **Bouinův fixační roztok**

nasycený roztok kyseliny pikrové	300 ml
formol neutrální	100 ml

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

#### **Formol neutrální**

10% formol (odpovídá 4% formaldehydu)

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

#### **Zalévací parafín**

Tuhý parafín zkvalitněný 3 – 5% bílého včelího vosku.

**BARVENÍ HEMATOXYLIN – EOSIN**

xylén	3krát 5 minut
ethanol 96%	5 minut
ethanol 70%	5 minut
destilovaná voda	5 minut
hematoxylin	10 sekund nebo 5 minut
pramenitá voda	5 minut
destilovaná voda	3 minuty
eosin	5 sekund nebo 1 minuta
destilovaná voda	opláchnutí
ethanol 96%	2krát opláchnutí
ethanol : xylén (2:1)	3 minuty
xylén : ethanol (2:1)	3 minuty
xylén	3krát 3 minuty

zamontování do kanadského balzámu nebo Eukitu.

V průběhu experimentu se osvědčilo zkrácení barvicích časů hematoxylinem i eosinem na několik sekund a naředění obou barvicích roztoků 1 : 5 destilovanou vodou.

**ROZTOKY A CHEMIKÁLIE****Hematoxylin Hill**

hematoxylin	4,0 g
jodičnan sodný	0,4 g
síran hlinitý	35,2 g
destilovaná voda	710,0 ml
ethylenglykol	250,0 ml
kyselina octová (ledová)	40,0 ml

Roztok se připraví za občasného míchání rozpouštěním hematoxylinu, jodičnanu sodného a síranu hlinitého v destilované vodě, přilije se ethylenglykol. Nakonec se přidá kyselina octová. Plní



se do lahví, nechá se uzrát a před použitím se zfiltruje.

### **Roztok eosinu**

1% roztok eosinu v destilované vodě

Roztok se připraví rozpuštěním eosinu v destilované vodě za občasného míchání. Poté se zfiltruje do lahví.

## **ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ PRO POLOSILNÉ ŘEZY**

U vzorků jsme prováděli dva typy fixace :

### **1) Fixace v OsO<sub>4</sub>**

OsO<sub>4</sub> 2 hodiny (lednice)  
proplach v kakodylátovém pufru 3krát 15 minut  
(lednice)  
4. pufr v lednici do doby, než se zpracují další  
vzorky k odvodňování

### **2) Fixace v glutaraldehydu a postfixace v OsO<sub>4</sub>**

fixace v glutaraldehydu do rána 2. dne (16-20  
hodin)  
proplach v Millonigově pufru 4krát 15 minut  
(lednice)  
fixace v OsO<sub>4</sub> 2 hodiny (lednice)  
proplach v kakodylátovém pufru 3krát 15 minut  
(lednice)  
4. pufr v lednici do doby, než se zpracují další  
vzorky k odvodňování

**2% OsO<sub>4</sub>**

4% OsO <sub>4</sub> (v orig. ampulích)	1, 5 ml
kakodylátový pufr	1, 5 ml

**kakodylátový pufr (200 mmol/l)**

pH = 6,9-7,1 (zásobní roztok)

kakodylan sodný (85,6 g/l) 50 ml

HCl (0,2 mmol/l) 5,0 ml

redestilovaná voda ad 100,0 ml

výsledný roztok pH = 7,3; 100 mmol/l

kakodylátový pufr (200 mmol/l) 50,0 ml

redestilovaná voda 50,0 ml

**3% glutaraldehyd**

8% glutaraldehyd 1,5 ml

Millonigův pufr 2,5 ml

**Milloginův pufr**roztok A – pH = 7,336NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O (22,6 g/l) 415,0 ml

NaOH (25,5 g/l) 85,0 ml

redestilovaná voda 70,0 ml

roztok B

glukóza 5,4 g

redestilovaná voda ad 100,0 ml

výsledný roztok – pH = 7,68

roztok A – 90 ml + roztok B – 10ml

**ODVODNĚNÍ**

25% ethanol 15 minut (lednice)

50% ethanol 15 minut (lednice)

75% ethanol + 1% UA 15 minut (lednice)

96% ethanol + 1% UA 15 minut

100% ethanol + 1% UA 15 minut

100% ethanol 15 minut

100% ethanol 15 minut

(UA = uranylacetát)

### PROSYCOVÁNÍ

ihned po posledním 100% ethanolu

prosycovaní směs č. 1      1 hodina (míchání)

prosycovaní směs č. 2      1 hodina (míchání)

odsaje se směs č. 2 a do 1/3 lahvičky se naplní čistá směs pryskyřic Epon-Durkupan, lahvičky se nechají bez špuntiku v boxu do dalšího dne, kdy se zalévají.

### PŘÍPRAVA EPON – DURKUPANU, PROSYCOVACÍCH SMĚSÍ

Děje se současně s odvodňováním, v boxu při vlhkosti do 40%, míchání v kádince vždy po 15 minutách s přidavkem další součásti

na 30 vzorků 80,0 ml (pros. směsi – 30 ml, prosycování – 10 ml, zalití – 36 ml)

Epon	20,0 ml
Durkupan modrý	44,0 ml
Durkupan červený	12,0 ml
Durkupan žlutý	1,6 ml (směs ztmavne)
Durkupan zelený	2,4 ml

#### prosycovaní směsi :

č. 1 20 ml aceton 100% + 10 ml Epon-Durkupan

č. 2 10 ml aceton 100% + 20 ml Epon-Durkupan

ihned po rozmíchání se nabere do uzavřených stříkaček (aceton se odpařuje)

### KRÁJENÍ POLOSILNÝCH ŘEZŮ

Polosilné řezy byly krájeny na ultramikrotomu – ULTRATOME<sup>®</sup>, V2088, LKB Bromme.

**TOLUIDINOVÁ MODŘ S PYRONINEM****Postup barvení polosilných řezů**

Podložní sklíčko bylo třeba odmastit acetonem a polosilný řez byl přenesen do kapky redestilované vody na podložním sklíčku. Nad kahanem došlo k odpaření vody, čímž došlo k napnutí a přischnutí řezů. Dále byl na řezy kápnut barvicí roztok, řezy byly 10 sekund žihány nad plamenem a opláchnuty redestilovanou vodou. Následně byl řez na sklíčku krátce opláchnut 50% ethanolem (dokud se tvořili obláčky barvy) a poté redestilovanou vodou. Na plamenem bylo sklíčko vysušeno a montováno do Entalanu nebo pryskyřice.

**Roztoky :****1% toluidinová modř**

toluidinová modř	1,0g
tetraboritan sodný	1,0 g
redestilovaná voda	ad 100,0 ml

**1% pyronin**

pyronin	0,5 g
tetarboritan sodný	0,5 g
redestilovaá voda	ad 50,0 ml

**barvicí roztok**

1% toluidinová modř	40,0 ml
1% pyronin	10,0 ml
redestilovaná voda	30,0 ml

Barvicí roztok postupně zraje, skladuje se při 5°C. Před každým použitím je nutné ho zfiltrvat.

## IMUNOHISTOCHEMIE

Základním cílem imunohistochemických a imunocytologických metod je detekce specifických antigenních determinant (molekul nebo jejich částí) s využitím imunologické vazby, tedy na principu vazby antigen – protilátka. Tuto vazbu je možné definovat jako vztah specifické protilátky, která je zpravidla volná, ke tkáňovému antigenu, který je zpravidla pevně fixován na určitou strukturu v tkáni. V průběhu experimentu bylo využito metody tzv. nepřímé imunohistochemie. Na tkáňové řezy se nejprve aplikuje primární protilátka, která specificky rozeznává prokazovaný antigen. Sekundární protilátka, značená fluorochromem nebo enzymem (v našich podmínkách), se imunologickou vazbou váže na protilátku primární. Specifické barvení je zviditelněno po přidání enzym-specifického substrátu.

### **Pracovní postup**

xylén	3krát 5 minut
ethanol 96%	5 minut
ethanol 70%	5 minut
destilovaná voda	5 minut
3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> v PBS	
(nebo 3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> v 50% methanolu)	10 – 15 minut
destilovaná voda	2krát 5 minut
odkrytí antigenu	10 – 20 minut (viz níže)
PBS	2krát 5 minut
10% kozí sérum v PBS	
(nebo 10% sušené mléko – hovězí albumin v PBS)	30 minut
primární protilátka	inkubace přes noc při 4°C

PBS	2krát 5 minut
sekundární protilátka	30 minut
PBS	2krát 5 minut
DAB	5 sekund – 5 minut
destilovaná voda	5 minut
hematoxylin	1 – 2 sekundy
pramenitá voda	1 – 2 minuty
destilovaná voda	opláchnutí
aceton	opláchnutí
aceton – xylen (1:1)	3 minuty
aceton – xylen (1:10)	3 minuty
xylen	3krát 3 minuty

#### **Primární protilátka (ředění v 5% roztoku**

BSA v PBS)

vimentin – myší monoklonální protilátka – Mouse anti-vimentin Ab – klon V9 (LabVision – NeoMarkers, Fremont, USA)

#### **Odkrytí antigenu**

Imunohistochemické vyšetření řezů bylo prováděno na parafínových řezech, u nichž je nutné provést před inkubací řezů tzv. odkrytí antigenu. Zpřístupnění antigenu je možné dosáhnout povařením v mikrovlnné troubě v 0,01 mmol/l citrátovém pufru pH = 6 nebo inkubací s proteázou (Proteinkináza K – 20 µg/ml – 1 mg/ml).

#### **Séra**

potkaní sérum – Rat serum (Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Německo)

kozí sérum – Goat serum (Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Německo)

hovězí sérový albumin – BSA – Bovine serum albumine (Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Německo)

**Proteinkináza K**

20 µg/ml – 1 mg/ml PBS dle protilátky;  
Proteinkinase K (Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Německo)

**Citrátový pufr pH = 6,0**

kyselina citronová – monohydrát	0,99 g
citronan sodný	6,43 g
destilovaná voda	ad 500,0 ml

**Sekundární protilátky**

Goat anti-rabbit protilátka + 2% potkaní sérum  
Goat anti-mouse protilátka + 2% potkaní sérum  
Dako EnVision™ – ready to use (DAKOCytomation, Carpenteria, USA)

**DAB** (diaminobenzidin – substrát pro peroxidázu)  
DAB v poměru 20 µl/ml pufru (pufr je součástí kitu)  
Dako Liquid – DAB+ substráte-chromogen systém  
(DAKOCytomation, Carpenteria, USA)

**PBS** (fosforečnanový pufr)

chlorid sodný	80,0g
chlorid draselný	2,0 g
hydrogenfosforečnan draselný	2,0 g
dihydrogenfosforečnan sodný	11,5 g
destilovaná voda	ad 1000,0ml pH = 6,8

Tento roztok se dále ředí 1 : 10 redestilovanou vodou – pH výsledného roztoku je 7,43 ± 0,001.

## CHEMIKÁLIE

aceton (Lachema Brno)  
busulfan (Acros, Giel, Belgie)  
citronan sodný (RNDr. Jan Kulich, Hradec  
Králové/Říčany)  
dihydrogenfosforečnan sodný (Lachema Brno)  
dimethylformamid (Lachema Brno)  
Durkupan<sup>®</sup> (Fluka– Sigma – Aldrich Co., Steinheim,  
Německo)  
eosin (Lachema Brno – 818199)  
Epon<sup>®</sup> (Fluka – Sigma – Aldrich Co., Steinheim,  
Německo)  
ethanol (Lachema Brno)  
ethylenglykol (Lachema Brno)  
Eukit<sup>®</sup> (Sigma – Aldrich Co., Steinheim, Německo)  
Fast Red (Sigma – Aldrich Co., Steinheim,  
Německo)  
formaldehyd (Lachema Brno)  
glukóza (TAMDA Olomouc)  
glutaraldehyd (SPI – Chem, West Chester, USA)  
hematoxylin (The Coleman & Bell Co. – 12JS3)  
hydrogenfosforečnan draselný (Lachema Brno)  
hydroxid sodný (RNDr. Jan Kulich, Hradec  
Králové/Říčany)  
chlorid draselý (Lachema Brno)  
chlorid sodný (Lachema Brno)  
jodičnan sodný (Lachema Brno)  
kakodylan sodný (Sigma – Aldroch Co, Steinheim,  
Německo)  
kanadský balzám (Lachema Brno)  
kyselina citronová – monohydrát (TAMDA  
Olomouc)  
kyselina chlorovodíková (TAMDA Olomouc)



kyselina octová (Lachema Brno)  
kyselina pikrová (Polskie Odczynniki Chemiczne)  
methanol (Lachema Brno)  
monohydrát kyseliny citronové (RNDr. Jan Kulich,  
Hradec Králové/Říčany)  
naftol-AS-fosfát (Sigma – Aldrich Co., Steinheim,  
Německo)  
oxid osmičelý (SPI-Chem, West Chester, USA)  
parafín (Lachema Brno)  
pentobarbital (Zentiva, Praha)  
peroxid vodíku 30% (Chemické závody Sokolov)  
pyronin (Lachema Brno)  
síran hlinitý (Lachema Brno)  
tetraboritan sodný (RNDr. Jan Kulich, Hradec  
Králové/Říčany)  
toluidinová modř (SPI-Chem, West Chester, USA)  
TRIS (Sigma – Aldrich Co., Steinheim, Německo)  
Triton-X (Sigma – Aldrich Co., Steinheim,  
Německo)  
uranyl acetát (Sigma – Aldrich Co., Steinheim,  
Německo)  
xylen (Lachema Brno)

## **STATISTICKÉ HODNOCENÍ**

Hmotnost varlat během experimentů byla vyjadřována v gramech jako průměrná hmotnost varlat ve skupině  $\pm$  standardní chyba průměru (SEM).

