

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

**TAVŞAN TESTİSLERİNİN MORFOLOJİK ÖZELLİKLERİ İLE
YAPISINDA BULUNAN İMMUN SİSTEM HÜCRELERİ ÜZERİNDE
İMMUNOHİSTOKİMYASAL ÇALIŞMALAR**
Proje No: VA-07-07

Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Feyzullah BEYAZ
Veteriner Fakültesi/Temel Birimler

Güner Küçük BAYRAM
Veteriner Fakültesi/Temel Birimler
Emel ALAN
Veteriner Fakültesi/Temel Birimler

Mart 2010
KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın parasal kaynağını sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederiz.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET.....	5
ABSTRACT.....	7
1. GİRİŞ.....	9
2. GENEL BİLGİLER.....	11
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	24
4. BULGULAR.....	25
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	43
6. KAYNAKLAR.....	60

TAVŞAN TESTİSLERİNİN MORFOLOJİK ÖZELLİKLERİ İLE YAPISINDA BULUNAN İMMUN SİSTEM HÜCRELERİ ÜZERİNDE İMMUNOHİSTOKİMYASAL ÇALIŞMALAR

ÖZET: Çalışma, tavşan testis ve epididimislerinde vimentin, sitokeratin, α -SMA, desmin, laminin, S100, VEGF, RAM11 ve CD68'in varlığını ve lokalizasyonunu immunohistokimyasal yöntemle belirlemek amacıyla planlanmıştır. Araştırmada 15 adet sağlıklı erişkin erkek Yeni Zellanda tavşanından alınan testis ve epididimisler kullanıldı. Immunohistokimyasal boyamalar için Strept-ABC boyama metodu uygulandı. Vimentin immunoreaktivitesi, seminifer tubüllerdeki Sertoli hücrelerinin perinükleer sitoplazmalarında, intertübüler alanlarda Leydig hücrelerinde, tubulus rektus ve rete testis epitelleri ile kan damarı endotellerinde belirlendi. Sitokeratin immunoreaktivitesi testiste belirlenmezken, epididimiste duktuli eferentis ve duktus epididimis epitellerinde gözlemlendi. α -SMA immunreaktivitesi, seminifer tubüllerdeki peritübüler myoid hücrelerde, rete testis, duktuli eferentis ve duktus epididimis epiteli altında uzanan myofibroblastlar ile damar duvarı ve tunika albugineada bulunan düz kas hücrelerinde belirlendi. Desmin için yapılan boyamalarda, desmin immunreaktivitesinin α -SMA'nınkinden benzerlik gösterdiği dikkati çekti. Anti-laminin primer antikoru ile yapılan boyamalarda, seminifer tubüllerin bazal lamina ve peritübüler myoid hücrelerle bazı Sertoli hücrelerinin sitoplazmasında pozitif immunreaksiyon gözlemlendi. Anti-VEGF primer antikoru ile yapılan boyamalarda, seminifer tubüllerde bazı Sertoli hücreleri ile germ hücrelerinin sitoplazmasında ve intersitisyel alanlarda Leydig hücrelerinin sitoplazmasında pozitif immunreaksiyon gözlemlendi. Bu hücrelerdeki boyanmanın granüler tarzda olduğu dikkati çekti. Testislerde, seminifer tubül duvarındaki hücrelerden sadece Sertoli hücreleri ile intertübüler alanlarda bazı Leydig hücrelerinde S100 pozitifitesi belirlendi. Pubertal dönemdeki tavşan testislerinde ise, seminifer tubulusların duvarındaki Sertoli hücrelerinde, terminal segmentin modifiye Sertoli hücrelerinde ve tubulus rektus epitelinde S100 pozitif immunreaksiyon gözlemlendi. Testisin intersitisyel dokusunda çok sayıda

RAM11 pozitif makrofaj belirlendi. Bazı RAM11 pozitif makrofajların özellikle Leydig hücrelerine yakın olarak lokalize olduğu dikkati çekti. Seminifer tubül epitellerinde ise bazal yerleşimli az sayıda RAM11 pozitif makrofaj tespit edildi. Epididimisin intersitisyel dokusunda da çok sayıda RAM11 pozitif makrofaj belirlendi. Kaput, korpus ve kauda epididimiste tüm duktus epididimis boyunca, intraepitelyal yerleşimli RAM11 pozitif makrofajlar tespit edildi. Bu bulgulara ilaveten, duktuli eferentislerin epitelinde RAM-11 pozitif immunreaksiyon görüldü. Testiste ve epididimide CD68 için yapılan boyamalarda ise negatif immunreaksiyon belirlendi. Sonuç olarak, Sertoli hücreleri ile tubulus rektus ve rete testis epitel hücrelerinin vimentin intermediyer filamanlarını içermesi, tavşan testislerinde bu yapıların mezenşimal kökenli olduğunun belirtisidir. Ayrıca, α -SMA ve desminin aynı hücrelerde bulunması, spermatozoanların ve testiküler sıvının rete testis ve epididimise doğru taşınması ve duktus epididimis boyunca spermin geçişinde bu iki proteinin birlikte görev yaptığını göstermektedir. İnsan ve bazı hayvanların testislerindeki benzer şekilde, tavşan testislerinde de VEGF'ün varlığının belirlenmesi bu proteinin testis fizyolojisinde ne kadar önemli olabileceğinin bir göstergesidir. Multifonksiyonel özellikteki S100 proteinin Ankara tavşanı testislerindeki hücresel lokalizasyonunun laboratuvar hayvanları, primatlar ve karnivorlardan daha çok domuz ve ruminant testislerine benzerlik gösterdiği sonucuna varıldı. Makrofajlar, tavşan testis ve epididimisinin intersitisyumunda yaygın bir biçimde yerleşim göstermektedir. Tavşan testis ve epididimisinde belirlenen RAM11 pozitif makrofajlar muhtemelen insan ve kemirgenlerin testis ve epididimislerindeki makrofajlarla benzer hücresel fonksiyonlara sahiptirler.

Anahtar Kelimeler: α -SMA, desmin, epididimis, laminin, makrofaj, RAM11, S100 proteini, sitokeratin, tavşan, testis, vimentin, VEGF.

IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDIES ON THE MORPHOLOGICAL PROPERTIES AND IMMUNE SYSTEM CELLS IN IT'S STRUCTURES OF RABBIT TESTIS

ABSTRACT: This study was planned to determine the immunohistological localization of vimentin, cytokeratins, α -SMA, desmin, laminin, S100, VEGF, RAM11 and CD68 in rabbit testis and epididymis. The testis and epididymis patterns taken from fifteen healthy, adult, male New Zealand rabbits formed the material of our study. For the immunohistochemical stainings, a strept-ABC immunohistochemical staining procedure was applied. The vimentin immunoreactivity was determined in perinuclear cytoplasm of Sertoli cells, epithelium of tubuli recti and rete testis, and endothelium of blood vessels. The cytokeratin immunoreactivity was defined in the epithelium of ductuli efferentes and ductus epididymis, but not in testis. α -SMA immunostaining was found in peritubular cells of the seminiferous epithelium, the myofibroblasts underlied the epithelium of rete testis, ductuli efferentes and ductus epididymis, and the smooth cells in wall of vessels and tunica albuginea. In the staining for desmin, the desmin immunoreactivity was similar to that of α -SMA. S100 positive immunoreaction was shown in the Sertoli cells in seminiferous tubules, modified Sertoli cells in the terminal segment and epithelium of tubulus rectus. Numerous RAM11 positive macrophages were determined in the intersitium of testis. Certain RAM11 positive macrophages were observed to be close to Leydig cells. In the epithelium of seminiferous tubules, few RAM11 positive macrophages that basally located were defined. A great number of RAM11 positive macrophages were also identified in the intersitium of epididymis. Intraepithelial RAM11 positive macrophages were found in overall ductus epididymis of caput, corpus and cauda epididymis. In addition these findings, a RAM11 positively immunoreaction was especially seen in epithelium of ductuli efferentis. However, the negative immunoreaction was determined in testis and epididymis in staining for CD68. In conclusion, the vimentin is found in the Sertoli cells and epithelium of tubulus rectus or rete testis suggest

that those structures are derived from mesoderm. Furthermore, the α -SMA and desmin are present identical cellular structures exhibit that those proteins together serve to move the spermatozoa and testicular fluid towards rete testis and epididymis. In conclusion, the cellular localization of multifunctional S100 protein in Angora rabbit testis is similar to the testis of pig and ruminants rather than testis of laboratory animals, primates and carnivore. The macrophages are widely localization in testis and epididymis of rabbit. Probably, RAM11 positive macrophages determined in the rabbit testis and epididymis possess the cellular functions similar to those testis and epididymis of human and rodents.

Key Words: α -SMA, cytokeratin, desmin, epididymis, macrophage, rabbit, RAM11, S100, testis, vimentin, VEGF.

GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

Testisler, erkek bireyin seksüel özellikleri ve üreme kabiliyetiyle direk ilişkili olan bir organ çiftidir. Bu ilişki 2000 yıl öncesinde bile gözlenmiştir. Milattan 300 yıl önce insanlarda ve hayvanlarda bu ilişkinin ilk tanımlamasını yapmıştır. Aristo, cinsel olgunlaşmaya erişmemiş erkek kuşların kastrasyonunun, ibikte renklenme ve dişilere ilgi duyma gibi seksüel özelliklerin gelişimini engellediğini görmüştür. Erkek cinsiyet özelliklerinin oluşmasında testisin rolü üzerine ilk gerçek kanıt 19. yüzyılın ortalarında Berthold (1849) tarafından ortaya konulmuştur. Berthold, horozların kastrasyonundan sonra ibiklerinde atrofinin olduğunu testislerin abdominal boşluğa tekrar implante edilmesi ile de atrofinin önlenebileceğini göstermiştir. Günümüzde, testislerin erkek bireyin bedenindeki çok özel fonksiyonları artık iyi bilinmektedir. Prolifere olan totipotent köken hücreler içermeleri, mayozun gözleendiği tek erkek organı olmaları ve sahip oldukları endokrin aktiviteleri ile bireyin fenotipini belirleyebilmeleri ile testisler özel bir organ konumundadır. Testisin sahip olduğu tüm bu spesifik özellikler belirli gen örneklerinin koordineli ekspresyonunu sağlayan belirli endokrin ve lokal mekanizmalar tarafından düzenlenirler.