Pro zjištění statistické významnosti rozdílu hmotností mezi skupinami zvířat byl užit Student-Newman-Keulsův test a za statisticky významný byl považován rozdíl na hladině významnosti  $p < 0,005$ .

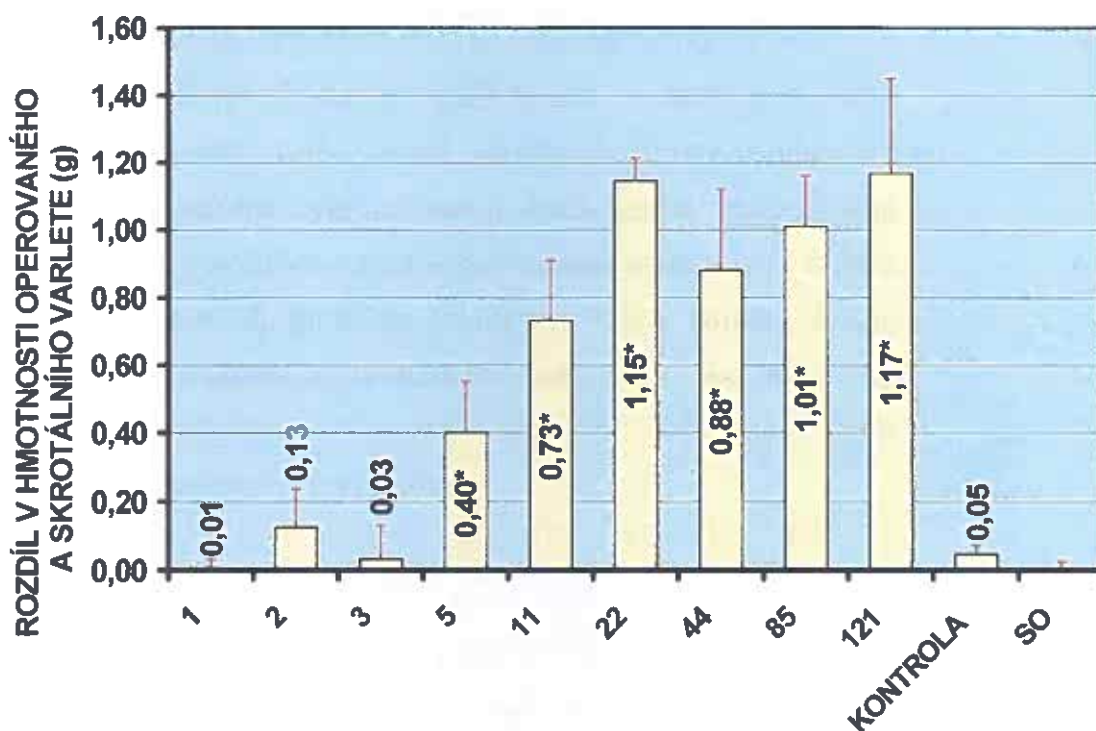
Ke statistickému hodnocení byly užívány program Microsoft Excel 2002 a SigmaStat<sup>®</sup> verze 2.0.

# VÝSLEDKY

## KRYPTORCHISMUS

### HMOTNOST VARLAT

Rozdíly v hmotnostech varlat mezi operovanými a neoperovanými (skrotálními) varlaty jsou uvedeny v grafu č. 1.



GRAF č. 1

Rozdíl v hmotnosti mezi operovanými a neoperovanými (skrotálními) varlaty po různě dlouhém intervalu kryptorchismus

( $p > 0,005$  v porovnání s kontrolní skupinou)

Hmotnost varlat kontrolních a SO (operované kontroly – sham-operated) jedinců, stejně jako hmotnost kontralaterálních skrotálních varlat se v průběhu pokusu výrazně změnila.

Snížení průměrné hmotnosti kryptorchických varlat u operovaných zvířat bylo zaznamenáno již pátý den po operaci. V intervalech 22 až 121 dnů dosahovala hmotnost operovaného varlete cca 40-50% hmotnosti neoperovaného varlete. Rozdíl v hmotnosti operovaného a neoperovaného varlete byl v těchto intervalech kolem 1 gramu. Hmotnost operovaného varlete, současně i rozdíl hmotností obou varlat, se v těchto intervalech s narůstající délkou kryptorchismu již výrazně neměnily.

Kryptorchismem poškozená varlata byla také menší než varlata skrotální. Velmi nápadným znakem byla změněná konzistence abdominálně umístěných varlat – poškozená varlata byla měkká a silně prosáklá tekutinou, která tvořila většinu hmotnosti kryptorchického varlete. Také proto byla poškozená varlata obtížně fixovatelná pro histologická vyšetření.

## VÝSLEDKY HISTOLOGICKÉHO HODNOCENÍ

### SKROTÁLNÍ VARLATA OPEROVANÝCH ZVÍŘAT, OPEROVANÉ KONTROLY

Neoperovaná skrotálně lokalizovaná varlata pokusných jedinců ve všech sledovaných intervalech kryptorchismu nevykazovala žádné známky poškození a nález byl srovnatelný s kontrolními jedinci. Podobně také u simulovaně operovaných jedinců nebyly pozorovány žádné patologické změny, výjimku tvořily řídké nálezy části odloučeného epitelu v lumen několika kanálků (pravděpodobně důsledek mechanického poškození epitelu v průběhu operace) (**obr. č. 1**).

### **KRÁTKÉ INTERVALY DO 24 HODIN (1 HODINA, 2 HODINY, 6 HODIN, 12 HODIN, 24 HODIN)**

Nález varlatech, které byly voperovány do břišní dutiny na dobu kratší než 24 hodin, byl srovnatelný s nálezem u kontrolních jedinců. Všechny semenotvorné kanálky byly vystlány neporušeným zárodečným epitelem s přítomností všech stádií zárodečných buněk. Dvouřadý epitel kanálků nadvarlat byl neporušený a v lumen kanálků se nacházelo hojné množství spermatozoí stejně jako u kontrolních zvířat.

### **INTERVALY 2 DNY A 3 DNY KRYPTORCHISMU**

V operovaných varlatech zvířat z těchto dvou intervalů byly zaznamenány první změny v uspořádání komponent zárodečného epitelu (ve větším rozsahu v intervalu 3 dnů). Tyto změny se projevovaly především na úrovni spontánního odlučování různě zralých stádií zárodečných buněk (především spermatid a spermatocytů) do lumen kanálků, kde tvořily velmi často shluky. Jako první se odlučovaly spermatidy (již v intervalu 2 dny), poté spermatidy společně se spermatocyty (od 3. dne – **obr. č. 2**). V kanálcích, kde nastalo odlučování zárodečných buněk z epitelu, se začaly rovněž objevovat vícejaderné formy buněk. V zárodečném epitelu byly pozorovány buňky s výrazně eosinofilní cytoplazmou a denzím obsahem jádra (tyto buňky byly sice součástí epitelu, ale byly zřetelně odděleny od ostatních buněk – **obr. č. 2 – šipka**). Dalším nálezem byla tvorba vakuol v Sertoliho buňkách při bazální membráně, která vedla k výrazné desintegraci uspořádání zárodečného epitelu (**obr. č. 2**).

V některých kanálcích došlo k oddělení spermatogonií od bazální membrány. Funkční stav varlete potvrdily i nálezy i nálezy v kanálcích nadvarlete, kde se vedle zralých, diferencovaných spermií vyskytovaly i nezralé kulatobuněčné formy zárodečných buněk. V ductuli efferentes již u některých zvířat došlo ke zřetelnému poklesu množství zralých spermatozoid.

### INTERVAL 5 DNŮ KRYPTORCHISMU

V tomto intervalu byly ve varlatech pozorovány semenotvorné kanálky (jednak u různých jedinců, ale také v rámci jednoho varlete), přičemž stupeň poškození byl velmi rozdílný – od nepoškozených kanálků s kompletními stádii spermatogeneze až po kanálky, v nichž zůstaly zachovány pouze Sertoliho buňky se spermatogoniemi a několika spermatocyty v epitelu (**Obr. 3**).

Ve většině kanálků bylo možné zaznamenat progresi patologických změn jako je tvorba vakuol v Sertoliho buňkách (v polosilných řezech bylo možné pozorovat také výskyt vakuol s pravděpodobně tukovým obsahem) a odlučování nezralých buněk zárodečné linie, včetně masivního odlučování spermatocytů (**obr. č. 3**). V mnoha kanálcích docházelo ke splývání zárodečných buněk do vícejaderných útvarů. Neobvyklé nebyly útvary obsahující v rovině řezu 6 – 8 jader. Podle struktury jader v těchto útvarech byla většina těchto útvarů tvořena splynutím kulatých spermatid (**obr. č. 4**). Některé útvary byly vzniklé sloučením spermatid a spermatocytů, vynímečně byly pozorovány útvary vzniklé pouze ze spermatocytů. Docházelo také k odlučování jednotlivých typů

zárodečných buněk z epitelu jednotlivě bez spojování do větších útvarů. Zřetelná byla pyknotická jádra poškozených spermatocytů. Poškození zárodečného epitelu v některých kanálcích nabylo takových rozměrů, že v lumen kanálku bylo možné zaznamenat pouze Sertoliho buňky a několik spermatogonií a spermatocytů při bazální membráně.

Větší množství Leydigových buněk bylo možné pozorovat v intersticiální tkáni mezi kanálky. V lumen kanálků proximální části nadvarlat (ductuli efferentes) byly u několika pokusných jedinců zcela prázdné a neobsahovaly téměř žádné buňky. V distální části nadvarlat (ductus epididymidis) bylo lumen kanálků vyplněno tekutinou, která obsahovala různě vyztřelé buňky zárodečné linie, ale v podstatně menším množství než v ductus epididymidis kontrolních jedinců.

#### **INTERVALY 11 A 22 DNŮ KRYPTORCHISMU**

Ve fázi patologických změn bylo možné pozorovat rozdílný stav zárodečného epitelu v jednotlivých semenotvorných kanálcích. V ojedinělých izolovaných semenotvorných kanálcích šlo stále ještě nalézt zralejší formy buněk zárodečné linie – spermatocyty a výjimečně i spermatidy. Po 22 dnech kryptorchismu byly spermatidy přítomny pouze asi v 10% kanálků. Stále se ještě vyskytovaly v lumen kanálků odloučené zárodečné buňky (v intervalu 22 dnů již v menším množství). Většina kanálků však již téměř pozbyla zárodečných buněk a jejich epitel vytvářely pouze Sertoliho buňky a zbytky spermatogonií při bazální membráně. Mezi patologické změny v operovaných varlatech patřila

rozsáhlá vakuolizace v bazálních úsecích kanálků. Příliš nápadné nebyly změny v intersticiu kolem těchto kanálků. Bylo možné pozorovat hyperplastické ostrůvky Leydigových buněk, Kanálky nadvarlat u operovaných zvířat byly vyplněny pouze amorfni nebuněčnou hmotou (u operovaného varlete).

#### **INTERVALY 44, 85 A 121 DNŮ KRYPTORCHISMU**

Naprostá většina semenotvorných kanálků se vyznačovala kompletní, nebo téměř kompletní, eliminací zárodečných buněk ze zárodečného epitelu (obr. č. 5) V takovýchto kanálcích zasahovaly volné výběžky Sertoliho buněk do lumen kanálku. Zbarvení cytoplazmy těchto výběžků bylo eosinofilní. Průřezy takto změněných kanálků byly zřetelně menších rozměrů v porovnání s kanálky, v nichž normálně probíhala spermatogeneze. V intersticiu se kolem takovýchto kanálků nacházely hyperplastické ostrůvky intersticiálních buněk. V některých případech tyto ostrůvky tvořily téměř úplnou výplň mezi hranicemi semenotvorných kanálků. U nadvarlat operovaných zvířat byly kanálky vyplněny pouze tekutinou a zbytky buněčného materiálu (u operovaného varlete).

#### **VIMENTIN**

Expres vimentinu byla v průběhu spermatogenního méně uniformní. Ve varlatech kontrolní skupiny se vimentinová filamenta v Sertoliho buňkách vyskytovala v bazální a perinukleární oblasti a vybíhala směrem



k apikální částem buňky. Apikální vimentinová vlákna byla v Sertoliho buňkách v počátečních stádiích zárodečného epitelu přítomna, poté vymizela, aby se opět začala objevovat mezi elongujícími se spermatidami v pozdějších stádiích zárodečného epitelu. Vimentin-pozitivní byly také peritubulární myoidní buňky. V intersticiu byla nejsilnější pozitivita pozorována u různých typů buněk stěny tesikulárních cév. Pozitivita se vyskytovala také v Leydigových buňkách, fibroblastech a buňkách imunitního systému.

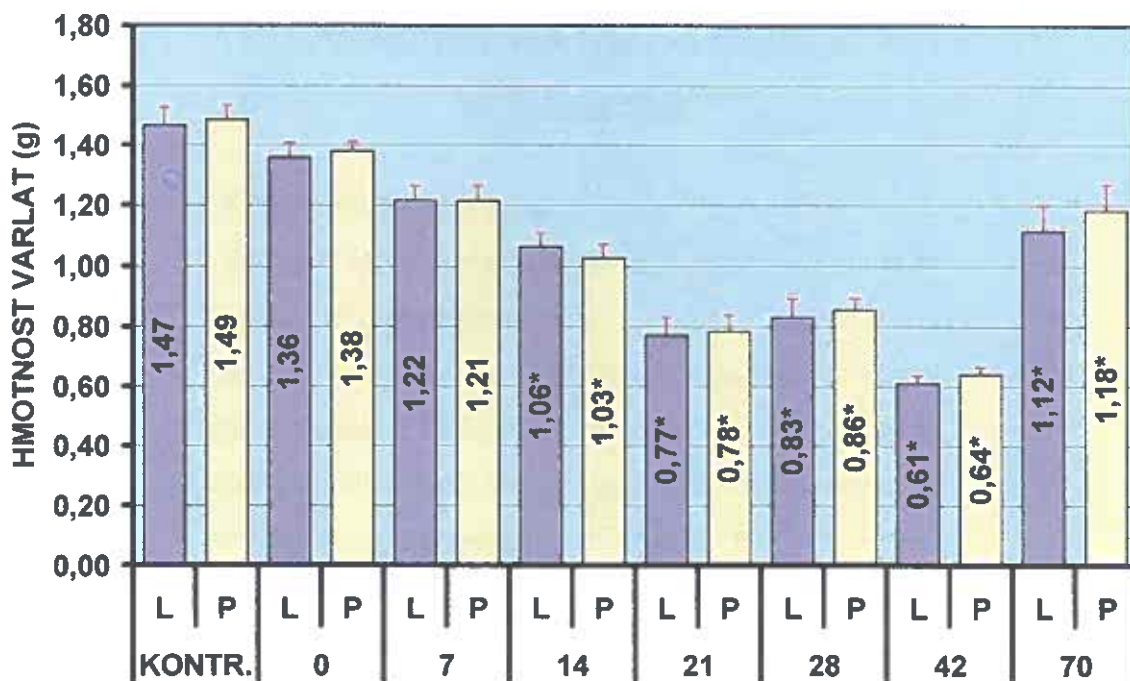
První změny se v expresi vimentinu u **kryptorchizovaných zvířat** objevily 3. – 5. den po operaci, kdy došlo k vymizení apikálních vimentinových vláken v kanálcích s poškozenou spermatogenezí. V těchto kanálcích byla pozorována silná exprese v perinukleární a bazální oblasti Sertoliho buněk (**obr. č. 12**). Vimentinová vlákna byla nalezena také kolem jader buněk, které se odloučily ze zárodečného epitelu (tato pozitivita zůstala v těchto buňkách zachována, i když dosáhly nadvarlete). Postupně pokračoval kolaps a dezintegrace vimentinových vláken i v dalších intervalech od 22. dne (**obr. č. 13, 14**) Od tohoto intervalu, kdy se v zárodečném epitelu nacházeli již pouze Sertoliho buňky, popř. několik spermatogonií, bylo uspořádání vimentinových vláken v bazální části kanálků kolem jader Sertoliho buněk chaotické (**obr. č. 15**).

## BUSULFAN

Aplikace 10 mg/kg busulfanu v jedné dávce nebo aplikace dvou těchto dávek v odstupu 21 dnů se neprojevilo na celkovém stavu experimentálních zvířat. Zvířata prospívala a přibývala na váze. Ojedinele se u několika jedinců objevila řidší stolice svědčící o gastrointestinální toxicitě busulfanu. Dávka 40 mg/kg se ukázala být pro potkana kmene Wistar dávkou letální. Zvířata rychle hubla, od 5. dne měla řídkou a krvavou stolicí a všichni jedinci zemřeli mezi 8. – 10. dnem po aplikaci busulfanu.

### HMOTNOST VARLAT

Hmotnosti varlata po podání dvou dávek busulfanu jsou uvedeny v grafu č. 2.



**Graf č. 2 Hmotnost varlat po podání busulfanu**

(L-levé varle, P-pravé varle)

$p > 0,005$  v porovnání s kontrolní skupinou

Statisticky nevýznamný pokles hmotnosti varlat byl zaznamenán již 21 dnů po aplikaci jedné dávky busulfanu (10 mg/kg) – v grafu označeno jako den 0. 42. den po podání jedné dávky klesla hmotnost varlat téměř na polovinu ( $0,86\text{g} \pm 0,06\text{g}$ ). Po aplikaci dvou dávek busulfanu došlo k postupnému klesání hmotnosti varlat potkanů. Nejvýraznější úbytek byl zaznamenán v intervalech 21, 28 a 42 dnů ode dne aplikace druhé dávky. Hmotnost varlat z těchto intervalů byla téměř poloviční ve srovnání s kontrolní skupinou. 70. den došlo k vzestupu hmotnosti varlat důsledkem postupného obnovování zárodečného epitelu a spermatogeneze. Přesto hmotnost těchto varlat dosáhla pouze necelých 80% hmotnosti kontrolních varlat.

## VÝSLEDKY HISTOLOGICKÉHO HODNOCENÍ

### KONTROLNÍ SKUPINA

Zvířata, kterým bylo dvakrát podáno vehikulum DMSO (dimethylsulfoxid), měla neporušený zárodečný epitel se Sertoliho buňkami a všemi stádii buněk. Leydigovy buňky a další komponenty intersticiální tkáně mezi semenotvornými kanálky nevykazovaly žádné změny. (obr. č. 1)

### PODÁNÍ 1 DÁVKY 10 mg/kg A 1 DÁVKY 40mg/kg BUSULFANU

Ve varlatech potkanů nebyly zaznamenány žádné významné patologické nálezy 7 dní po aplikaci 10 mg/kg ani 40 mg/kg. Patologické změny byly pozorovány pouze v intervalu 21 dní (výjimečný

výskyt vakuol v Sertoliho buňkách) a velmi často absence spermatogonií při bazální membráně . Ke zřetelnějšímu poškození došlo především **42 dní** od aplikace busulfanu, kdy v zárodečném epitelu chyběly spermatogonie, ale i spermatocyty a spermatidy. Rozsah poškození byl ovšem heterogenní a tak byly vedle sebe pozorovány i kanálky velmi poškozené (**obr. č. 6 – o**) i kanálky s částečně probíhající spermatogenezí (**obr. č. 6 – x**).

#### **PODÁNÍ DVOU DÁVEK BUSULFANU 10 mg/kg**

Ve skupině zvířat, která byla usmrcena **7 dnů** po podání druhé dávky busulfanu nebyly patrné žádné rozsáhlejší změny ve stavbě zárodečného epitelu (**obr. č. 7**). Bylo možné pozorovat kanálky se zachovalým zárodečným epitelem, ve kterém šla sledovat všechna vývojová stádia spermatogeneze s výjimkou spermatogonií, které ve většině kanálků chyběly. V lumen některých kanálků se však vyskytovaly shluky z epitelu již odloupaných zárodečných buněk. Zcela výjimečně byly v některých kanálcích patrný výraznější změny – tvorba vakuol v Sertoliho buňkách (**obr. č. 7 – šipka**), vymizení spermatocytů a kulatých spermatid, přičemž elongované spermatidy byly v epitelu vždy přítomny . Intersticiální tkáň mezi kanálky zůstala nezměněna.

**14. den** po podání druhé dávky byly stále ve většině kanálků přítomny elongované spermatidy, avšak v zárodečném epitelu chyběly spermatogonie, spermatocyty a často i kulaté spermatidy (**obr. č. 8**)

Také bylo možné pozorovat kanálek, který je vystlán pouze Sertoliho buňkami, do nichž jsou zanořeny elongované spermatidy, zatímco ve spodním kanálku jsou ještě přítomny skupiny kulatých spermatid. V lumen kanálků byly ve větším množství pozorovány odloučené skupiny různých zralých stádií zárodečných buněk. Mezi patologické změny patřila také tvorba menších či větších vakuol v Sertoliho buňkách při bazální membráně semenotvorných kanálků, která měla za následek desintegraci uspořádání zárodečného epitelu. V intersticiu nebyly patrné žádné významné změny (obr. č. 8).

**21. den** po aplikaci druhé dávky busulfanu a v následujících časových intervalech 28 a 42 dnů byly patrné největší změny a nejrozsáhlejší poškození tkáně varlat. Pozorovány byly nejen velké interindividuální rozdíly v reakci tkáně varlete na aplikované cytostatikum, ale také rozdílné poškození jednotlivých semenotvorných kanálků v jednom varleti.

U dvou zvířat z 21 denní a u dvou zvířat z 28 denní experimentální skupiny došlo k výraznému poškození zárodečného epitelu obou varlat. Kolem vakuol v Sertoliho buňkách se zárodečný epitel desintegroval a byla pozorována kompletní nebo téměř kompletní eliminace zárodečného epitelu ve většině průřezů semenotvorných kanálků. Zachováno zůstalo pouze několik kmenových buněk – spermatogonií při bazální membráně. V takovýchto kanálcích byly pozorovány různé zprohýbané výběžky Sertoliho buněk zasahujících do lumen kanálku. Průřezy kanálků byly zřetelně menší než průřezy kanálků u kontrolních zvířat.

V intersticiu bylo možné nalézt hyperplastické ostrůvky Leydigových buněk. Některých případech vytvářely tyto ostrůvky úplnou výplň mezi jednotlivými semenotvornými tubuly (obr. č. 9).

U dalších zvířat v tomto časovém intervalu (21 dnů) nebyly takto výrazné změny. V semenotvorných kanálcích bylo sice pozorovatelné odtrhávání velkých shluků buněk zárodečného epitelu, stále ještě v některých kanálcích byly perzistující elongované spermatidy, které byly zanořeny do Sertoliho buněk (ačkoliv spermatocyty a kulaté spermatidy nebyly přítomny). V poškozených kanálcích varlat v intervalech 28 a 42 dní již elongované spermatidy zcela chyběly.

V skupině zvířat 28 dní od podání druhé dávky busulfanu (a výjimečně i 21 dnů) byl u některých vyšetřovaných jedinců (pouze v menší části zárodečných kanálků) pozorován výskyt spermatogonií a také několika spermatocytů bez přítomnosti vyšších forem zárodečných buněk. Přeživší kmenová spermatogonie A v M-fázi buněčného cyklu je zachycena na obrázku již 21. den po aplikaci busulfanu. Vzhledem k odstupu (28 dnů) od podání busulfanu je pravděpodobné, že v semenotvorných kanálcích těchto zvířat již dochází ke skutečnému zahájení rekonstrukce zárodečného epitelu a znovunastartování spermatogeneze. Důvodem této úvahy je fakt, že v dalším intervalu (42 dnů) byl tento efekt již zcela zřejmý u všech zvířat, lišil se pouze rozsahem.

42 dní od podání druhé dávky busulfanu byla stále ještě výrazně poškozena obě varlata (v tomto intervalu vykazovala také nejnižší hmotnost) a nebyla zaznamenána přítomnost spermatid

v zárodečném epitelu pokusných zvířat. V bazální části zárodečného epitelu byly mezi Sertoliho buňkami pozorovány dělicí se spermatogonie a také primární spermatocyty v různých stádiích profáze meiotického dělení (obr. č. 10). Výstelku některých kanálků však tvořily stále Sertoliho buňky, mezi nimiž se při bazální membráně občas objevila osamocená spermatogonie. Rozměry těchto kanálků byly nápadně redukováných rozměrů. U zvířat z této experimentální skupiny se stále nacházely nápadné hyperplastické ostrůvky Leydigových buněk.

V posledním sledovaném intervalu (70 dní od podání druhé dávky busulfanu) byla již zaznamenána výrazná obnova zárodečného epitelu ve většině semenotvorných kanálků (obr. č. 11). Rozsah obnovy spermatogeneze se však u jednotlivých zvířat lišil. U bazální membrány se nacházely spermatogonie, ve směru do lumen byly primární spermatocyty. Ve spoustě kanálcích se již mezi apikálními výběžky Sertoliho buněk objevovaly kulaté i elongované spermatidy. Ve většině kanálků tak došlo k postupné obnově všech vývojových fází zárodečného epitelu. Nepřímým důkazem obnovy spermatogeneze bylo zastoupení zralých forem spermatozoí v kanálcích nadvarlete.

Ve varlatech zvířat v této experimentální skupině byly zaznamenány i kanálky se zcela poškozeným zárodečným epitelem. Epitel těchto kanálků byl tvořen pouze Sertoliho buňkami s četnými vakuolami. Spermatogonie v těchto kanálcích zcela chyběly. Průřezy těchto kanálků byla zřetelně redukována a množství těchto kanálků bylo



výrazně nižší než v předchozích časových intervalech.

Intersticiální buňky nebyly již výrazně zmnoženy ve srovnání se zvířaty z předchozích skupin a nebyly v nich pozorovány výrazné patologické změny.

V expresi vimentinu v experimentu s **busulfanem** byly první změny pozorovány v semenotvorných kanálcích zvířat, kterým byla aplikována jedna dávka busulfanu. 21 dnů a 42 dnů po aplikaci busulfanu došlo ke změnám exprese vimentinu v bazálním i apikálním kompartmentu Sertoliho buněk v kanálcích, v nichž došlo ke ztrátě zárodečných buněk. 7. a 14. den po aplikaci druhé dávky busulfanu bylo v kanálcích s porušeným zárodečným epitelem pozorováno ubývání vimentinu v apikální oblasti Sertoliho buněk. V těchto tubulech bylo možné zaznamenat vzestup reaktivity vimentinu kolem jader Sertoliho buněk (**obr. č. 16A**). Ve většině poškozených kanálcích v dalších intervalech, kde byl epitel tvořen pouze Sertoliho buňkami, byla pozorována progresse těchto změn spojená s intenzivní expresí vimentinu v bazální a perinukleární oblasti Sertoliho buněk (**obr. č. 16B – šipka**). Vimentinová vlákna v těchto tubulech byla dezorganizována a náhodně uspořádána. Tyto změny bylo možné pozorovat především ve varlatech ze skupiny 21 a 28 dnů po aplikaci druhé dávky.