Testisin, germ hücrelerinin üretilmesi ve cinsiyet hormonlarının yapılması olmak üzere iki ana fonksiyonu vardır. Pubertaya erişmiş erkek bireyde, germ hücreleri mayoz bölünme geçirerek çeşitli gelişim aşamaları sonucunda ileri derecede özelleşmiş spermatozoanları şekillendirirler. Germ hücrelerinin gelişimi ve farklılaşması sırasında, çok sayıda hücre içi ve yüzeyine ait proteinler ortaya çıkarken, oluşan bu otoantijenlere karşı bir immunolojik yanıt oluşmaksızın tolerans şekillenir.

Hücre iskeleti (sitoskeleton), mikrofilamanlar (aktinler, 6-7 nm), intermediyer filamanlar (sitokeratinler, vimentin, desmin, 8-10 nm) ve mikrotübüluslardan (tübülinler, 25 nm) oluşan protein tabiatında aktif sitosolik bir oluşumdur. Sitoskeletonu oluşturan bu proteinlerin hücre yapısı ve fonksiyonları üzerindeki görevleri; hücreye şekil verme, kutuplaşma, organelerin

konumlandırılması, sitoplazmik uzantıların desteklenmesi ve organellerin hücre membranına bağlanması olarak açıklanmaktadır.

İsmi yüzde yüz doymuş amonyum sülfat solüsyonunda eriyebilme özelliğinden alan S100 (soluble in 100% saturated solution of ammonium sulphate), farklı dokularda dağılım gösteren asidik tip EF-el yapısına sahip bir kalsiyum bağlayıcı proteinlerdir. S100 proteinleri, hücre içi kalsiyum metabolizmasında önemli rolleri olan ve etkisini vimentin, desmin, tubulin, p53 gibi farklı hedef proteinlerle etkileşime girerek gösteren moleküllerdir.

Sahip olduğu özellikler sayesinde testis üzerinde fazlaca araştırma yapılan bir organ konumundadır. Son yıllarda ise gelişen teknolojiye paralel olarak insan ve çeşitli hayvan türlerinin testisleri üzerinde çok sayıda araştırma yapılmıştır. Araştırmalar özellikle, testislerin morfolojik yapısal özelliklerinin ortaya konulması yanında, yapısında bulunan immun sistem hücrelerinin testisteki fonksiyonlarına odaklanmıştır. Bununla birlikte araştırmaların bir çoğunun insan, rat ve fare üzerinde yoğunlaştığı, diğer türlerde ise daha az sayıda çalışmanın olduğu görülmektedir. Yapılan literatür taramaları sonucunda, araştırmalarda sıkça kullanılan bir deney hayvanı olmasına karşın, tavşan testisinin yapısal ve immunolojik özelliklerinin belirlendiği herhangi bir araştırmanın olmadığı dikkatimizi çekmiştir.

Bununla birlikte, yapılan literatür taramalarında tavşanların testis ve epididimislerinde sitoskelatal proteinler, S100 ve immunsistem hücrelerinin varlığı ve lokalizasyonlarıyla ilgili herhangi bir araştırmaya rastlanılmamıştır. Çalışma, tavşan testis ve epididimislerinde vimentin, sitokeratin, α -SMA, desmin, laminin, S100, VEGF, RAM11 ve CD68'in varlığını ve lokalizasyonunu immunohistokimyasal yöntemle belirlemek amacıyla planlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

Tavşan testisleri, yassı oval bir şekle sahiptirler ve hayvanın arka bacaklarının arasında vücudun uzun eksenine biraz çapraz pozisyonda (kariniyomedial-kaudalateral) yerleşim gösterirler. Erişkin bir tavşan testisi 7,2-7,8 ağırlığında ve 20,5-21,1 mm uzunluğundadır (Çakır ve ark., 2001). Testis yüzeyinin büyük bir bölümü seröz bir membran olan *tunica vaginalis propria* ile çevrilidir. Tunica vaginalis'in altında sıkı düzensiz bağ dokudan oluşan beyaz kalın fibröz bir katman olan *tunica albuginea* bulunur. *Tunica albuginea*'nın yapısında daha fazla kollajen iplikler olmak üzere az miktarda da elastik iplikler bulunur. Aygır, koç ve domuz testislerinde ise bunların yanısıra düz kas hücrelerine de rastlanılmaktadır (Abd-Elmaksud 2005; Wrobel 1998). *Tunica albuginea, septula testis* adı verilen trabeküllerle organın içine doğru uzantılar gönderir. Bu septalar köpek ve domuzda tam iken, diğer evcil hayvanlarda geniş intravasküler damarlarla çevrelenmiş ancak gözle çok iyi fark edilemeyen bağdokusu trabekülleri şeklindedir. Testicular septa, mediastinumdan tunica albugineya radyer tarzda uzanır ve organı *lobuli testis* adı verilen pramidal kompartımanlara ayırır. Her bir lobçuk kıvrımlı 1-4 adet *tubulus seminiferustan* oluşur (Wrobel 1998). Erişkin hayvanların testislerinin %80'ini seminifer tubuller oluştururken, geriye kalan %20'sini içerisinde bol miktarda Leydig hücresi bulunan destekleyici bağ dokusu oluşturur. Tubuller genellikle kıvrımlı olup, dallanabilir veya kör uçlarla sonlanabilir. Her bir lobulün apeksinde seminifer tubuller iletilici kanal sisteminin bir parçası olan *tubuli rektiye* geçerler. Bu yapılar daha sonra mediastinum bağ dokusu içerisinde epitelle çevrili boşlukların oluşturduğu pleksiform bir sistem olan *rete testisi* oluştururlar. İntertubuler boşluklar gevşek bir bağ doku ile doludur. Bu bağ dokusu içerisinde kan ve lenf damarları, fibroblastlar, mononükleer lökositler ve intersitisyel endokrin hücreleri (Leydig hücreleri) bulunur (Ariyaratne 2000; Kierszenbaum 2006).

Tubuli seminiferus kontortiler, hayvan türlerinin çoğunda 150-300 µm çapında ve 30-70 cm uzunluğunda iki uçlu kıvrımlı borucuklardır. Bu borucuklar *lamina propria* ile çevrelenmiş çok katlı germinal bir epitel ile çevrilidirler ve bir noktada birleşen her iki uç özelleşmiş bir terminal segment ile tek düz bir testiküler tüpe dönüşür. Histolojik olarak seminifer tubuller 3 bölümden oluşur. Bunlar, *lamina propria*, Sertoli hücreleri ve spermatogenik hücrelerdir (Wrobel 1998). Seminifer tubüllerin lamina propriyası, sistemik kan dolaşımı ve Sertoli hücreleri ile spermatogoniumların hücre membranları arasında stratejik bir yerleşime sahiptir. Seminifer tubul epitelinin hemen altında 2 katlı bir bazal membran bulunduğu EM ile belirlenmiştir. Bazal membranın altında tip I kollogenleri içeren açık renkli bir zon bulunmaktadır. Bu zonun periferinde peritubuler miyoid veya miyofibroblast hücreleri olarak bilinen yassılaştırmış bir hücre katmanı bulunmaktadır. Bu katmanı lenfatik endotelial ve fibroblast hücre katmanı izler. Seminifer tubulleri çevreleyen yapıların hepsi birden *lamina propria* olarak tanımlanır (Christl 1990; Dym 1994). *Lamina propria*'nın kalınlığı ve içerdiği hücre tipleri hayvan türleri arasında değişiklikler gösterir. *Lamina propria*'da bulunan myoid veya myofibroblastlar olarak bilinen hücreler, seminifer tubullerde spermatozoanın ve testiküler sıvının transportu ile ilişkili kontraktıl yapılardır. Bununla birlikte, *lamina propria* intersitisyumdan seminifer tubullerdeki germinal epitele geçen maddeler için geçirgen bir bariyer oluşturmaktadır (Abd-Elmaksud 2006; Christl 1990; Leeson ve Forman 1981).

Sertoli hücreleri, seminifer tubuller içerisindeki tek somatik (non-germinal) yapılardır. Sertoli hücreleri *basal laminadan* seminifer tubullerin lumenine doğru uzanan ve sitoplazmik uzantıları ile komşu germ hücrelerini sararak onlara fiziksel ve fizyolojik destek sağlayan kolumnar hücrelerdir (Maddocks ve Setchell 1988). Sertoli hücrelerinin sayısı ile, hem testis hacmi, hem de günlük sperm üretimi arasında kuvvetli bir bağlantı bulunmuştur (Berndtson ve ark., 1987). Sertoli hücreleri, basal kısım, ana gövde, lateral hücre uzantıları ve apikal hücre yüzeyi olmak üzere 4 ayrı bölümde incelenebilir. Sertoli hücreleri, spermatojenik

hücreler için besleyici, koruyucu ve destekleyici fonksiyonlara sahiptirler. Buna ilaveten, dejenere olan spermatojenik hücreleri ve seminifer tubullerin lumenine salıverdikleri spermatidlerin atık vücut parçalarını fagosite ederler. Sertoli hücreleri, germ hücreleri üzerinde FSH ve testosteron hormonlarının etkisine aracılık ederler, spermatojenik olayların senkronizasyonunu sağlarlar, androjen bağlayıcı proteini (ABP) transferin ile inhibin gibi intratubular sıvı içeriklerini sentezlerler. Son 10 yılda yapılan çalışmalar sonucunda Sertoli hücrelerinin, Sertoli-germ hücre etkileşimlerinin moleküler temelini oluşturan çok sayıdaki proteini sentezleyip salgıladıkları anlaşılmıştır. Bununla birlikte, Sertoli hücrelerinin arasında ve apikallerinde spermatozoon farklılaşması ve gelişiminin farklı evrelerinde olan çeşitli spermatojenik hücreler bulunmaktadır (Kierszenbaum 2006; Wrobel 1988).

Testisin intersitisyel dokusu (intertubuler doku), seminifer tubullerin arasını doldurur ve bu yapılar testis paransimi ile sinir telleri, kan ve lenf damarlarını da içerir (Kierszenbaum 2006). Erişkin testislerin intersitisyel dokusunun ana hücreleri Leydig hücreleri olmakla birlikte, bu alanlarda fibroblastlar, makrofajlar, lenfositler, plazma hücreleri, dentritik hücreler, mast hücreleri ve farklılaşmamış mezenşimal orijinli hücreler olmak üzere farklı hücrelerde bulunduğu bilinmektedir (Fijak ve Meinhardt 2006; Schuppe ve Meinhardt 2005). İntertubuler doku organizasyonunda, türe spesifik bazı farklılıklar belirlenmiştir. Buna göre 3 farklı intertubuler doku yapısı ortaya konulmuştur. Birinci grupta (kobay, şinşilla, rat ve fare) Leydig hücreleri testiküler yapının küçük bir kısmını oluştururlar ve kan damarlarına yakın olarak paketlenmiş yığınlar şeklindedirler. Bununla birlikte intersitisyumun çok büyük bir bölümü yaygın lenfatik sinuzoidlerden oluşur. Büyük memelilerin bir çoğunu içerisine alan ikinci grupta (boğa, koç, fil, maymun ve insan) çok farklı intersitisyel organizasyon bulunmaktadır. Bu türlerde Leydig hücreleri, kan damarları ile belirgin bir birliktelik içerisinde değildir ve intertubuler alanlarda merkezi veya ekzantrik olarak yerleşim gösteren lenf damarları tarafından drene edilen bir ödematöz gevşek bağ doku içerisinde dağılım

gösteren değişik boyutlardaki hücre yığınları tarzındadır. Üçüncü grupta (domuz, zebra ve kör sıçan) ise sıkıca paketlenmiş Leydig hücreleri geniş intertubuler alanlarda dağılım gösterirler ve testiküler yapının %20-60'ını oluştururlar. Bu türlerde çok az intersitisyel bağ dokusu bulunmaktadır ve küçük lenfatik damarlara daha az sıklıkta rastlanır (Abd-Elmaksud 2006; Fawcett ve ark., 1973).

Leydig hücreleri, ekzantrik olarak yerleşimli yuvarlak çekirdeği olan kısmen büyük polimorf şekilli hücrelerdir. Bu hücreler tüm testiküler dokunun koçlarda yaklaşık %1'ni, boğalarda %5'ini ve domuzlarda %20-30'unu oluştururlar. Leydig hücreleri, en önemli androjen kaynaklarıdır (Wrobel 1998). Organizmadaki tüm androjenlerin %90'nından fazlası testisler tarafından üretilir. Testestoronun ana fonksiyonları, Wolf kanalanın oluşturulması ve bu kanalın daha sonra diğer kanallara ve epididimise farklılaşması, penis, erkek eklenti bezleri ve sekonder cinsiyet fonksiyonların gelişiminin başlatılması ve sürdürülmesi, libidonun arttırılması, FSH hormonu ile birlikte spermatogenezisin kontrolü, negatif feedback mekanizması ile hipofiz ve hipotalamus üzerinde etki oluşturması ve genel anabolik etkiler olarak bilinir (Gondos ve ark 1976; Gondos ve ark 1977; Kierszenbaum 2006; Wrobel 1998).

Hücre iskeleti (sitoskeleton), mikrofilamanlar (aktinler, 6-7 nm), intermediyer filamanlar (sitokeratinler, vimentin, desmin, 8-10 nm) ve mikrotübüluslardan (tübülinler, 25 nm) oluşan protein tabiatında aktif sitosolik bir oluşumdur (Herrmann ve ark., 2007). Sitoskeletonu oluşturan bu proteinlerin hücre yapısı ve fonksiyoları üzerindeki görevleri; hücreye şekil verme, kutuplaşma, organellerin konumlandırılması, sitoplazmik uzantıların desteklenmesi ve organellerin hücre membranına bağlanması olarak açıklanmaktadır (Herrmann ve ark., 2009).

Aktin kalp kası aktini, iskelet kası aktini, düz kas aktini ve yapısal F-aktin olmak üzere 4 izoforma sahiptir (Paranko ve Pelliniemi 1992; Wrobel ve ark., 1995). İntermediyer filamanlar, hücrenin kökenine bağlı olarak farklı hücrelerde yerleşim gösteren yapılardır (Herrmann ve ark., 2007; Herrmann ve ark., 2009). İntermediyer filamanlar sitokeratinler

(epitel hücreleri), vimentin (mezenşimal hücreler), desmin (kas hücreleri), nörofilamentler (sinir hücreleri) ve gliyal fibriler asidik proteinler (gliya hücreleri) olmak üzere beş alt gruba ayrılmaktadır (Ivaska ve ark., 2007). Mikrotübüluslar ise içi boş borucuklar olup, α ve β tubülin olmak üzere iki alt ünitelerden oluşmaktadır (Herrmann ve ark., 2007; Herrmann ve ark., 2009).

Testiste Sertoli hücreleri, germ hücrelerini destekleyerek seminifer tubüllerin yapısına katılmaktadır (Davidoff ve ark., 1990; Franke ve ark., 2004; Maymon ve ark., 2000; Maymon ve ark., 2002; Verhoeven ve ark., 2000). Sertoli hücreleri, bu fonksiyonu gerçekleştirebilmek için iyi gelişmiş bir hücre iskeletine sahiptirler (Franke ve ark., 1979; Kopecky ve ark., 2005). Puberti döneminde, Sertoli hücreleri hücre iskeletinde değişikliklere neden olan bir dönüşüm geçirirler (Franke ve ark., 2004). Hücre iskeleti üzerindeki bu değişiklikler özellikle FSH hormonunun etkisi altında olmaktadır (Sasaki ve ark., 1998). Sertoli hücrelerinde dominant intermediyer filaman, özellikle çekirdek etrafında lokalize olan ve hücreye yapısal bir destek sağlayan vimentindir (Aumüller ve ark., 1988; Danahey ve ark., 1995; Franke ve ark., 1979). Sitokeratinler, fetal ve pubertiden önceki dönemlerde Sertoli hücrelerinde vimentinle birlikte bulunurken puberti ile birlikte ortadan kalkarlar (Aumüller ve ark., 1992; De Miguel ve ark., 1997; Kasper ve Stoisek 1989; Miettinen ve ark., 1985; Rogatsch ve ark., 1996). α -SMA düz kas hücrelerinin farklılaşma durumlarını ortaya koyan spesifik bir belirleyicidir (Arenas ve ark., 1997; Devkato ve ark., 2006). α -SMA ekspresyonu seminifer tubülleri çevreleyen myoid hücrelerde ve rete testis, duktuli eferentis ve duktus epididimis epitelleri altında uzanan myofibroblastlarda bulunmaktadır (Devkato ve ark., 2004a; Devkato ve ark., 2006b, Holt ve ark., 2004; Maekawa ve ark., 1995; Schlatt ve ark., 1993). Myoid hücreler tubüllerin peristaltik hareketinden sorumlu kontraktıl elementlerdir ve spermatazonlar ile testiküler sıvının rete testis ve epididimise taşınmasında rol oynarlar (Maekawa ve ark., 1996; Maretta ve Marethova 2004; Schlatt ve ark., 1993). Desmin, hem çizgili hem de düz kaslarda bulunan

bir intermediyer filaman olup testis ve epididimiste α -SMA ile aynı hücresel fonksiyonlara sahiptir (Arenas ve ark., 1997; Rogatsch ve ark., 1996; Virtanen ve ark., 1986).

Hücre iskeletinin yapısına giren proteinlerinin varlığı ve dağılımıyla ilgili olarak insan (Arenas ve ark., 1997; Aumüller ve ark., 1988; Davidoff ve ark., 1990; De Miguel ve ark., 1997; Dinges ve ark., 1991; Miettinen ve ark., 1985; Palacios ve ark., 1993; Regadera ve ark., 1993), sıçan (Danahey ve ark., 1995; Kopecky ve ark., 2005; Paranko ve Pelliniemi 1992; Sasaki ve ark., 1998; Verhoeven ve ark., 2000; Virtanen ve ark., 1986; Zhu ve ark., 1997) boğa (Devkato ve ark., 2006a, Devkato ve ark., 2006b; Steger ve ark., 1994; Wrobel ve ark., 1995), koç (Steger ve Wrobel 1994; Steger ve ark., 1994), köpek (Wauki ve ark., 1994), maymun (Schlatt ve ark., 1993), domuz (Virtanen ve ark., 1986), ayı (Komatsu ve ark., 1998), lama (Rodriguez ve ark., 1999) ve kanatlı (Aire ve Ozegebe 2008; Holt ve ark., 2004; Maretta ve Marettova 2004) testis ve epididimisleriyle yapılmış çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Bununla birlikte, yapılan literatür taramalarında tavşanların testis ve epididimislerinde sitoskelatal proteinlerin varlığı ve lokalizasyonlarıyla ilgili herhangi bir araştırmaya rastlanılmamıştır.