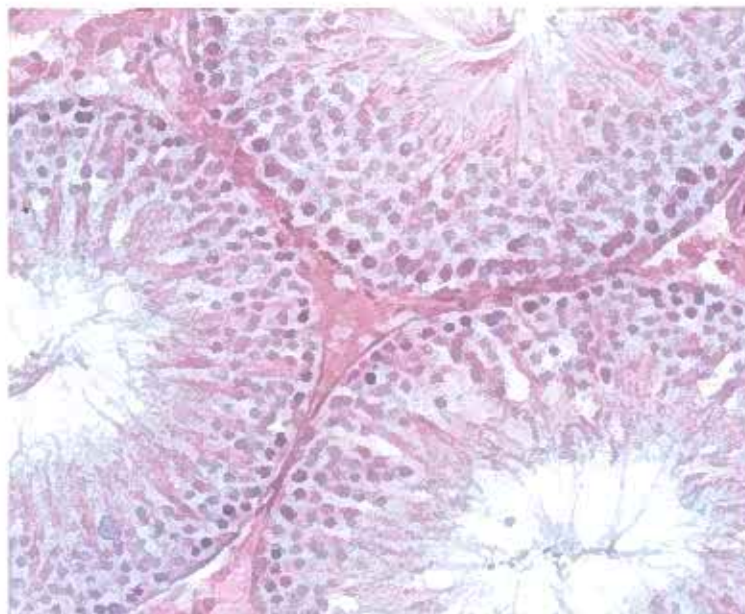
Od 28. dne byla zaznamenána postupná obnova zárodečného epitelu. V tubulech s postupně se obnovujícím procesem spermatogeneze bylo pozorovatelné nové uspořádání vimentinových filament, a to nejprve v bazální oblasti a v oblasti



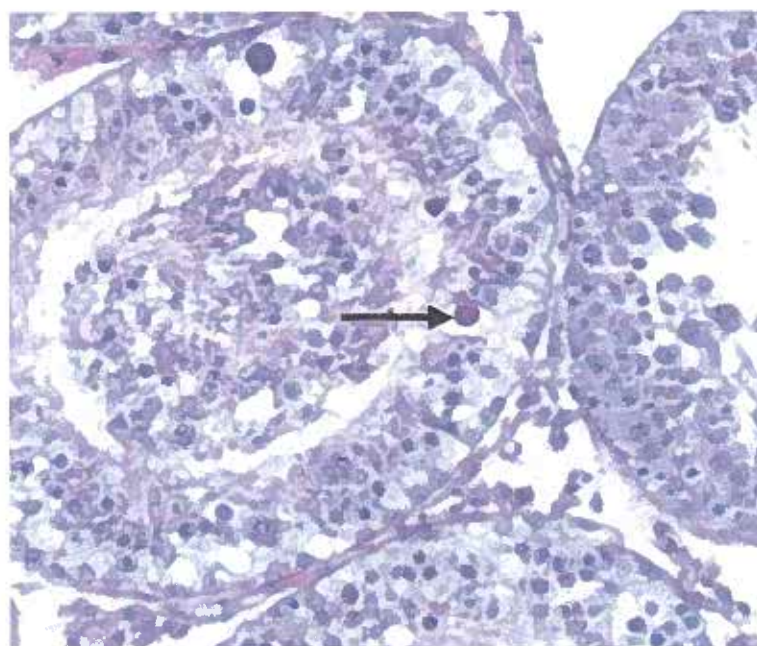
kolem jádra Sertoliho buněk. V dalších intervalech se s výskytem primárních spermatocytů, případně spermatid, vimentinová filamenta v apikální oblasti postupně prodlužovala směrem k lumen kanálků (obr. č. 16C). 70. den se ve většině tubulů s obnovenou spermatogenezí exprese vimentinu nelišila od uspořádání vimentinových filament v kanálcích varlat zvířat z kontrolní skupiny (obr. č. 16D).

Změny v expresi vimentinu v intersticiální tkáni nebyly silně vyjádřeny. Nejvíce nápadnou změnou byla zvýšená exprese vimentinu v intersticiálních buňkách varlat s nejvíce poškozenou spermatogenezí (21. – 42. den). Toto zvýšení souviselo se zvýšeným počtem Leydigových buněk v těchto varlatech. 70 dnů po aplikaci 2. dávky busulfanu došlo opět k normalizaci exprese vimentinu na úroveň exprese v kontrolní skupině.

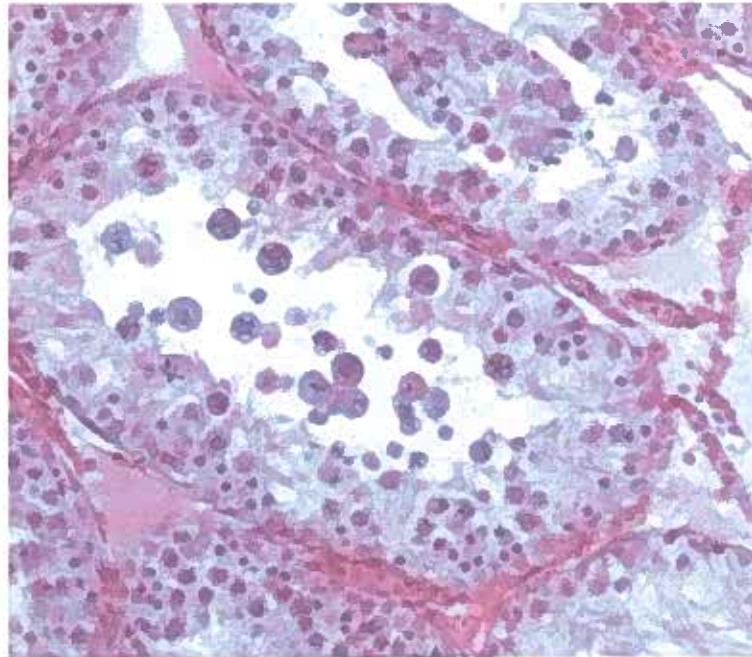
## **OBRAZOVÁ PŘÍLOHA**



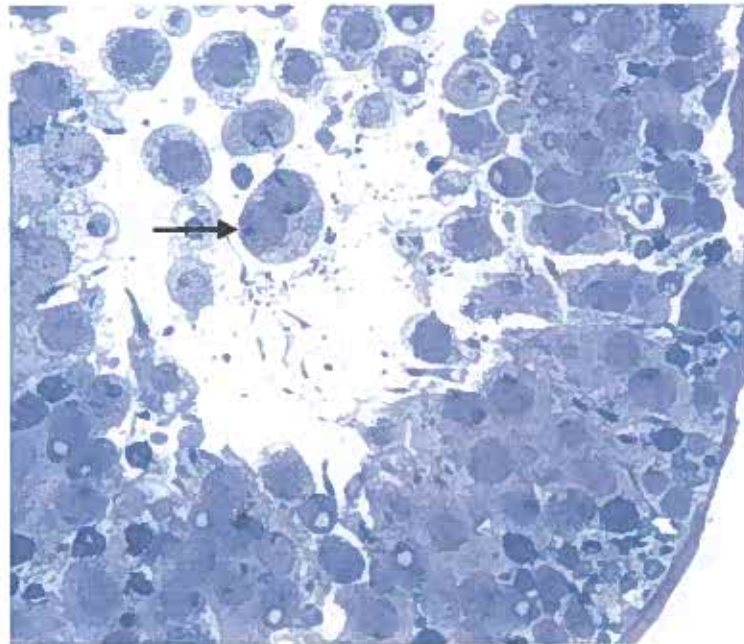
**Obr. č. 1. Tkáň kontrolního varlete**  
Hematoxylin & eosin, originální zvětšení 100krát



**Obr. č. 2. Tkáň varlete po 3 dnech kryptorchismu**  
Hematoxylin & eosin, originální zvětšení 200krát

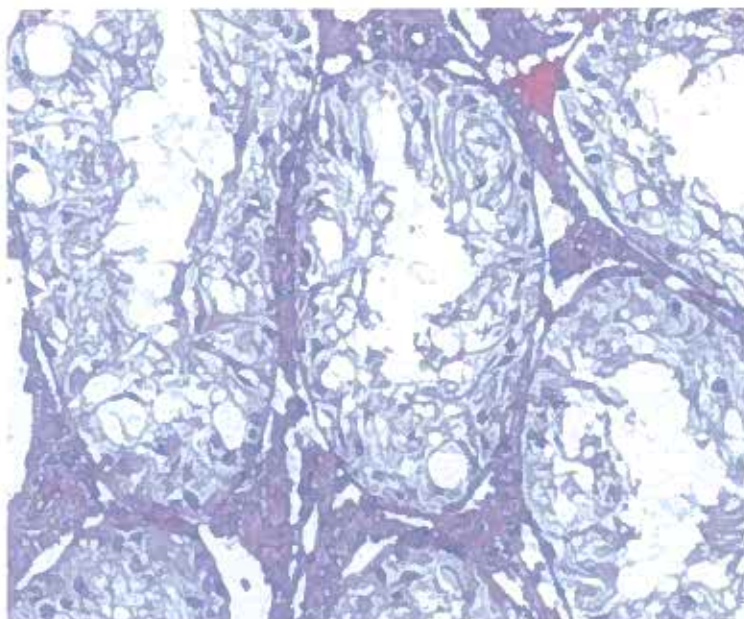


**Obr. č. 3. Tkáň varlete po 5 dnech kryptorchismu**  
Hematoxylin & eosin, originální zvětšení 200krát



**Obr. č. 4. Tkáň varlete po 3 dnech kryptorchismu**  
Detail splývání buněk do vícejaderných útvarů  
Polosilné řezy, toluidinová modř-pyronin, originální  
zvětšení 200krát





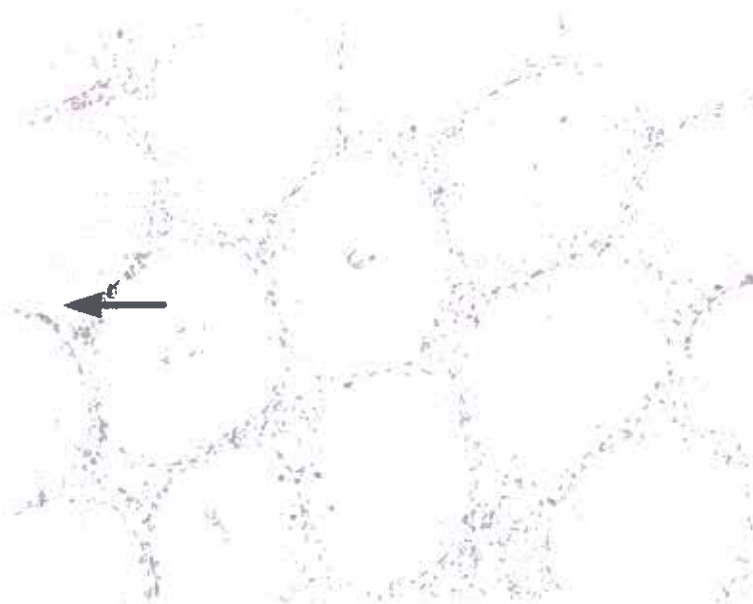
**Obr. č. 5. Tkáň varlete po 44 dnech  
kryptorchismu**

Hematoxylin & eosin, originální zvětšení 200krát



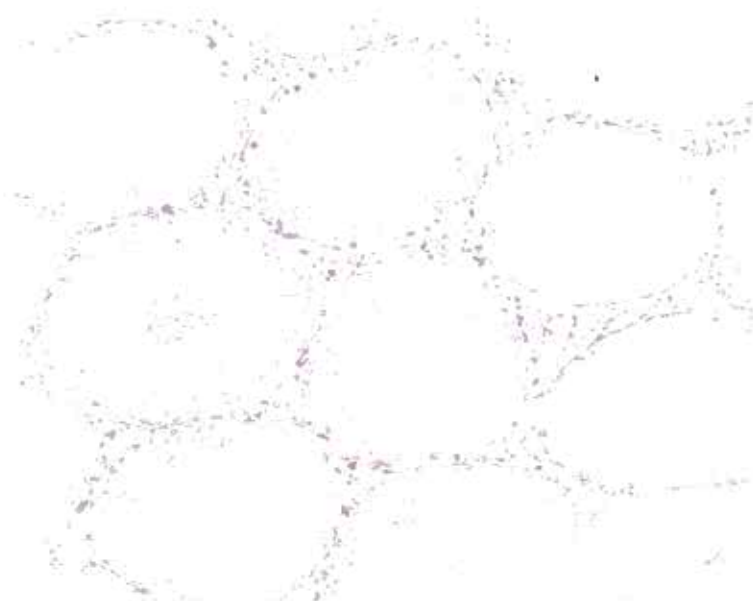
**Obr. č. 6. Tkáň varlete 7 dnů po jedné dávce  
busulfanu**

Hematoxylin & eosin, originální zvětšení 100krát



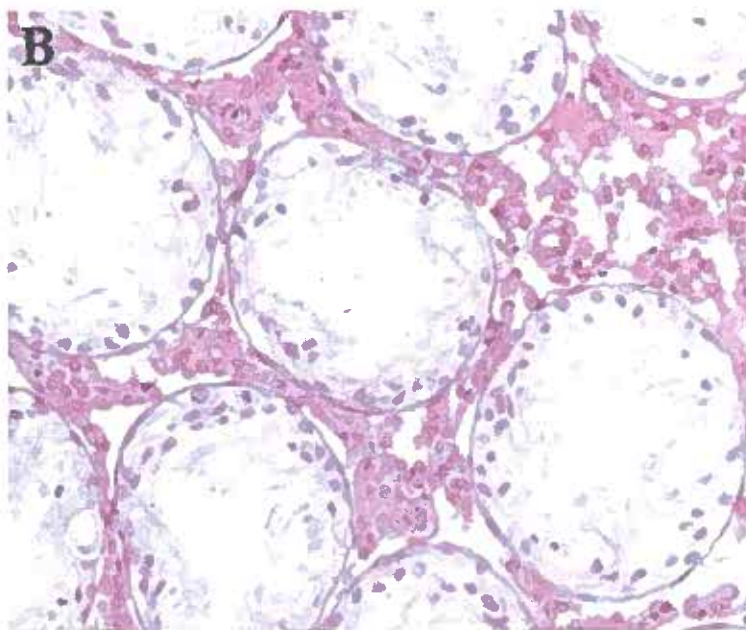
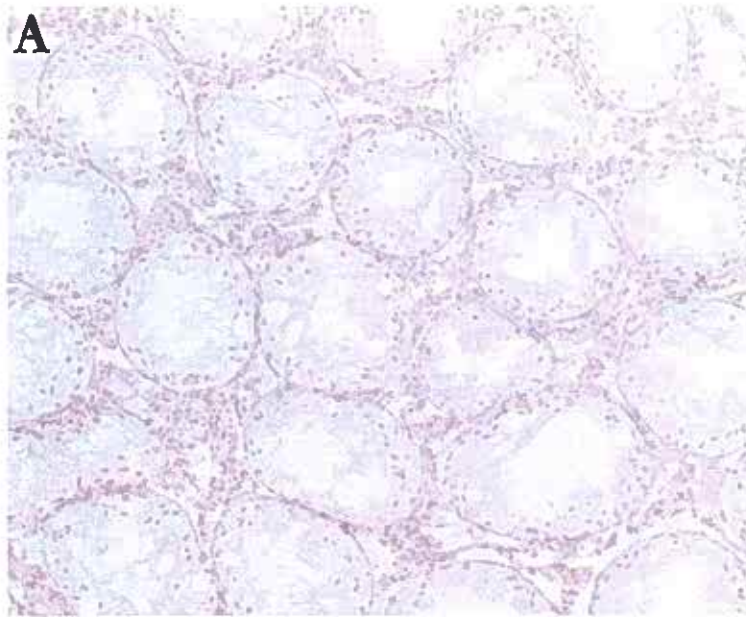
**Obr. č. 7. Tkáň varlete 7 dnů po druhé dávce  
busulfanu**