Laminin, bazal laminanın yapısına giren önemli glikoproteinlerdendir. Bugüne kadar, 12 farklı laminin izoformu belirlenmiştir. Lamininin hücre adezyonu, gelişim, morfoloji, farklılaşma ve migrasyon gibi önemli biyolojik aktivitelere sahip bir moleküldür. İnsan ve çeşitli hayvan türlerinin testislerinde seminifer tubüllerin bazal laminasında laminin varlığını bildirilmektedir (Kleinman ve ark., 1985).

Vasküler endotelial growth faktör (VEGF, VEGF-A, VPF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ve plasenta benzeri growth faktör (PLGF) gibi heparin bağlayıcı growth faktörler ailesinin bir üyesidir (Veikkola ve Alitalo 1999; Tjwa ve ark., 2003). VEGF, 40 kDa ağırlığında homodimerik bir glikoproteindir. VEGF, yapısında bulunduğu organın hem gelişim safhasına hem de fizyolojik fonksiyonuna bağlı bir kaç önemli biyolojik aktiviteye sahip

multifonksiyonel bir moleküldür (Bates ve ark., 2002; Breen 2007; Mahajar ve D'Amore 2007). VEGF, ilk olarak karsinoma hücre hatları tarafından sentezlenen bir permabilite faktörü olarak keşfedilirken tümörlerde karında su toplanmasını arttırdığı tespit edilmiştir. Bu nedenle ilk olarak vasküler permabilite faktörü (VPF) olarak isimlendirilmiştir (Senger ve ark., 1983). Bundan kısa bir süre sonra, endotelial hücrelerinin proliferasyonunu, migrasyonunu ve hücre canlılığının düzenlenmesinde rol oynayan anjiyogenik bir faktör olarak izole edildi (Leung ve ark., 1989). VEGF, bir hücre spesifik mitojen ve bir anjiyogenik indükleyicidir. Bununla birlikte, VEGF anjiyogenezisin düzenlenmesinde, köken hücrelerden monosit/makrofaj yapımı ve böbrek ve akciğer bariyer fonksiyonlarının devam ettirilmesi ve nöyral korunmada da önemlidir. Endotelial hücrelerinin proliferasyonunu, migrasyonunu ve hücre canlılığının düzenlenmesi fonksiyonlarına ilaveten, VEGF reseptörleri de bir çok non-epitelial hücrede lokalize olarak hücre canlılığı ve fonksiyonun düzenlenmesi otokrin yollar boyunca hareket ederler (Breen 2007). VEGF'in gelişimsel, fizyolojik ve patolojik anjigenezisteki önemi çok sayıdaki araştırmayla gösterilmiştir. Bununla birlikte VEGF'in erişkin dokularındaki fonksiyonları henüz tam olarak açıklık kazanmamıştır (Mahajar ve D'Amore 2007). VEGF embriyolojik dokularda yaygın bir şekilde bulunurken, erişkin dokularda varlığının da önemli olduğu düşünülmektedir. Dişi genital siklusu sırasında uterus, ovaryum ve memelerde fizyolojik anjiyogeneziste (Fraser 2006), yara iyileşmesinde (Eming ve Krieg 2006) kemik onarımında (Street ve ark., 2002) ve ekzersize karşı iskelet kası yanıtında (Mac Gabhann ve ark., 2007) rol oynadığı bilinmektedir. VEGF erişkinlerin hemen hemen tüm dokularında bulunmaktadır. VEGF'ün erişkin dokularındaki ekspresyonu ile ilgili olarak 3 genel ekspresyon örneği bulunmaktadır. VEGF'ün zayıf olarak eksprese edildiği hücrelerin bulunduğu bölgelerde, VEGF başlıca perisitler ve vasküler stromal hücreler tarafından eksprese edilir. Retina, beyin ve testis gibi dokularda damar sistemi bir bariyer fonksiyonuna (retina-kan bariyeri, beyin-kan bariyeri, testis-kan bariyeri) sahip olmasıyla

karakterizedir. İlginç olarak bu dokularda, çok az hücre VEGF eksprese etmektedir. Az miktarda VEGF eksprese edilen bu organlarda, VEGF muhtemelen bu organlardaki damarlarda impermeabilite fonksiyonuna katılmaktadır. VEGF faktörün orta derece eksprese edildiği kalp kası ve iskelet kası gibi dokularda, çoğu myositin VEGF eksprese ettiği görülmektedir. Bu dokular fizyolojik olarak dinamik yapıda oldukları ve ekzersizle hipertrofiye sahip olmaları nedeniyle, VEGF kasların fizyolojik gereksinimine göre bağlı olarak kasların zengin damar yapısının destekleme fonksiyonuna sahiptir (Milkiewicz ve Haas 2005). En yüksek yoğunluktaki VEGF ekspresyonun görüldüğü dokular pencereci damar yapısının bulunduğı dokulardır. Bunlar özellikle pencereci damarlarla temas halinde olan epitelde lokalize olmuşlardır. Mikrodamarları pencereci olan dokular sekretorik ve/veya filtrasyon fonksiyonuna sahiptir. Buna en iyi örnek, glomerulus (idrar süzülmesi), koroid pleksus (serebrospinal sıvının üretilmesi), pankreas (ekzokrin ve endokrin sekresyon) ve karaciğer (filtrasyon ve sekresyon) dir. Bu nedenle bu dokularda VEGF endotel hücrelerinin pencereci konumunun sürdürülmesinde ve canlılığının her ikisinde de rol oynayabilir (Maharaj ve D'Amore 2007). Her ne kadar endotel hücreleri VEGF'ün ana hedefi olsalar da, bu hücreler genellikle VEGF'ü eksprese etmezler. Bunun yerine, sentezlenmiş VEGF'e parakrin tarzda yanıt verirler (Couffinhal ve ark., 1997).

VEGF reseptörleri VEGFR-1, VEGFR-2 ve VEGFR-3 olup bunlar platelet kökenli gelişim faktörleri (PDGF) reseptör alt ailesinin tirozin kinaz sınıf III reseptör ailesine bağlıdır. Erişkin dokularında, VEGFR-1 ve VEGFR-2 vasküler endoteliyal hücrelerde, VEGFR-3 ise başlıca lenfatik endotelyumda lokalize olur (Veikkola ve Alitalo 1999; Petrova ve ark., 1999). Her ne kadar, VEGF VEGFR1, VEGFR2, Nrp-1 ve Nrp-2 reseptörlerine bağlanırsa da, onun endoteldeki ana sinyal iletim reseptörü VEGFR2 dir. VEGFR2, tirozin kinazlar reseptör ailesine bağlıdır (Olsson ve ark., 2006). VEGF veya onun reseptörlerinin inhibisyonu neticesinde dokuların çoğunda damar gerilemesi gibi mikrovasküler değişiklikler

gözlenmiştir. VEGF'ün nötralizasyonu sonucunda böbrekte glomerular endoteliozis ve proteinuri (Eremina ve ark., 2003), akciğerlerde ise alveolar apoptozis ve hava keselerinde genişleme (Tuder at al., 2003) gözlenmiştir. Ayrıca pankreasta, trakeyada, tiroidte ve ince bağırsaklarda damar gerilemesi gözlenmiştir. Bu deneylerde gözlenen kan damarı gerilemesi ve doku disfonksiyonu muhtemelen VEGF'ün endotelial canlılık üzerindeki trofik etkilerinin ortadan kaldırılması sonucu oluşmuştur (Baffert ve ark., 2006). VEGF endotel hücreleri dışındaki diğer hücreler üzerinde ya VEGFR1 ya da VEGFR2 reseptörlerinin bulunmasıyla etki gösterir. Bununla birlikte, VEGF'ün monositler, makrofajlar, mast hücreleri, eozinofiller, dentritik hücreler, makakaryositler, lenfositler, hematopoetik kök hücreleri, tip II alveol hücreleri ve lens epitelyum hücreleri üzerinde etkiye sahip oldukları gösterilmiştir (Maharaj ve D'Amore 2007). VEGF'ün vasküler ve immün sistem hücreleri üzerindeki etkileri yanında, nöyronal gelişim ve canlılık üzerinde de etkileri olduğu ortaya konulmuştur (Kilic ve ark., 2006). Permeabilite, glomerular infiltrasyon, serebrospinal sıvı üretimi, karaciğer kan filtrasyonu ve kan akımına hormon sekresyonu gibi bir çok fizyolojik olayda önemlidir (Esser ve ark., 1998). Ayrıca yara iyileşmesinde (Eming ve Krieg 2006) ve ödem oluşmasına neden olarak tümörlerin daha kötüleşmesinde de rolleri vardır. Endotel hücre permeabilitesi VEGFR1 ve VEGFR2 reseptörlerinin her ikisi aracılığıyla olmaktadır. Bu da, transsellüler ceplerin oluşması, vezikulovakuoler organel şekillenmesi ve fenestrasyonların şekillenmesiyle sonuçlanır. Pencereci endotelial hücreler böbrek glomerulusları, gözün koroid katmanında, koroid pleksusta, gastrointestinal kanalda, tümör damarlarında ve çoğu endokrin dokularda bulunur (Maharaj ve ark., 2006). Bu dokuların her birisinde VEGF içeren hücreler altındaki pencereci mikrodamarlara yakın bitişik konumda bulunurlar (Maharaj ve ark., 2006).