Hematoxylin & eosin, originální zvětšení 100krát



**Obr. č. 8. Tkáň varlete 14 dnů po druhé dávce  
busulfanu**

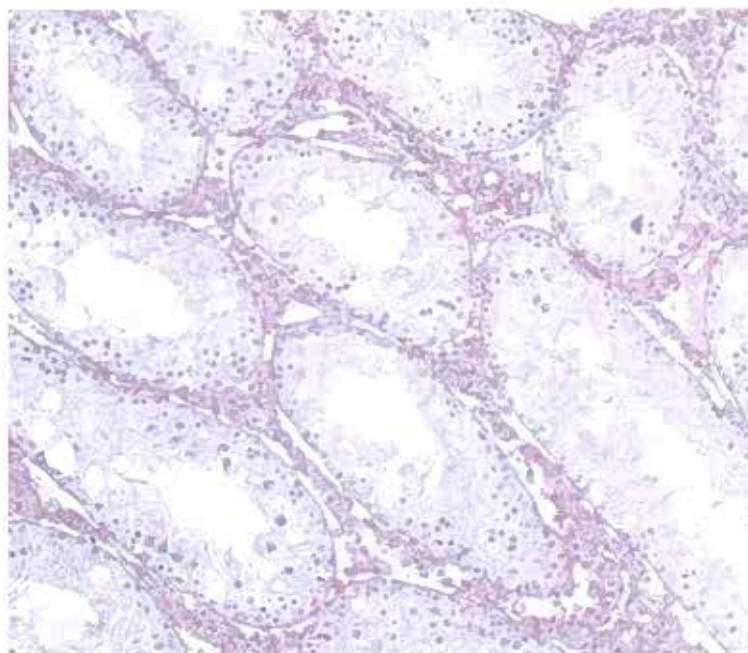
Hematoxylin & eosin, originální zvětšení 100krát



**Obr. č. 9. tkáň varlete 21 dní po druhé dávce busulfanu**

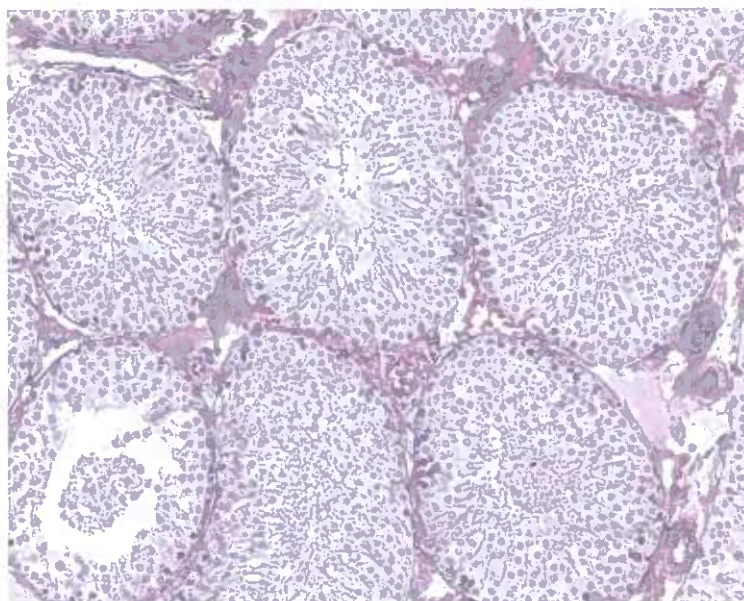
Hematoxylin & eosin, originální zvětšení (A) –  
100krát, (B) -200krát





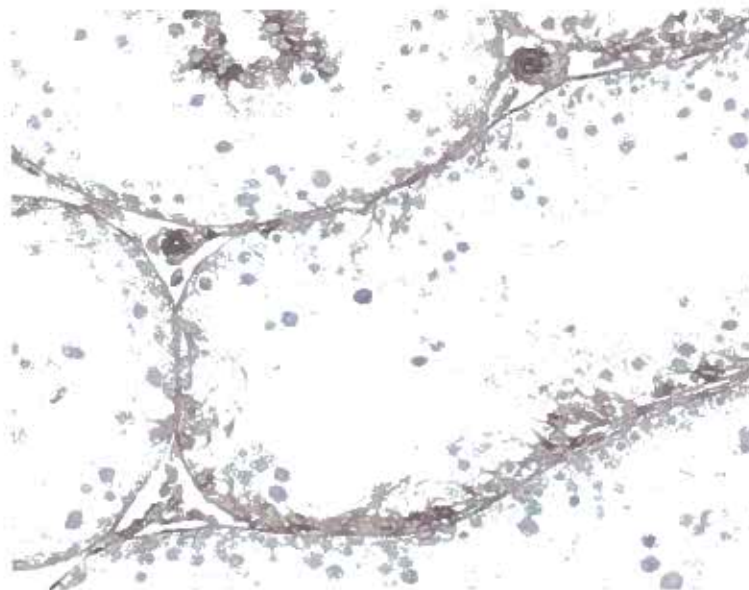
**Obr. č. 10 Tkáň varlete 42 dní po druhé dávce  
busulfanu**

Hematoxylin & eosin, originální zvětšení 100krát



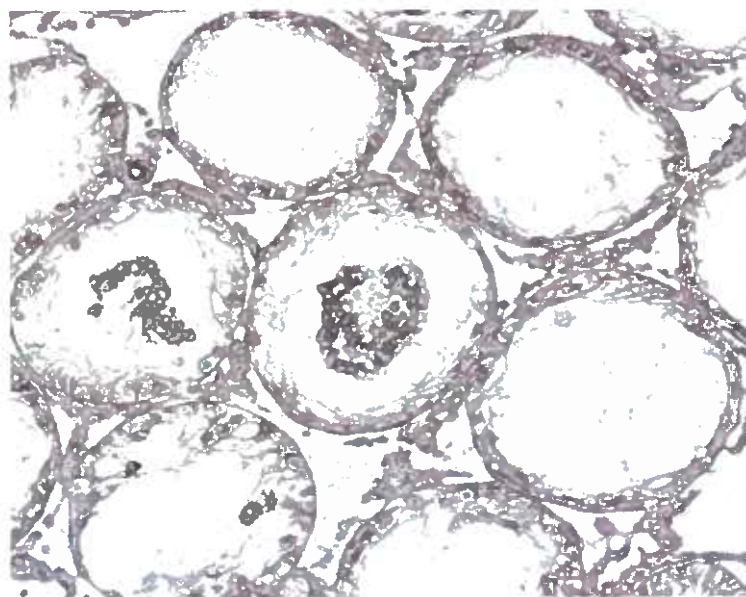
**Obr. č. 11. Tkáň varlete 70 dní po druhé dávce  
busulfanu**

Hematoxylin & eosin, originální zvětšení 100krát



**Obr. č. 12. Expres vimentinu ve varleti po 5 dnech kryptorchismu**

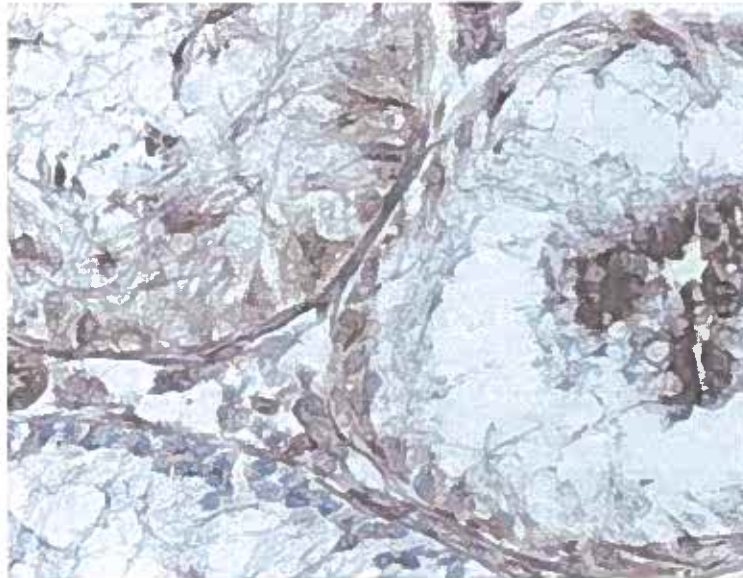
Dobarveno hematoxylinem, originální zvětšení  
200krát



**Obr. č. 13. Expres vimentinu ve varleti po 11 dnech kryptorchismu**

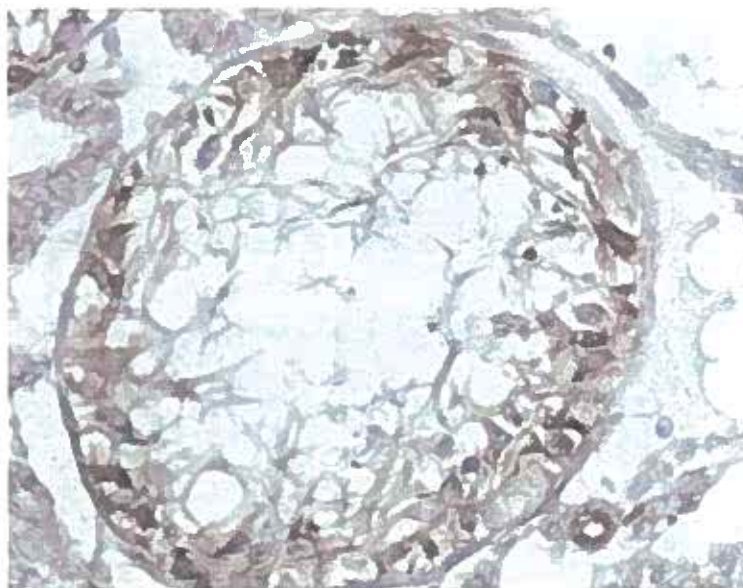
Dobarveno hematoxylinem, originální zvětšení  
100krát





**Obr. č. 14. Expres vimentinu ve varleti po 22 dnech kryptorchismu**

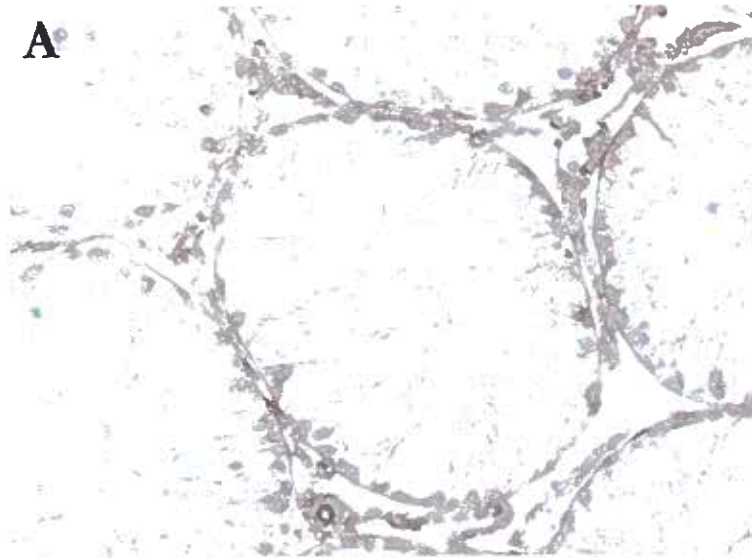
Dobarveno hematoxylinem, originální zvětšení 200krát



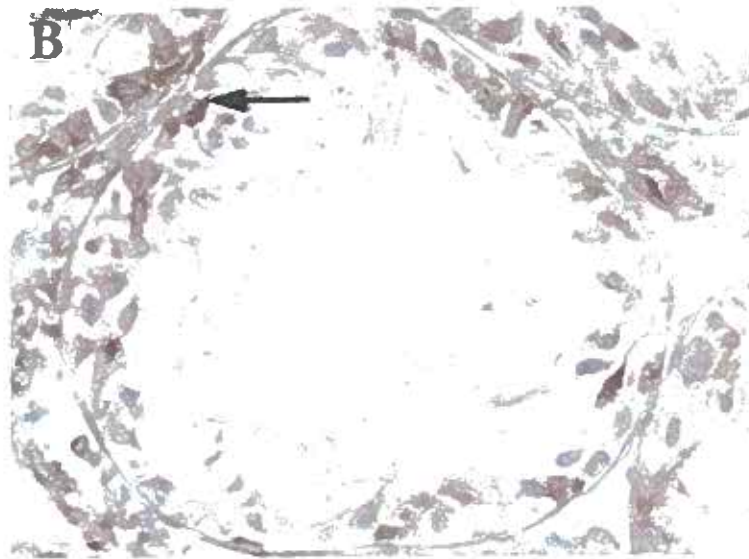
**Obr. č. 15. Expres vimentinu ve varleti po 44 dnech kryptorchismu**

Dobarveno hematoxylinem, originální zvětšení 200krát

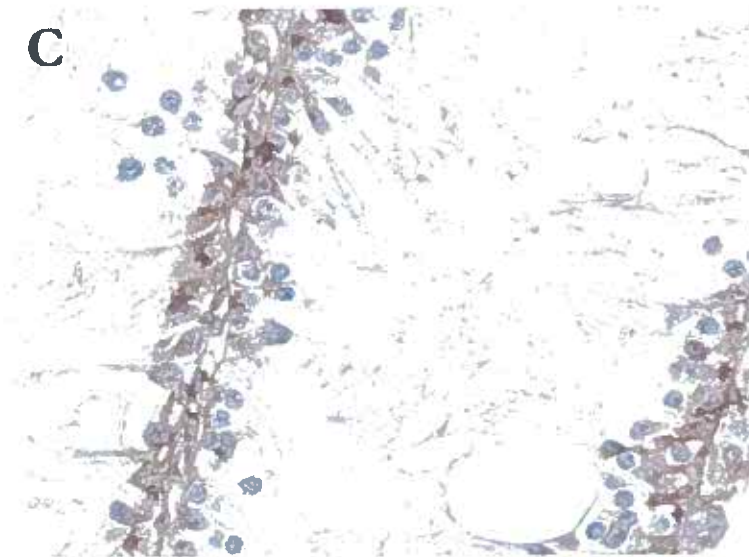
**A**

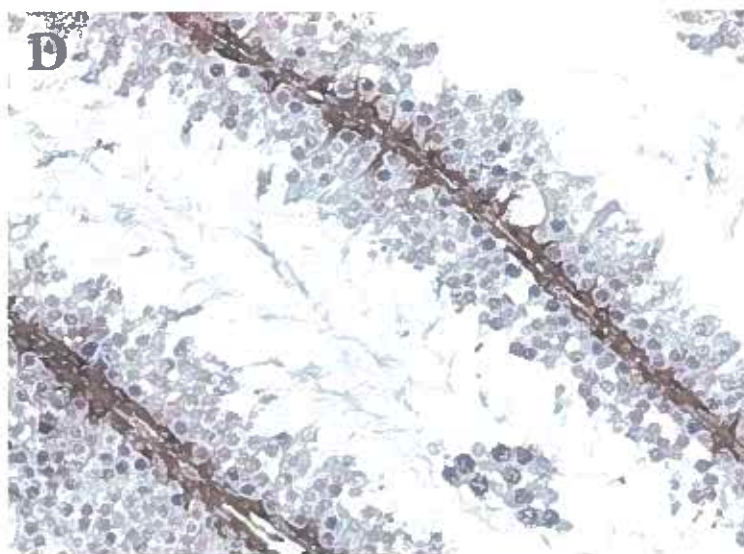


**B**



**C**





**Obr. č. 16. Expres vimentinu po aplikaci dvou dávek busulfanu – (A) 14 dnů, (B) 21 dnů, (C) 42 dnů, (D) 70 dnů**

Dobarveno hematoxylinem, originální zvětšení  
(A, D) – 200krát, (B, C) – 400krát

## DISKUSE

Počet mužů se sníženou fertilitní schopností se v současné populaci stále zvyšuje. Příčinou je přítomnost různých poruch spermatogeneze s přítomností degenerativních změn varlat. Tyto změny mohou být vyvolány vlivem genetických predispozic, některých patologických stavů, výskytem různých polutantů v životním prostředí, ale také vlivem současného životního stylu – stres, kouření, alkohol, léky, apod. (Baker et al., 2000; Sharpe, 2000).

Patologické změny ve varleti vznikají jako výsledek dějů, které se odehrávají na molekulární úrovni. V experimentu, kdy byl experimentálním zvířetem potkan kmene Wistar, jsme porovnávali vliv modelového xenobiotika – busulfanu a vliv operativně navozeného jednostranného kryptorchismu (přesun varlete ze šourku do břišní dutiny) na morfologický obraz tkáně varlete potkana (stav zárodečného epitelu i intersticiální tkáně mezi semenotvornými kanálky) a na spermatogenezi. Za použití histologických a imunohistochemických metod byly posuzovány některé změny odehrávající se ve varleti, a to na úrovni cytoskeletálních vláken, a porovnávány byla též proliferační aktivita testikulárních buněk s rozsahem jejich poškození.

V obou experimentálních modelech bylo pozorováno progredující poškození zárodečného epitelu v semenotvorných kanálcích, ve kterých postupně docházelo k vymizení zárodečných buněk ze zárodečného epitelu a zmenšení průměru semenotvorných kanálků. To bylo spojeno se

snížením hmotnosti varlat a edematózním prosáknutím tkáně varlete. Vznik, průběh a důsledky tohoto poškození v obou experimentech se však lišily.

Během prvního experimentu byl u dospělých potkanů kmene Wistar operativně navozen jednostranný **kryptorchismus** na dobu od 6, 12, 48 hodin, dále 3, 5, 11, 22, 44, 85 až 121 dnů. Pro přehlednost a zkrácení lze intervaly do 14 dnů považovat za krátkodobé, delší než 15 dnů za dlouhodobý kryptorchismus. U zvířat, která byla kryptorchizována na dobu od 6 hodin do 3 dnů, nebyla zaznamenána žádná změna v průměrné hmotnosti kryptorchických varlat oproti varlatům skrotálním, ani skrotálně lokalizovaným varlatům kontrolních zvířat. To se shoduje s údaji uvedenými v literatuře, které udávají signifikantní úbytek hmotnosti kryptorchického varlete nejdříve 4. den od navození kryptorchismu (Courtens and Ploen, 1999; Ogi et al., 1998; Wang et al., 1998).

Po 5. dnech od provedení operačního zákroku byl také v našem experimentu zaznamenán signifikantní úbytek hmotnosti u abdominálně umístěných varlat. Pokles hmotnosti operovaných varlat pokračoval do 22. dne. V intervalech, které následovaly, zůstala hmotnost operovaných varlat přibližně stejná až do 121. dne. V těchto intervalech dosahovala hmotnost operovaného varlete přibližně 40 – 50% hmotnosti neoperovaného varlete. Poškozená kryptorchická varlata byla také menší než varlata skrotální, měkká a silně prosáklá tekutinou, která tvořila většinu hmotnosti kryptorchického varlete. Průměrná hmotnost neoperovaných skrotálních varlat byla ve všech



časových intervalech kryptorchismu srovnatelná s hmotností varlat kontrolních jedinců. Výsledky našeho pozorování jsou v souladu např. s výsledky těchto autorů (Courstens and Ploen, 1999; Ogi et al., 1998; Wang et al., 1998; Zakaria et al., 2000). Existuje ale také práce ukazující úbytek hmotnosti kryptorchického varlete doprovázený kompenzační hypertrofií kontralaterálního skrotálního varlete, jehož hmotnost se postupně zvyšovala a po 6 – 12 týdnech (specifické pro různé kmeny potkanů) se ustálila (Watts et al., 2000).

Morfologický obraz patologických změn ve varleti byl sledován na úrovni světelného mikroskopu. V semenotvorných kanálcích jedinců, u nichž byl operativně navozen kryptorchismus, se poškození zárodečného epitelu projevilo nejprve na úrovni spermatid. V našem experimentu se elongované a kulaté spermatidy začaly oddělovat z epitelu do lumen semenotvorných kanálků u některých jedinců již po 48 hodinách trvání kryptorchismu. Pouze autoři dvou studií uvádějí první známky poškození semenotvorných kanálků již jeden den po experimentálním navození kryptorchismu (Ogi et al., 1998; Wang et al., 1998). Od 3. dne byly spermatidy odlučovány za zárodečného epitelu společně se spermatocyty. K nejmasivnějšímu odlučování zárodečných buněk docházelo v intervalech mezi 3. a 11. dnem trvání kryptorchismu.

Poškození zárodečného epitelu varlete se projevilo také v nadvarlatech, v jejichž kanálcích se vedle postupně se snižujícího množství vyzrávajících spermií objevovaly nejprve nezralé

formy gamet a od intervalu 11 dní často pouze amorfní nebuněčný materiál.

V mnoha kanálcích se v intervalu 3 – 11 dní vyskytoval velký počet vícejaderných buněk v lumen kanálků. Neobvyklé nebyly útvary obsahující v rovině řezu 6 – 8 jader. Tyto útvary vznikaly splynutím kulatých spermatid, některé útvary také sloučením spermatid a spermatocytů. Multinukleární buňky se objevují v semenotvorných kanálcích také při jiných modelech poškození varlat, např. po podvázání chámovodu, kdy je zastaven odtok semenné tekutiny. Zároveň v tomto modelu dochází také dochází k apoptóze zárodečných buněk přibližně ve stejném časovém horizontu jako u kryptorchizovaných zvířat (Anton, 2003).

Ve druhém experimentu byl potkanům intraperitoneálně podáván **busulfan** (v dávce 10 mg/kg). Sledovány byly intervaly 7, 21 a 42 dní po aplikaci jedné dávky a 7, 14, 28, 42 a 70 dní po aplikaci dvou dávek (v odstupu 21 dnů). Jako poslední byl zvolen interval 70 dní (10 týdnů). Za tuto dobu proběhne cyklus spermatogeneze u potkanů kmene Wistar téměř dvakrát, neboť diference gamety trvá přibližně 42 dnů. Podání dávky 40 mg/kg se ukázalo být dávkou letální pro potkana kmene Wistar, ačkoliv literární zdroje udávají i možnost podání vyšších dávek potkanům (Moisan et al., 2003; Wistuba et al., 2002).

Aplikace jedné dávky busulfanu (10 mg/kg) rezultovalo ve statisticky nevýznamný pokles hmotnosti varlat již 21 dnů po podání. V intervalech 7 a 14 dní po druhé dávce byl zaznamenán pokles hmotnosti varlat až o jednu třetinu oproti kontrolní skupině. V časových intervalech 21 až 42 dní po

aplikaci obou dávek busulfanu byl pokles nejmarkantnější a byl zaznamenán až 50% úbytek hmotnosti varlat jako důsledek poškození zárodečného epitelu varlat po aplikaci cytostatika. V posledním časovém intervalu, tj. 70 dní po aplikaci druhé dávky busulfanu, byl zaznamenán hmotnostní nárůst, přesto byla hmotnost varlat stále o jednu třetinu nižší ve srovnání s hmotností varlat v kontrolní skupině. Tento hmotnostní přírůstek je možné si vysvětlit jako důsledek obnovy spermatogeneze a postupného dorůstání zárodečného epitelu. Jiang (1998) ve své práci popisuje také hmotnostní úbytek varlat u potkanů kmene LONG EVANS po aplikaci dvou dávek busulfanu (10 mg/kg hmotnosti zvířete) ve stejném dávkovacím schématu, jako které bylo použito v našem experimentu. Zjistil pokles hmotnosti varlat ve všech sledovaných skupinách (20, 48, 74 a 96 dnů po podání druhé dávky busulfanu) oproti kontrolní skupině. Největší rozdíl byl v časovém intervalu 74 dní (pokles cca o 75%). V tomto intervalu byl v našem experimentu u potkanů kmene Wistar zaznamenán spíše hmotnostní přírůstek, který Jiang pozoroval až v časovém intervalu 96 dní od druhé aplikace busulfanu (Jiang, 1998). Haddad et al. (1997) ve svém pokusu, kdy aplikovali pouze jednu dávku busulfanu (10 mg/kg hmotnosti zvířete) samcům potkana kmene WISTAR, také zaznamenali hmotnostní úbytek varlat. V jejich experimentu byl rozdíl oproti kontrolní skupině nejmarkantnější v časovém intervalu 56 dní, a to více než 50%. Od 77. dne pozorovali již zvyšování hmotnosti, přičemž hmotnost varlat experimentálních zvířat nedosáhla



hmotnosti varlat zvířat v kontrolní skupině ani v časovém intervalu 119 dní po podání jedné dávky busulfanu (Haddad et al., 1997).

Toxicita vlivu busulfanu na tkáň varlete se projevila také zmenšením průměru semenotvorných kanálků a poškozením procesu spermatogeneze (pozvolné degenerativní změny a pokles počtu zárodečných buněk v zárodečném epitelu). Na rozdíl od kryptorchických jedinců došlo u zvířat, kterým byl podáván busulfan, nejprve k vymizení mitoticky se dělicích spermatogonií (částečně již 21 dnů po podání 1. dávky, téměř úplně v intervalech 7 a 14 dní po aplikaci druhé dávky), přičemž spermatocyty a spermatidy zůstávaly přítomny v epitelu a jejich meiotické dělení, resp. spermatohistogeneze, dále pokračovaly. Největší poškození zárodečného epitelu bylo zaznamenáno až v dalších časových intervalech – 21, 28 a 42 dní po druhé dávce busulfanu, kdy došlo k výrazným změnám ve struktuře semenotvorných tubulů. Z epitelu vymizely téměř všechny spermatocyty a spermatidy a při bazální membráně zůstalo zachováno pouze několik spermatogonií. Nejvíce poškozené semenotvorné kanálky byly tvořeny pouze Sertoliho buňkami. Na rozdíl od kryptorchických varlat se spermatidy a spermatocyty v průběhu odlučování z epitelu nespojovaly do mnohjaderných útvarů a v lumen kanálků se téměř výlučně nacházely jednotlivě. Jiang (1998) ve studii, jejíž podmínky byly srovnatelné s našimi, zaznamenal 20 dní po druhé intraperitoneální injekci busulfanu ztrátu většiny spermatogenních buněk a menší počet samostatně přežívajících spermatogonií, vyskytujících se v těsném kontaktu s bazálním

kompartmentem sousedních Sertoliho buněk (Jiang, 1998). Aich et al., kteří aplikovali potkanům kmene Indian house rat (*Rattus Rattus*) pouze jednu dávku busulfanu, nepozorovali 10. den po injekci žádné výraznější změny v přestavbě zárodečných a Sertoliho buněk. 40 dnů po aplikaci busulfanu pozorovali změny ve všech kanálcích, v jejichž epitelu byly pouze spermatogonie, zygotenní spermatocyty a Sertoliho buňky (Aich and Manna, 2001).