İnsan koryonik gonadotrophin (hCG), LH ve FSH gibi gonadotropinler hem erkeklerde hem de dişilerde üreme fonksiyonlarını düzenledikleri bilinen hormonlardır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar bu hormonların üreme sistemi organlarının vasküler sistemini

düzenlediklerini göstermektedir. Gonadotropinlerin sadece VEGF ve onun reseptörleri VEGFR-1 ve VEGFR-2 değil aynı zamanda antijopoetin ve reseptörü Tie-2, temel fibroblast gelişim faktör ve plasenta kökenli gelişim faktör gibi eksprese edilen diğere anjiojenik faktörleri de düzenledikleri gösterilmiştir. Son bir çalışma, gonadotropinlerin endotel hücreleri üzerinde direk etkilerinin olgunu göstermiştir. Bu nedenle, gonadotropinler dişi genital sistemde gebeliğin erken dönemlerinde ve meastural siklus sırasında ve erkeklerde testislerde bir optimal vasküler destek sağlayan doku spesifik anjiojenik faktörler olarak hareket ederler. Patolojik durumlarda (ör; preeklamsiya vb.) da gonadotropinler ve anjiojenik faktörler arasındaki sıkıca bir şekilde düzenlenmiş etkileşimler bozulur (Reisinger ve ark., 2007). Testiküler damarlar birkaç yönden kendine has özelliklere sahiptir. Testisteki pencereci olmayan endotel hücreleri diğeri organlarla karşılaştırıldıklarında en az 10 kat yüksek proliferasyon hızına sahiptirler (Collin ve Bergh 1996). Bu hız Leydig hücrelerinin hCG ile stimülasyonu sonucunda daha da fazla artırılabilir (Collin ve Bergh 1996). Buna ilaveten, sıçan testislerinde hCG testiküler kan akımını etkiledi (Setchell ve Sharpe 1981; Geesaman ve ark., 1992) ve vasküler permabilitiyi arttırdı (Bergh ve ark., 1993). Ovaryumlara benzer şekilde, insan ve rodentlerin testistiküler kan damarlarında VEGFR-1 ve VEGFR-2 ekspresyonu gösterilmiştir (Ergun ve ark., 1997). hCG'nin derialtı enjeksiyonuyla, rat testislerinde VEGF ve reseptörleri VEGFR-1 ve VEGFR-2 mRNA'larında artış görülmüştür (Rudolfson ve ark., 2004). Ayrıca, hCG değıştirilmiş fare Leydig hücre hatlarında (MA-10 cells) VEGF ekspresyonunun indükledi (Schwarzenbach ve ark., 2004). Bununla birlikte, anjiopoietin ailesinin ekspresyonu hCG tarafından düzenlenir. Ang-2, stimüle edilmemiş sıçan testislerinde intratestiküler kan damarlarının luminal sınırında lokalize olur (Rudolfson ve ark., 2004). hCG ile stimülasyon tüm kan damarlarındaki Ang-2 boyanmasında artışa neden olur.

İnsan ve bazı hayvan testislerinde Sertoli ve Leydig hücreleri ile vasküler yapılarda VEGF'in varlığı bildirilmiştir. Sertoli hücrelerinde bulunan VEGF'in spermatogenezis ve spermiyogeneziste önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Ergun ve ark., 1997; Nalbandian ve ark., 2003).

İsmi ni yüzde yüz doymuş amonyum sülfat solüsyonunda eriyebilme özelliğinden alan S100 (soluble in 100% saturated solution of ammonium sulphate), farklı dokularda dağılım gösteren asidik tip EF-el yapısına sahip bir kalsiyum bağlayıcı proteinlerdir (Donato 1999; Donato 2001; Donato 2003; Heizmann ve Cox 1998; Heizmann ve ark., 2002). S100 proteinleri, hücre içi kalsiyum metabolizmasında önemli rolleri olan ve etkisini vimentin, desmin, tubulin, p53 gibi farklı hedef proteinlerle etkileşime girerek gösteren moleküllerdir (Heizmann ve ark., 2002, McNutt 1998; Moore 1965; Zimmer ve ark., 1995; Zimmer ve ark., 2003). S100 proteini ilk olarak beyinde gliya hücrelerinde ve periferik sinir dokuda Schwann hücrelerinde tespit edilmiştir (Moore 1965). S100 proteinleri, bu özellikleri nedeniyle uzun yıllar sinir sistemine ait moleküller olarak düşünülmüştür (Bock 1978). Ancak, daha sonra yapılan immunohistokimyasal ve biyokimyasal çalışmalar bu proteinlerin sinir dokusu dışında özellikle testis gibi bazı organlarda da bulunabilirliğini göstermiştir (Girod ve ark., 1986; Haimato ve ark., 1987; Michetti ve ark., 1985; Sugimura ve ark., 1989). Günümüzde, insanlarda farklı dokularda lokalize olan yirmi beş farklı S100 proteininin varlığı bildirilmiştir (Marenholz ve ark., 2006; Santamaria-Kisiel ve ark., 2006).

Aminoasit dizilimleri farklı alfa (S100 α) ve beta (S100 β) alt ünitelerinin birleşmesiyle oluşan dimerik formdaki S100 proteini, farklı hedef proteinlerle etkileşime girerek protein fosforilasyonu, hücre büyüme ve çoğalması, farklılaşma, hücre iskeleti hareketi, enzim aktivitesi, apoptozis, sekresyon, immun yanıt ve Ca²⁺ homeostazisi gibi farklı hücre fonksiyonlarında önemli görev alır (Donato 1999; Donato 2001; Donato 2003; Heizmann ve ark., 2002; Zimmer ve ark., 1995).

S100 proteinlerinin, insan (Haimato ve ark., 1987; Michetti ve ark., 1985) ve maymun (Girod ve ark., 1986), kedi (Amselgruber ve ark., 1994; Cruzana ve ark., 2000), köpek (Amselgruber ve ark., 1994), boğa (Amselgruber ve ark., 1992; Amselgruber ve ark., 1994), koç (2 Amselgruber ve ark., 1994), bizon (Czykier ve ark., 1999), manda (Cruzana ve ark., 2003), domuz (Amselgruber ve ark., 1994), at (Amselgruber ve ark., 1994), sıçan (Amselgruber ve ark., 1994; Michetti ve ark., 1985), fare (Czykier ve ark., 2000; Ortega ve ark., 2004), ördek (Sugimura ve ark., 1989), gerbil, kobay ve hamster (Ortega ve ark., 2004) gibi çeşitli hayvanların testislerindeki farklı hücrelerdeki immunohistokimyasal lokalizasyonu üzerinde araştırmalar bulunmaktadır. Yapılan taramalarda, tavşan testis ve epididimisinde S100 proteinin varlığına ve hücresel lokalizasyonuna dair herhangi bir kaynağa rastlanılmamıştır.

Testisin, germ hücrelerinin üretilmesi ve cinsiyet hormonlarının yapılması olmak üzere iki ana fonksiyonu vardır. Pubertaya erişmiş erkek bireyde, germ hücreleri mayoz bölünme geçirerek çeşitli gelişim aşamaları sonucunda ileri derecede özelleşmiş spermatozoanları şekillendirirler (Borg 2009). Germ hücrelerinin gelişimi ve farklılaşması sırasında, çok sayıda hücre içi ve yüzeyine ait proteinler ortaya çıkarken, oluşan bu otoantijenlere karşı bir immunolojik yanıt oluşmaksızın tolerans şekillenir (Fijak ve Meinhardt 2006; Filippini ve ark., 2001; Schuppe ve Meinhardt 2005). Germ hücrelerine karşı tolerans oluşturulmasında Sertoli hücreleri ve peritübüler hücreler tarafından oluşturulan kan-testis bariyerinin yanı sıra makrofajların da önemli fonksiyonları bulunmaktadır (Cohen ve ark., 1999; Gaytan ve ark., 1995; Hedger 2002; Hutson 1990; Yee ve Hutson 1983).

Erişkin testislerinde, makrofajlar Leydig hücreleri gibi intersitisyel dokunun önemli hücrelerindendir (Hutson 1994; Niemi ve ark., 1986; Yee ve Hutson 1983). Testiküler makrofajlar, diğer organların bağ dokularında yerleşim gösteren makrofajların genel özelliklerini içermekle birlikte, testise spesifik fonksiyonlara da sahiptirler (Bryniarski ve ark., 2004; Cohen ve ark., 1999; Schuppe ve ark., 2005). Makrofajlar, özellikle Leydig hücreleri ile

morfolojik ve fonksiyonel açıdan yakın ilişki içerisinde oldukları (Hutson 1992; Hutson 2006). Bu hücreler, Leydig hücre gelişimi ve erişkinlerde steroidogenesizin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadırlar (Hales 2002; Zirkin ve Chen 2000). Testiküler makrofajların sayısı, seminifer tubüllerin etkisinden ziyade direkt olarak Leydig hücre aracılı mekanizmalarla düzenlenmektedir (Gaytan ve ark., 1994; Gaytan ve ark., 1995; Hutson 1990). Bununla birlikte, testiküler makrofajlar salgıladıkları bazı mediyatörler yardımıyla Sertoli hücre fonksiyonu ve spermatogenezis üzerinde de etkili olmaktadır (Hedger ve Meinhardt 2003; Kern ve ark., 1995; Schuppe ve Meinhardt 2005).

Testise ilaveten epididimislerin interstisyel dokusunda ve duktus epididimis epitellerinde de intraepitelyal makrofajların varlığı bildirilmiştir. Özellikle tubül epitelinde yerleşen intraepitelyal makrofajların prensipal hücreler tarafından oluşturulan kan-epididimis bariyerine katkı yaptığı düşünülmektedir (Filippini ve ark., 2001; Frenette ve ark., 2005; Kazeem 1988, Marchlewicz 2001; Nashan ve ark., 1989).