Díky spermatogoniím, které přežily, došlo po odeznění účinků busulfanu ke znovunastartování procesu spermatogeneze (od intervalu 28 dnů po podání druhé dávky).

V intervalu 42 a zejména 70 dní po druhé injekci busulfanu byla již obnova a růst zárodečného epitelu pozorována ve většině semenotvorných kanálků. Po 70 dnech došlo k obnově všech vývojových fází zárodečného epitelu – spermatogonií, spermatocytů a v adluminálním kompartmentu kanálků byly přítomny dozrávající spermaticy. Zahájení obnovy spermatogeneze a zárodečného epitelu varlete začalo probíhat u potkana kmene Wistar dříve, než uvádějí jiní autoři ve svých studiích. Aich et al. zaznamenali u potkana Indian house rat až po 70 dnech znovuobjevení se spermatogonií typu A a B a zygotenních spermatocytů, tubuly však stále postrádaly pachytenní spermatocyty, spermaticy a spermatozoa. Aktivní spermatogenezi pozorovali ve většině kanálků až 100 dní po injekci busulfanu – ale již po 56 dnech byly v zárodečném epitelu přítomny spermatocyty (Aich and Manna, 2001). Jiang zaznamenal začátek znovutvorby

zdecimovaného epitelu 48. den po aplikaci busulfanu (potkan kmene Long Evans). 74. den pozoroval v některých kanálcích již spermatidy v akrosomální fázi spermatohistogeneze a 96. den normální spermatogenezi ve většině semenotvorných tubulů. Přesto stejně jako u našich potkanů kmene Wistar zůstaly v zárodečném epitelu některých kanálek přítomny pouze Sertoliho buňky bez přítomnosti jakýchkoliv zárodečných buněk (Jiang, 1998).

Výsledky podobné našim zaznamenali i jiní autoři při použití modelových xenobiotik methylmethansulfonátu a ethandimethansulfonátu (EDMS), tedy látek s chemickou strukturou podobnou busulafnu (Bartlett et al., 1986; Santra and Manna, 2002). Ethandimethansulfonát je alkylační látka, která se často používá v experimentech jako látka toxická pro Leydigovy buňky. Po intraperitoneálním injekci EDMS bylo pozorováno progresivní poškození spermatogeneze již 3. den po aplikaci látky. Z intersticia vymizely Leydigovy buňky (na rozdíl od busulfanu) a v tubulech se vyskytovalo stádium – specifické negenerující pachytenní spermatocyty. K maximálnímu poškození došlo po 14 dnech po podání EDMS, kdy tubuly postrádaly jednu nebo více generací zárodečných buněk, obsahovaly lipidové inkluze či různý počet negenerujících zárodečných buněk. Mezi 21. a 28. dnem se začaly obnovovat Leydigovy buňky v intersticiální tkáni. 70. den po jedné dávce EDMS se kvalitativně normální spermatogeneze obnovila ve velké části semenotvorných kanálek. Několik tubulů však zůstalo ve fázi, kdy v zárodečném epitelu zůstaly

jen Sertoliho buňky a spermatogonie (Bartlett et al., 1986).

V průběhu experimentu jsme se dále zaměřili na změny v uspořádání cytoskeletu v jednotlivých typech buněk varlete. Pomocí imunohistochemických technik byly sledovány změny v expresi intermediárního filamenta **vimentinu**, k nimž docházelo v kontrolních varletech v průběhu spermatogenního cyklu a také během poškození v obu experimentálních modelech.

Expresie vimentinu v epitelu byla relativně málo uniformní a v průběhu spermatogenního cyklu se seskupení vimentinových vláken měnilo. Vždy se ovšem tato vlákna nacházela pouze v Sertoliho buňkách. Vimentin-pozitivní byly také peritubulární myoidní buňky a v intersticiu různé typy buněk ve stěnách testikulárních cév, méně intenzivní nálezy byly v Leydigových buňkách, fibroblastech a buňkách imunitního systému.

Výsledky této práce ukázaly, že podání busulfanu i kryptorchismus rezultovaly ve změny v konfiguraci vimentinových vláken v Sertoliho buňkách. Odlučování zárodečných buněk z epitelu bylo spojeno s kolapsem vimentinových vláken směrem k jádru Sertoliho buněk, kde tvořila intenzivně zbarvený prstenec v blízkosti jádra Sertoliho buněk. Vimentinová vlákna zůstala přítomna v Sertoliho buňkách i v nejpoškozenějších kanálech (byť byla uspořádána v bazálním kompartmentu Sertoliho buněk) a zůstala jim schopnost opět se uspořádat v průběhu obnovy spermatogeneze (u poškození busulfanem).

Význam pozorovaných skutečností nabyde na významu, uvědomíme-li si funkci jednotlivých typů cytoskeletárních vláken v zárodečném epitelu varlete. Vimentinová vlákna tvoří v bazální části epitelu hustou síť, z níž vybíhají apikálním směrem vlákna ke strukturám adhezních spojení v cytoplazmatické membráně Sertoliho buněk (hemidesmosomální spojení mezi Sertoliho buňkami a extracelulární matrix a desmosomální spojení mezi Sertoliho buňkami a sousedními zárodečnými buňkami). Předpokládá se, že vimentinová filamenta (spolu s aktinovými filamenty) mají význam pro ukotvení zárodečných buněk v semenotvorném epitelu (Amlani and Vogl, 1988; Mulholland et al., 2001).

Poškození vimentinových vláken může způsobit poškození „kotvící“ funkce několika typů mezibuněčných spojení. Rozpad těchto filament a mezibuněčných spojení může buď předcházet odlučování zárodečných buněk z epitelu, nebo probíhat současně s ním. Poškození vimentinových filament v Sertoliho buňkách působením některých xenobiotik má souvislost s porušením struktury semenotvorného epitelu. Kolaps vimentinových vláken byl pozorován např. po podání toluenu (Dalgaard et al., 2001), mono(2-ethylexyl)ftalátu (Richburg and Boekelheide, 1996), 2,5-hexadionu (Hall et al., 1991) nebo kolchicinu (Allard et al., 1993). Podobně, experimentální snížení intatestikulární hladiny testosteronu rezultovalo v odlučování spermatid od Sertoliho buněk a v jejich uvolnění do lumen kanálek, které bylo doprovázeno kolapsem vimentinových vláken (Show et al., 2003). Kolaps vimentinových vláken po operabilně

navozeném kryptorchismu pozorovali i Wang et al. (Wang et al., 2002b).

Dávky busulfanu, které byly použity v tomto experimentu, nezpůsobily ireverzibilní poškození zárodečného epitelu ve všech tubulech. Naopak došlo k obnově spermatogeneze. S objevením se zárodečných buněk v zárodečném epitelu došlo také k obnově uspořádání vimentinových vláken v Sertoliho buňkách. Je pravděpodobné, že současně s výskytem nových zárodečných buněk mezi Sertoliho buňkami se vyvíjelo jejich ukotvení k Sertoliho buňkách pomocí různých typů mezibuněčných spojení. Po znovu se objevení spermatocytů v epitelu se vimentinová filamenta začala organizovat v bazální a perinukleární oblasti Sertoliho buněk mezi spermatogoniemi a spermatocyty. V další fázi došlo k růstu a prodlužování apikálních filament ke spermatidám. Je pravděpodobné, že existují nějaké lokální faktory, které ovlivňují reorganizaci intermediárních filament vimentinu z chaotického a náhodného uspořádání do vysoce organizovaných struktur. Spruill et al (1983) prokázal v *in vitro* pokusech, že FSH vyvolává fosforylaci vimentinových jednotek a tím ovlivňuje nové uspořádání filament. Je tedy možné, že po odeznění účinku busulfanu, FSH prostřednictvím cAMP indukuje fosforylaci vimentinových filament a tím umožní reorganizaci vimentinu. Reorganizace vimentinu během obnovy spermatogeneze se však mohou účastnit i další neznámé faktory (Sпруill et al., 1983).

## ZÁVĚR

Cílem této rigorózní práce bylo zhodnotit a posoudit vliv modelového xenobiotika busulfanu a vliv operativně navozeného kryptorchismu na morfologický obraz tkáně varlete potkana kmene Wistar (stav zárodečného epitelu i intersticiální tkáně mezi semenotvornými kanálky), na spermatogenezi a posoudit případné změny v nadvarlatech. Změny, které se dějí ve varleti na úrovni cytoskeletálních vláken byly hodnoceny pomocí histologických a imunohistochemických metod. Dále byla porovnávána proliferační aktivita testikulárních buněk s rozsahem jejich poškození.

Jako pokusný model ke sledování účinku busulfanu na zárodečnou tkáň varlete byli použiti dospělí samci laboratorního potkana kmene Wistar, jejichž hmotnost se pohybovala mezi 200 a 250 g. Jedincům byla aplikována jedna dávka busulfanu (10 mg/kg nebo 40 mg/kg hmotnosti zvířete) nebo byly podány dvě dávky busulfanu (10 mg/kg hmotnosti zvířete v časovém odstupu 21 dnů, a to 11. a 21. den). Následovalo usmrcení zvířat v různých intervalech 7, 14, 21, 28, 42 a 70 dnů po podání busulfanu. Jednostranný kryptorchismus byl u pokusných zvířat navozen operačním zásahem na dobu od 6, 12, 48 hodin, dále pak 3, 5, 11, 22, 44, 85 a 121 dnů.

Výsledky lze shrnout následovně :

1. První změny v zárodečném epitelu **kryptorchizovaných** varlat bylo možné pozorovat v intervalech 2 a 3 dny. Nejdříve docházelo k odlučování spermatid z epitelu, následované odlučováním spermatocytů a



spermatogonií. Během odlučování zárodečných buněk bylo pozorováno splývání těchto buněk do vícejaderných útvarů. Kanálky nadvarlat vyplňovala tekutina, která obsahovala různé vyzrálé buňky zárodečné linie. Poškození spermatogeneze vyústilo také ve snížení průměrné hmotnosti kryptorchických varlat u operovaných zvířat, které bylo zaznamenáno již 5. den po operaci. V intervalech 22 až 121 dnů dosahovala hmotnost operovaného varlete cca 40 – 50% hmotnosti neoperovaného varlete a v zárodečném epitelu byly obsaženy pouze Sertoliho buňky, mezi kterými byly přítomné zbylé spermatogonie. Hmotnost varlat operovaných kontrol, stejně jako hmotnost kontralaterálních skrotálních varlat, nepodléhala v průběhu pokusu výrazným změnám.

2. Histologická analýza na úrovni světelného mikroskopu ukázala, že tkáň varlete je citlivá k aplikaci **busulfanu**. Nejvíce patrné patologické změny byly v intervalech 21 -42 dní po dvou dávkách xenobiotika, kdy došlo k rozsáhlé destrukci zárodečného epitelu, k vakuolizaci Sertoliho buněk, k zániku spermatogeneze a ke zmnožení Leydigových buněk v intersticiu. Mitoticky dělící se buňky byly cílem toxického účinku busulfanu. Na rozdíl od kryptorchických zvířat došlo po odeznění účinku busulfanu v posledních časových intervalech (28, 42 a 70 dní po druhé dávce busulfanu)



k postupné obnově morfologie zárodečného epitelu a spermatogeneze. Poškození spermatogeneze se projevilo také ve snížení hmotnosti varlat a následná obnova byla provázena hmotnostním vzestupem.