RAM11, tavşan alveolar makrofajlara karşı farelerin immunizasyonu ile elde edilen bir monoklonal IgG1 antikoru olup, tavşan dokularının bağ dokularında yerleşim gösteren makrofajların immunohistokimyasal lokalizasyonunun belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır (Lis ve ark., 2001). CD68 monosit ve makrofajların sitoplazmasında bulunan bir glikoprotein olup dokularda yerleşim gösteren makrofajların belirlenmesinde kullanılmaktadır (Rival ve ark., 2008). Özellikle insan, fare ve sıçan testislerinde lokalize olan makrofajların yapısı ve fonksiyonlarıyla ilgili çok sayıda araştırma bulunmaktadır (Bryniarski ve ark., 2004; Bryniarski ve ark., 2004; Giannessi ve ark., 2005; Meinhardt ve ark., 1998; Pöllänen ve Maddocks 1988). Buna karşın, yapılan literatür taramalarında tavşan testis ve epididimisinde makrofajların varlığı ve lokalizasyonu ile ilgili herhangi bir araştırmaya rastlanılmamıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmanın materyalini, 15 adet sağlıklı, erkek, Yeni Zellanda tavşanından temin edilen 30 adet testis ve epididimisler oluşturdu. Kas içi sodyum pentobarbital uygulaması ile ötanazi edilen tavşanların testisleri çıkarılarak, epididimisin tam ortasından geçecek şekilde uzunlamasına bir ensizyonla iki eşit parçaya ayrıldı. Bouine tespit solüsyonuyla 12 saat süreyle tespitten sonra dokular sırasıyla dereceli alkoller, metil benzoat ve benzol serilerinden geçirilerek parafinde bloklandı.

Parafin bloklardan Poly-Lysinli lamlara 5 µm kalınlığında alınan kesitlere, vimentin, sitokeratin, α-SMA, desmin, S100, CD68 ve RAM11'in testis ve epididimisteki lokalizasyonunun belirlenmesi amacıyla strept-ABC immunohistokimyasal boyama yöntemi uygulandı. Kesitler, endojen peroksidazın inaktivasyonu amacıyla metanolde hazırlanan %3'lük hidrojen peroksitte 20 dakika süreyle tutuldu. Ardından, vimentin (sitrat buffer), sitokeratin (tripsin), S100 (sitrat buffer) ve CD68 (proteaz) antikorları için antijen retrieval işlemi yapılırken, α-SMA, desmin ve RAM11 primer antikorları için herhangi bir işlem uygulanmadı. Daha sonra, kesitler non-spesifik bağlanmaları engellemek için %10'luk keçi serumu (Labvision, Ultravision kit, TM-125-HL) ile 5 dakika süreyle muamele edildi. Bu işlemten sonra, kesitler monoklonal mouse anti-vimentin (1:200, Novacastra, Kat No; NCL-L-VIM-V-9, Klon; V9), monoklonal mouse anti-sitokeratin 8/18 (1:100, Novacastra, Kat No; NCL-L-5D3, Klon; 5D3), monoklonal mouse anti-sitokeratin 5/6/18 (1:100, Novacastra, Kat No; NCL-L- LP34, Klon; LP34), monoklonal mouse anti- α-SMA (1:800, Thermo Scientific, Kat No; MS 113, Klon; 1A4) ve monoklonal mouse anti-desmin (1:100, Thermo Scientific, Kat No; MS 376, Klon; D33), monoklonal mouse anti-S100 (1:200, Thermo Scientific Kat No. MS-296-P, Klon; 4C4.9), monoklonal mouse anti-rabbit macrophages (1:200, DAKO, Kat No; M 0633, Klon; RAM11), monoklonal mouse anti-human CD68 (1:50, DAKO, Kat No; M 0718, Klon; EBM11), monoklonal mouse anti-human CD68 (1:50, Neomarkers, Kat

No; MS 397, Klon; KP1) ve monoklonal mouse anti-human CD68 (1:50, Neomarkers, Kat No; MS 1808, Klon; PG-M1) primer antikorlarıyla 1 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Ardından, kesitlere 20 dakika süreyle biotinli anti-mouse sekonder antikor (Labvision, Ultravision kit, TM-125-HL) ve 20 dakika süreyle de avidin-peroksidaz solüsyonları (Labvision, Ultravision kit, TM-125-HL) uygulandı. Bu işlemin ardından, kesitlere antijen-antikor reaksiyonun görüntülenebilmesi için 5-10 dakika süreyle 9-Amino etil karbozol (AEC) kromojeni (Labvision), ardından zemin boyaması için 2-3 dakika süreyle Gill'in hematoxileni tatbik edildi. Tüm boyama işlemleri oda ısısında bir nem kamarası (Shandon, UK) içerisinde gerçekleştirilirken, yıkamalar PBS (Phosphate buffer saline, 0.01 M, pH;7.4) ile yapıldı. Pozitif kontrol olarak, tavşanların deri ve bağırsak kesitleri kullanıldı. Negatif kontrol için primer antikorların yerine non-spesifik immun serum damlatılarak geriye kalan boyama işlemlerine normal boyamalarda olduğu gibi devam edildi.

BULGULAR

İmmunohistokimyasal boyamalarda, safha 1-5'deki seminifer tubüllerdeki Sertoli hücrelerinin sadece perinüklear sitoplazmasında (Şekil 1A), safha 6-8'deki seminifer tubüllerdeki Sertoli hücrelerin ise perinüklear sitoplazmasından apikal sitoplazmasına doğru uzanan (Şekil 1B) vimentin immunreaktivitesi olduğu dikkati çekti. Ayrıca, intertübüler alanlarda Leydig hücreleri (Şekil 1A ve B) ve damar endotelleri ile tubülus rektus ve rete testis epitellerinde (Şekil 1C) de vimentin pozitif immunreaksiyon belirlendi. Bununla birlikte, duktuli eferentis ve duktus epididimis epitellerinde boyanma tespit edilmedi.

İki farklı sitokeratin primer antikorları (sit. 8/18 ve sit. 5/6/18) için yapılan boyamalarda, testiste Sertoli hücreleri, Leydig hücreleri ve peritübüler myoid hücrelerinde negatif immunreaksiyon gözlemlendi. Epididimiste duktuli eferentis ve duktus epididimis epitellerinde sadece sitokeratin 8/18 için pozitif immunreaksiyon belirlendi (Şekil 1D ve E). Duktuli eferentis epitellerindeki silyumlu hücrelerin sitoplazmasında, duktus epididimis epitelindeki

prensipal hücrelerin ise özellikle apikal ve bazal sitoplazmalarında kuvvetli immunreaksiyon görüldü (Şekil 1E). Kaput, korpus ve kauda epididimis (Şekil 1F) boyunca duktus epididimis epitellerinde sitokeratin 8/18 için pozitif immunreaksiyon olduğu dikkati çekti.

α -SMA primer antikoru için yapılan immunboyamalarda, testiste seminifer tubülleri çevreleyen peritubüler myoid hücrelerin sitoplazmasında pozitif immunreaksiyon belirlendi (Şekil 2A). Bununla birlikte, tunika albuginea içerisindeki ve kan damarlarının duvarındaki düz kas hücrelerinin de pozitif boyandığı dikkati çekti (Şekil 2A). Rete testis ve duktuli eferentis epitelleri altında uzanan myoid hücre katmanının immunpozitif boyandığı görüldü. Ayrıca, kaput, korpus ve kauda epididimis boyunca duktus epididimis epiteli altında uzanan myofibroblastlarda da kuvvetli pozitif immunreaksiyon tespit edildi (Şekil 2B ve C).

Desmin primer antikoru için yapılan immunboyamalarda, α -SMA için yapılan boyamalara benzer sonuçlar elde edildi. Testiste, seminifer tubüllerdeki peritubüler myoid hücrelerde ve kan damarlarında (Şekil 2D), ayrıca rete testis, duktuli eferentis (Şekil 2E) ve duktus epididimis (Şekil 2F) epitelleri altında uzanan myofibroblastlarda da pozitif immunboyanma gözlemlendi.

Anti-laminin primer antikoru ile yapılan boyamalarda, seminifer tubüllerin bazal laminasında ve peritubüler myoid hücrelerle bazı Sertoli hücrelerinin sitoplazmasında pozitif immunreaksiyon gözlemlendi (Şekil 3 ve 4).

Anti-VEGF primer antikoru ile yapılan boyamalarda, seminifer tubüllerde germ hücrelerinin sitoplazmasında (Şekil 5) ve intersitisyel alanlarda Leydig hücrelerinin sitoplazmasında (Şekil 6) pozitif immunreaksiyon gözlemlendi. Bu hücrelerdeki boyanmanın granüler tarzda olduğu dikkati çekti (Şekil 5 ve 6). Bununla birlikte, testiküler kan damarlarında negatif reaksiyon gözlemlendi. Ayrıca, tubulus rektus, rete testis, duktuli efferentis ve duktus epididimis epitellerinde negatif immunreaksiyon dikkati çekti.

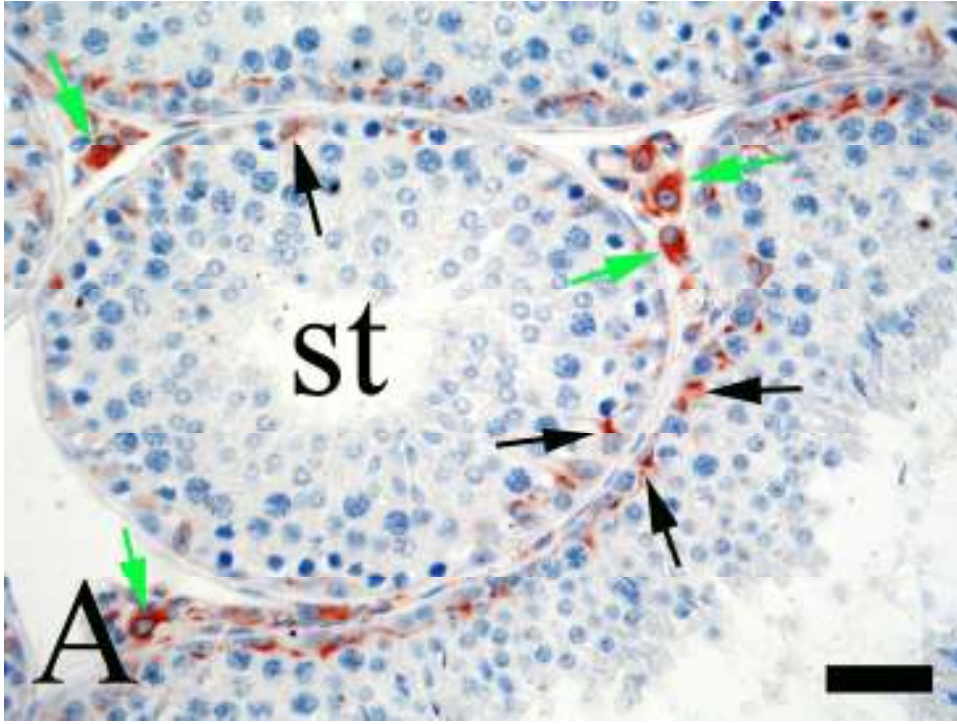
Anti-S100 primer antikoru ile yapılan boyamalarda, tavşan testislerinde seminifer tubüllerde spermatogenezisin farklı aşamalarında olan germ hücreleriyle yakın ilişkide olan ince sitoplazmik uzantıları ile karakterize Sertoli hücrelerinin hem sitoplazma ve hem de çekirdeklerinde S100 pozitif immunreaksiyonun olduğu görüldü (Şekil 7A ve B). Farklı gelişme aşamalarındaki germ hücreleri ve peritubüler hücrelerde ise immunreaksiyon gözlenmedi (Şekil 7C ve D). İntertubüler alanlarda, Leydig hücreleri, kan ve lenf damarı endotelleri ve bağ dokusu hücreleri de S100 negatif immunreaksiyon gösterdiler (Şekil 7C ve D). Bununla birlikte, seminifer tubüllerin kısa bir bölümle tubulus rektusa (düz tubüllere) bağlandığı terminal segmentteki modifiye Sertoli hücrelerinin ve tubulus rektus epitelindeki hücrelerin S100 pozitif (Şekil 7E ve F), rete testis (Şekil 7E), duktuli eferentes ve duktus epididimidis epitellerinin ise negatif immunreaktivite gösterdikleri saptandı.

Yapılan immunohistokimyasal boyamalar sonucunda, tavşan testisinin intersitisyel dokusunda yerleşim gösteren çok sayıdaki makrofajın sitoplazmasında RAM11 pozitif immunreaksiyon belirlendi (Şekil 8A). İntersitisyel doku içerisinde RAM11 pozitif makrofajların Leydig hücreleri (Şekil 8B), peritubüler hücreler ve kan damarları etrafında (Şekil 8C) lokalize oldukları dikkati çekti. Bazı RAM11 pozitif makrofajların ise özellikle Leydig hücre kümeleri içerisinde yerleşim gösterdiği görüldü (Şekil 8B). Bazı seminifer tubüllerin epitelinde ise çok az sayıda RAM11 pozitif makrofajlar belirlendi (Şekil 8D). Tubulus rektus ve rete testis epitellerinde ve bu bölgelerdeki intersitisyel dokuda ise RAM11 immunreaktivitesi gözlenmedi.

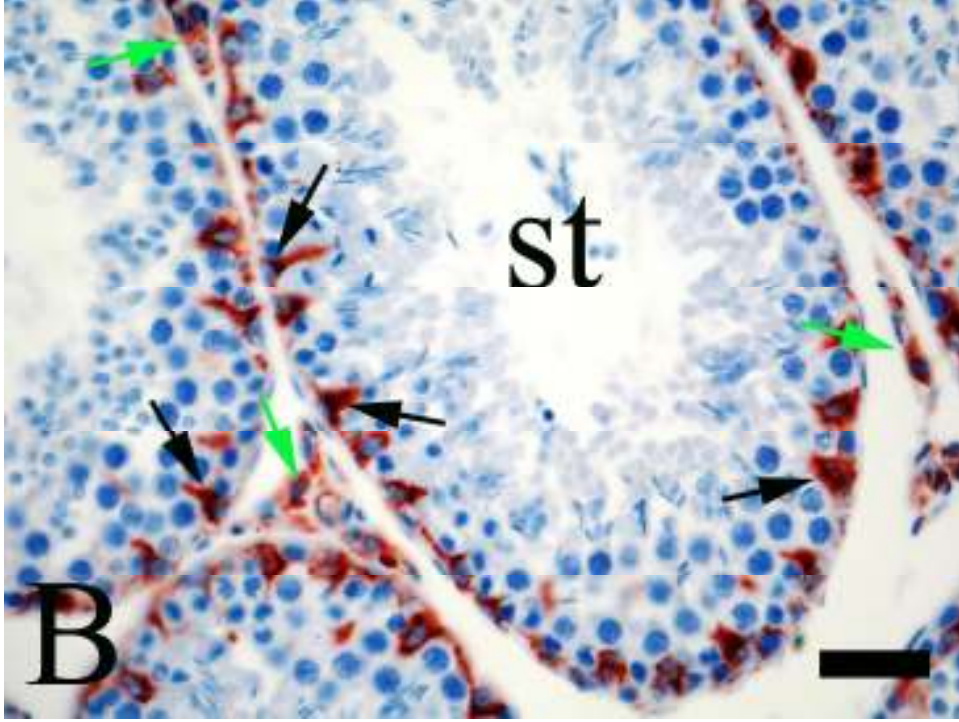
Epididimisin intersitisyel dokusunda çok sayıda RAM11 pozitif makrofajların bulunduğu dikkati çekti (Şekil 9A). Kaput, korpus ve kauda epididimiste tüm duktus epididimis kanalı boyunca epitel içerisinde intraepitelyal yerleşimli RAM11 pozitif makrofajların olduğu görüldü (Şekil 9B). Bununla birlikte, duktuli eferentis epitelinde RAM11 pozitif

immunreaksiyon olduğu dikkati çekti (Şekil 9C). Epitelde özellikle siliyalı hücrelerin sitoplazmalarında pozitif immunboyanma tespit edildi (Şekil 9D).

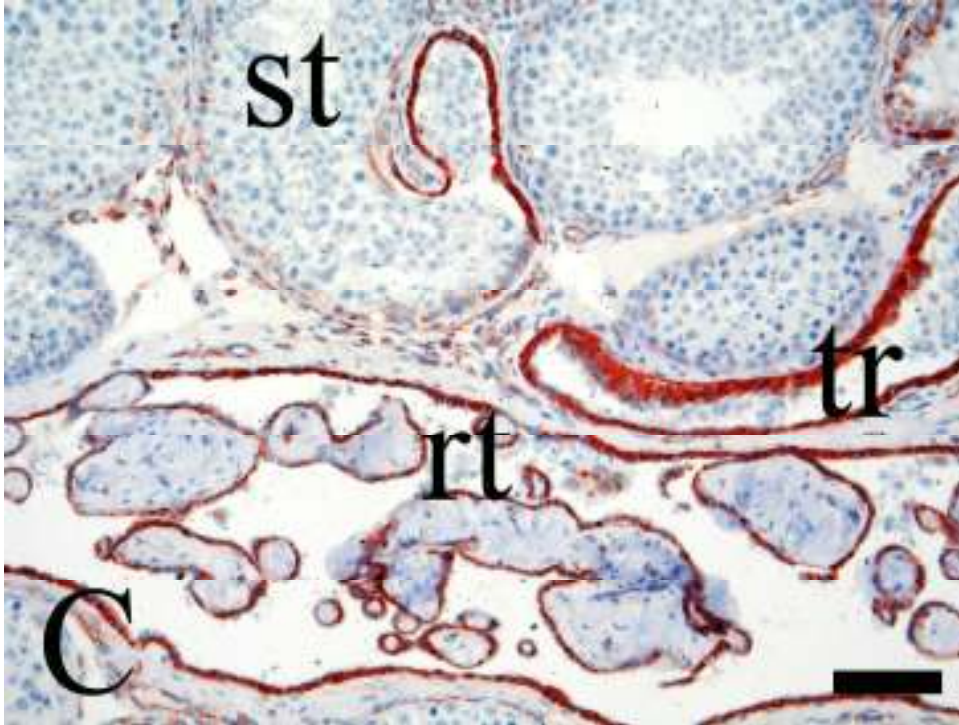
Bununla birlikte, testiste ve epididimide CD68'in her üç klonu için yapılan boyamalarda negatif immunreaksiyon belirlendi.



Şekil 1A. Safha 1'deki seminifer tubüllerde (st) Sertoli hücrelerinin perinükleer sitoplazmasında vimentin pozitif immunboyanma (siyah oklar) ve intersitisyel dokuda vimentin pozitif Leydig hücreleri (yeşil oklar), bar; 25 µm, immunperoksidaz, AEC.