## LITERATURA

1. AISLP : SPC, přípravek MYLERAN, 2004
2. Aich S, Manna CK : Histopatological changes of the testicular tissue due due to busulphan administration in the wild Indian house rat (*Rattus rattus*). *Acta Biol Hung*, 2001; 52:105-116
3. Allard EK, Johnson KJ, Boekelheide K : Colchicine disrupts the cytoskeleton of rats testis seminiferous epithelium in a stage-dependent manner. *Biol Reprod* 1993;48:143-153
4. Amlani S, Vogl AW : Changes in the distribution of microtubules and intermediate in mammalian Sertoli cells dutiny spermatogenesi. *Anat Rec*, 1988; 220:143-160
5. Anton E : Arrested apoptosis without nuclear fragmentation produced by efferent duct ligation in round spermatids and multinucleated giant cell sof rat testis. *Reproduction*, 2003; 125:879-887
6. Aumuller G, Hartmann K, Giers U, Schrenck B : Fine structure of the Sertoli cell of the rat testis in experimental unilateral cryptorchidism. *Int J Androl*, 1980; 3:301-311
7. Baker H, Garrett C, Clarke G, Stewart T, Brown E, Venn A, Mizvo A , Farley T : Feasibility of surveillane of changes in human fertility and semen duality, *Int J Androl*, 2000; 23:47

8. Bargawi A, Thummer H, Meacham R : Effect of prolonged cryptorchidism on germ cell apoptosis and testicular sperm count. *Asian J Androl*, 2004; 6:47-51
9. Bartlett JM, Kerr JB, Sharpe RM : The effect of selective destruction and regeneration of rat Leydig cells on the interstitial distribution of testosterone and morphology of the seminiferous epithelium. *J Androl*, 1986; 7:240-253
10. Brinster CJ, Ruy BY, Avarbock MR, Karagenc L, Brinster RL, Orwig KE : Restoration of fertility by germ cell transplantation requires effective recipient preparation. *Biol Reprod*, 2003; 69:412-420
11. Bucci LR, Meistrich ML : Effects of busulphan on murine spermatogenesis : cytotoxicity, sterility, sperm abnormalities, and dominant lethal mutations. *Mutat Res*, 1987; 176:259-268
12. Courtens JL and Ploen L : Improvement of spermatogenesis in adult cryptorchid rat testis by intratesticular infusion of lactate. *Biol Reprod*, 1999; 61:154-161
13. Čihák R : *Anatomie 2*, Praha, Avicenum, 1988, 1. vydání; 268-280
14. Dalgaard M, Hossaini A, Hougaard KS, Hass U, Ladefoged O : Developmental toxicity of toluene in male rats : effects on semen quality, testis morphology, and apoptotic neurodegeneration. *Arch Toxicol*, 2001; 75:103-109
15. du Manoir S, Guillaud P, Camus E, Seigneurin D, Burgas G : Ki-67 labelling in

- postmitotic cells defines different Ki-67 pathways within the 2c compartement. *Cytometry*, 1991; 12:455-463
16. Dylevský I, Druga R, Mrázková O : Funkční anatomie člověka, Praha, Grada Publishing, 2000, 1. vydání; 383-387
17. Evans RM : Vimentin : The conundrum of the intermediate filament gene family. *Bioessays*, 1998; 20:1:79-86
18. Franke WW, Grund C, Schmid E : Intermediate-sized filaments present in Sertoli cells are of the vimentin type. *Eur J Cell Biol*, 1979; 19:269-275
19. Ganong WF : Přehled lékařské fyziologie, Jinočany, H&H, 1997, 1. vydání; 358-365
20. Gavrieli I, Sherman Y, Ben-Sasson SA : Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *Journal of Cell Biology*, 1992; 119:493-501
21. Gaur U, Aggarwal BB : Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Bioch Pharm*, 2003; 66:1403-1408
22. Haddad S, Carvalho TL, Anselmo-Franci JA, Petenusci SO, Favaretto AL : Ultrasound stimulation of rat testes damaged by busulfan. *Ultrasound Med Biol*, 1997; 23:1421-1425
23. Hadziselimovic F : Cryptorchidism. Ultrastructure of normal and kryptorchid testis development. *Adv Anat Embryo Cell Biol*, 1977; 53:3-71
24. Hadziselimovic F : Cryptorchidism, its impact on male fertility. *Eur Urol*, 2002; 41:121-123

25. Hall ES, Eveleth J, Boekelheide K : 2,5-hexanedione exposure alter the rat Sertoli cell cytoskeleton-II intermediate filaments and actin. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1991; 111:443-453
26. Hartl J, Palát K : *Farmaceutická chemie VI*, Praha, Karolinum, 1992, 1. vydání; 171
27. Hassan M, Oberg G, Bekassy AN, Aschan J, Ehrsson H, Ljungmann P, Lonnerholm G, Smedmyr B, Taube A, Wallin I and et al : Pharmacokinetics of high-dose busulphan in relation to age and chronopharmacology. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1991; 28:130-134
28. Hassan M, Oberg G, Ericson K, Ehrsson H, Eriksson L, Invar M, Stone-Elander S, Thorell JO, Smedmyr B, Warne N and et al : In vivo distribution of [11C]-busulphan in cynomolgus monkey and in the brain of a human patient. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1992; 30:81-85
29. Hassan Z, Ljungmann P, Ringden O, Winiarski J, Nilsson C, Aschan J, Whitley HR, Hassan M : Pharmacokinetics of liposomal busulphan in man. *Bone Marrow Transplant*, 2001; 27:479-485
30. Heiskanen P, Billig H, Toppari J, Kaleva M, Arsalo A, Rapalo J, Dunkel L : Apoptotic cell death in the normal and cryptorchid human testis : the effect of human chorionic gonadotropine on testicular cell survival. *Pediatr Res*, 1996; 40:351-356
31. Helfand BT, Chang L, Goldman RD : Intermediate filaments are dynamic and motile

- elements of cellular architecture. *Journal of Cell Science*, 2004; 117, 134-141
32. Henriksen K, Hakovirta H, Parvinen M : In-situ quantification of stage-specific apoptosis in the rat seminiferous epithelium : effects of short-term experimental cryptorchidism. *Int J Androl*, 1995; 18:256-262
33. Huff DS, Hadziselimovic F, Snyder HM, 3rd, Blythe B, Duckett JW : Histologic maldevelopment of unilaterally cryptorchid testes and their descended partners. *Eur J Pediatr Suppl* 2; 1993; 2:11-14
34. Hynie S, Wenke M, Mráz M : *Farmakologie pro lékaře*, II. Díl, Praha, Avicenum, 1984; 791-808
35. Chieffi P., Franco R., Fulgione D, Staibano S : PCNA in the testis of the frog, *Rana esculenta* : a molecular marker of the mitotic testicular epithelium proliferation. *Gen Comp Endocrinol*, 2000; 119: 11-16
36. Ikeda M, Kodaky H, Fukuda J, Shimizu Y, Murata M, Kumagai J, Tahala T : Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. *Biol Reprod*, 1999; 61:393-399
37. Jiang FX : Behaviour of spermatogonia following recovery from busulfan treatment in the rat. *Anat Embryol (Berl)*, 1998; 198:53-61
38. Johnson AD, Tomeš WR, Vandemark NL : *The testis*, New York, Academic Press, Inc., 1970, Volume I.; 348-395
39. Junqueira CL, Carneiro J, Kelley RO : *Základy histologie*, Jinočany, H@H, 1997, dotisk 1999; 63-68, 402-417

40. Kalous O, Mayer J, Maláškova L :  
Vysokodávkovaný busulfan – Monitorování  
plazmatických hladin a úprava dávkování u  
dospělých. Čas Lék Čes, 2001, čl. 23;  
140:724-728
41. Kanastu-Shihonara M, Toyokuni S, Morimoto  
T, Matsui S, Honjo T, Shinohara T : Functional  
assessment of self-renewal activity of male  
germline stem cells following cytotoxic  
damage and serial transplantation. Biol  
Reprod, 2003; 68:1801-1807
42. Keleklar A, Thompson CB : Bcl-2-family  
proteins : the role of the BH3 domain in  
apoptosis. Trends Cell Biol, Aug 1998;  
8:8:324-330
43. Kill IR : Localisation of the Ki-67 antigen within  
the nucleolus. Evidence for a fibrillar-in-  
sufficient region of the dense fibrillar  
component. J Cell Sci, 1996; 109:1253-1263
44. Klonish T, Fowler PA, Hombach-Klonisch S :  
Molecular and genetic regulation of testis  
descendent and external genitalia  
development. Dev Biol, 2004; 270:1-18
45. Kopecký M : Dizertační práce : Morfologické a  
funkční změny v samčím reprodukčním  
systému – ovlivnění hematotestikulární  
bariéry. FaF UK Hradec Králové, 2006
46. Kopecky M, Semecky V, Nachtigal P :  
Vimentin expression during altered  
spermatogenesis in rats. Acta Histochemica,  
2005; 107:279-289
47. Kumagai A, Kodama H, Kumagai J, Fukuda J,  
Kawamura K, Tanikawa H, Sato N, Tanaka T :  
Xanthine oxidase inhibitors suppress testicular



- germ cell apoptosis induced by experimental cryptorchidism. *Mol hum Reprod*, 2002; 8:118-123
48. Leblond CP, Clermont Y : Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann N. Y. Acad Sci* 55, 1952; 548-573
49. Lee PA, Clermont Y : Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann NY Acad Sci*, 1952; 55:548-573
50. Leissner J, Filipa D, Wolf HK, Fish M : The undescended testis : considerations and impact on fertility. *BJU Int*, 1999; 83:885-891; quiz 891-892
51. Liang JH, Sankai T, Yoshida T, Yoshikawa Y : Immunolocalization of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) testes dutiny postnatal developement. *J Med Primatol*, 2001; 30:107-111
52. Liu SC, Klein-Szanto AJ : Markers of proliferation in normal leukoplakic oral epithelia. *Oral Oncol*, 2000; 36:145-151
53. Lüllmann H, Mohr K, Ziegler A, Bieger D : Barevný atlas farmakologie, Grada, Praha, 2001; 296-298
54. Maekawa M, Kazama H, Kamimura K, Nagano T : Changes in the arrangement of actin filaments in myoid cells and Sertoli cell sof rat testes dutiny postnatal developement and after experimental cryptorchidism. *Anat Rec*, 1995; 241:59-69;
55. Maršala J : Tkaniva a orgány člověka, Bratislava, Avicenum, 1983; 790-805

56. Melichar B et al : Chemická léčiva, Praha, Avicenum, 1987; 790-805
57. Mendis-Handagama SM, Kerr JB, de Kretser DM : Experimental cryptorchidism in the adult mouse : II. A hormonal study. J Androl, 1999; 11:548-554
58. Moisan AE, Foster RA, Betteridge KJ, Bahněl AC : Dose-response of RAG2-/-/gammaC-/- mice to busulfan in preparation for spermatogonial transplantation. Reproduction, 2003; 126:205-216
59. Mulholland DJ, Dedhar S, Vogl AW : Rat seminiferous epithelium contains a unique junction (Ectoplasmic specialization) with signaling properties both of cell/cell and cell/matrix junctions. Biol Reprod, 2001; 64:396-407
60. Ogi S, Tanji N, Yokoyama M, Takeuchi M, Terada N : Involvement of Fas in the apoptosis of mouse germ cells induced by experimental cryptorchidism. Urol Res, 1998; 26:17-21
61. Pacík D : Chirurgická řešení erektilní dysfunkce implantací senilní protézy, publikace v tisku
62. Paramio JM, Jorcano JL : Beyond structure : Do intermediate filaments modulate cell signalling ? Bioessays, 2002; 24:9:836-844
63. Richburg JH, Boekelheide K : Mono-(2-ethylexyl) phtalate rapidly alters both Sertoli cells vimentin filaments and germ cell apoptosis in zouny rat testis. Toxicol Appl Pharmacol, 1996; 137:42-50

64. Saldago J, Garcia-Saez AJ, Malet G, Mingarro I, Perez-Paya Y : Peptides in apoptosis research. *J Peptide Sci*, 2002; 8:543-560
65. Santra KB, Manna CK : Antifertility effects of methylmethane sulphonate on male reproductive organ of wild Indian house rat : histological and histochemical characteristics. *Endocr Regul*, 2002; 36:123-131
66. Savill J, Fadok V : Corpuse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*, 2000; 407:784-788
67. Silbernagl S, Lang F : Atlas patofyziologie člověka, Praha, Grada, 2001; 272
68. Spruill WA, Steiner AL, Tres II, Kierszenbaum AL : Follicle stimulating hormone-dependent phosphorylation of vimentin in cultures of rat Sertoli cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003; 80:993-997
69. Suárez-Quian CA, Martinou-García F, Nistal M, Regadera J : Receptor distribution in adult human testis. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999; 84:1:350-358
70. Štork et al : Lékařské repertorium, Praha, Avicenum, 1981, 4. vydání; 942
71. Thornberry NA, Lazebnik Y : Caspases : enemies within. *Science*, 1998; 281:1312-1316
72. Trávníček T et al : Speciální patologická fyziologie, Praha, Avicenum, 1978, 1. vydání; 564
73. Wang J, Al-Lamki RS, Zhang H, Kirkiles-Smith N, Gaeta ML, Thiru S, Pober JS, Bradley JB : Histamine antagonizes Tumor necrosis factor (TNF) signalling by stimulating TNF receptor

- shedding from the cell surface and the Golgi storage pool. *J Biol Chem*, 2003; 13:21751-21760
74. Wang N, Stamenovic D : Mechanics of vimentin intermediate filaments. *Journal of Muscle Research and cell motility*, 2002; 23:535-540
75. Wang ZQ, Todani T, Watanabe Y, Toki A, Obuta K, Miyamoto O, Toyoshima T, Itano T : Germ-cell degeneration in experimental unilateral cryptorchidism : role of apoptosis. *Pediatr Surg Int*, 1998; 14:9-13
76. Wang ZQ, Watanabe Y, Toki A, Itano T : Altered distribution of Sertoli cell vimentin and increased apoptosis in cryptorchid rats. *J Pediatr Surg*, 2002b; 37:648-652
77. Watts LM, Hasthorpe S, Farmer PJ, Huston JM : Apoptotic cell death and fertility in three unilateral cryptorchid rat models. *Urol Res*, 2000; 28:332-337
78. Winters S : Seminiferous tubule androgen receptors in experimental cryptorchidism. *J Endocr*, 1987; 8:148-154
79. Winter SJ : Seminiferous tubule androgen receptors in experimental cryptorchidism, *J Endocr*, 1987; 148-154
80. Wistuba J, Schlatt S, Cantaw C, von Schonfeldt V, Nieschlag E, Behr R : Transplantation of wild-type spermatogonia leads to complete spermatogenesis in testis of cyclin D3,5'-adenosine monophosphate response element modulator-deficient mice. *Biol Reprod*, 2002; 67:1052-1057

81. Zakaria O, Shono T, Imajima T, Suita S :  
Comparative studies of fertility and histologic  
development of contralateral scrotal testes in  
two rat model sof unilateral cryptorchidism.  
Pediatr Surg Int, 2000; 16:498-501
82. Zhu LJ, Zong SD, Phillips DM, Moo-Young AJ,  
Bardin CW : Changes in the distribution of  
Sertoli cell vimentin and increased apoptosis  
in cryptorchid rats. J Pediatr Surg, 2002;  
37:648-652
83. Zrzavý J : Anatomie pro stomatology, Praha,  
Avicenum, 1978; 272-277