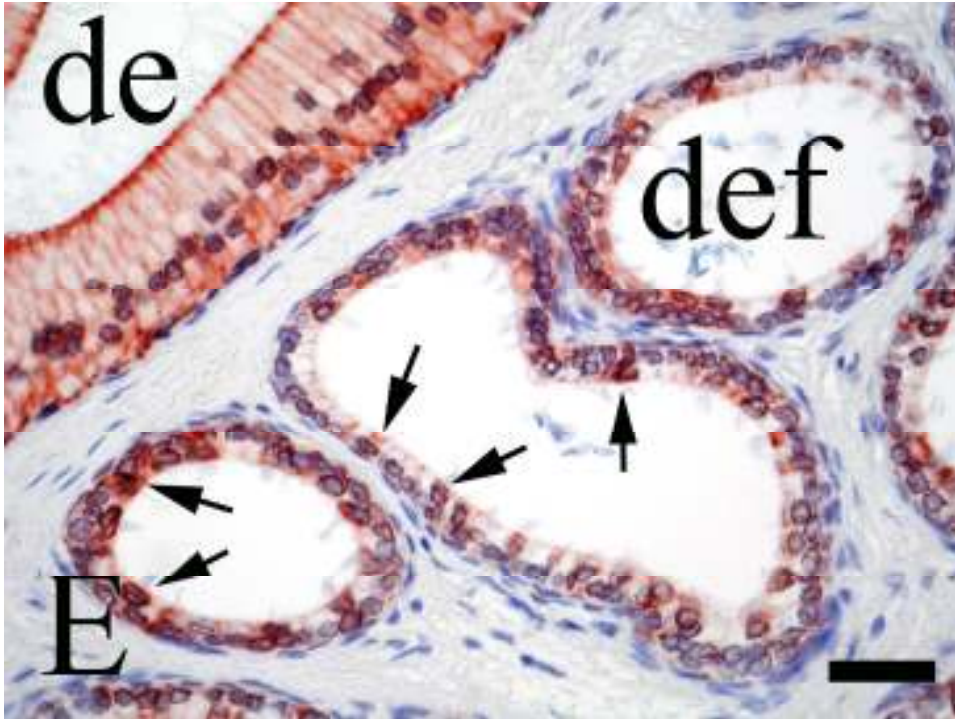
Şekil 1B. Safha 6'daki seminifer tubüllerde (st) Sertoli hücrelerinin perinüklear ve apikal sitoplazmasında vimentin pozitif immunboyanma (siyah oklar) ve intersitisyel dokuda vimentin pozitif Leydig hücreleri (yeşil oklar), bar; 25 μ m, immunperoksidaz, AEC.



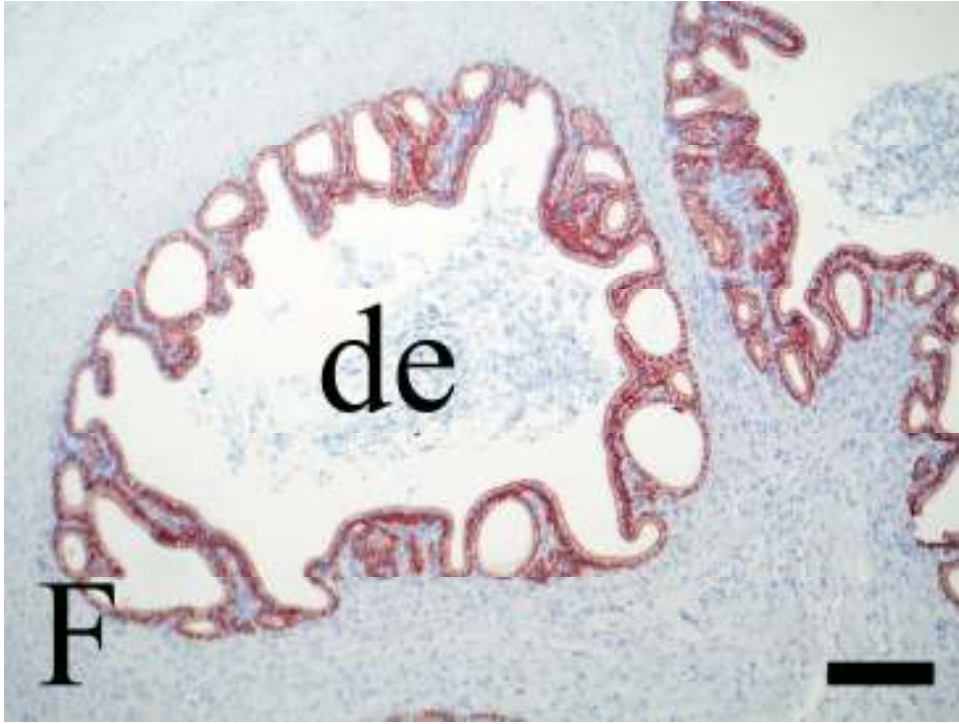
Şekil 1C. Tubülus rektus (tr) ve rete testis (rt) epitellerinde vimentin pozitif immunboyanma, st; seminifer tubüller, bar; 50 μ m, immunperoksidaz, AEC.



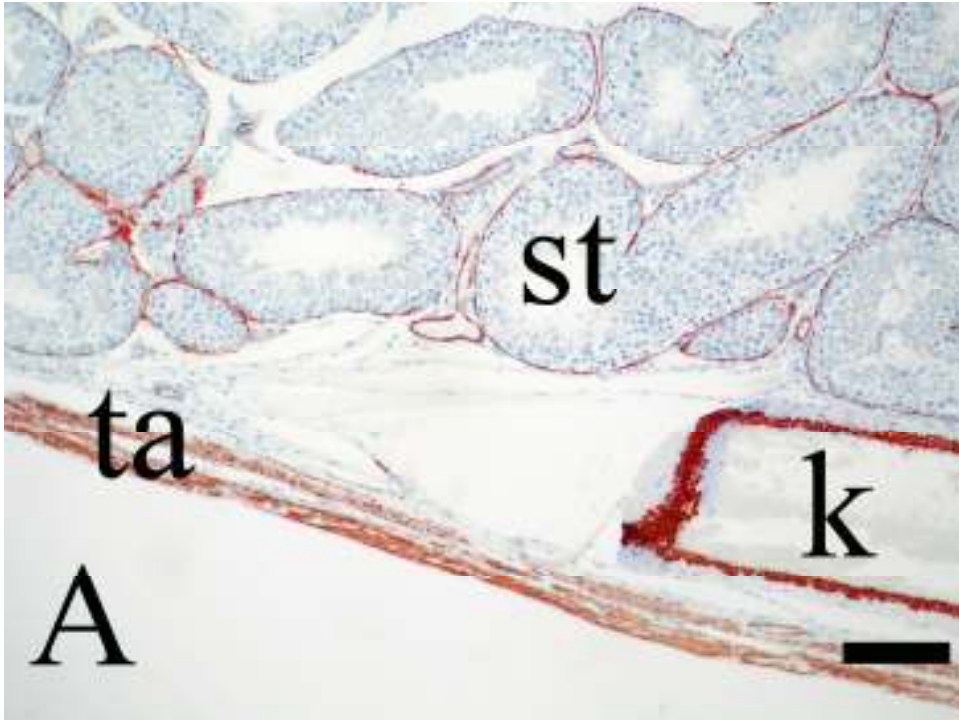
Şekil 1D. Duktuli eferentis (def) ve duktus epididimis (de) epitellerinde sitokeratin pozitif boyanma, st; negatif boyanan seminifer tubüller, bar; 100 μ m, immunperoksidaz, AEC.



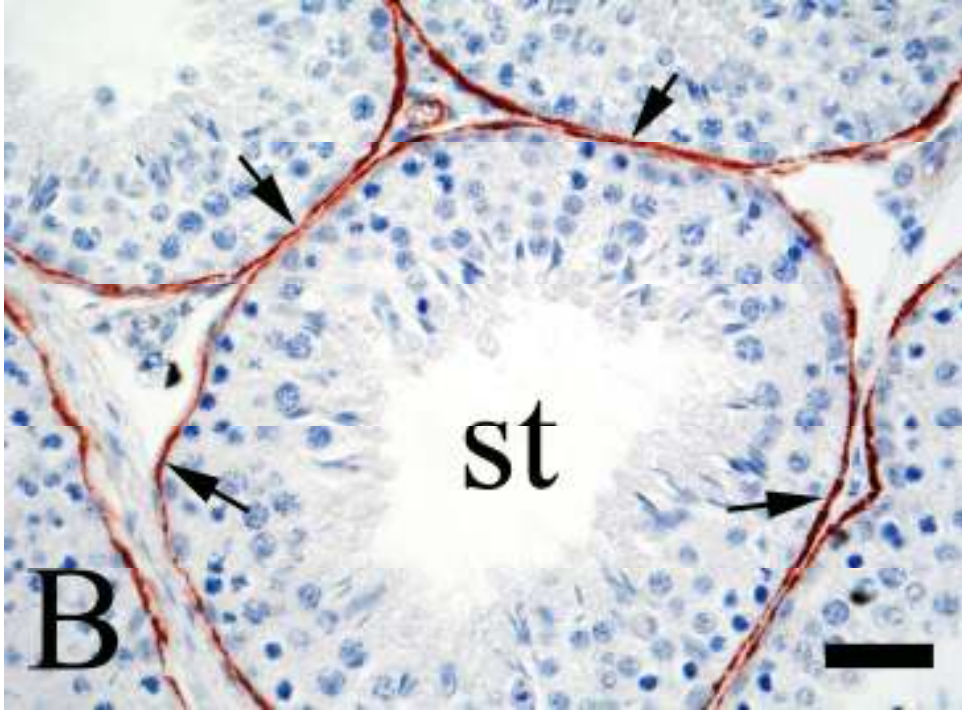
Şekil 1E. Duktuli eferentis (def) epitelinde sitokeratin pozitif silyumlu hücreler (oklar) ve duktus epididimis (de) epitellerinde özellikle hücrelerin apikal ve bazal sitoplazmasında sitokeratin pozitif boyanma, st; negatif boyanan seminifer tubüller, bar; 25 μ m, immunperoksidaz, AEC.



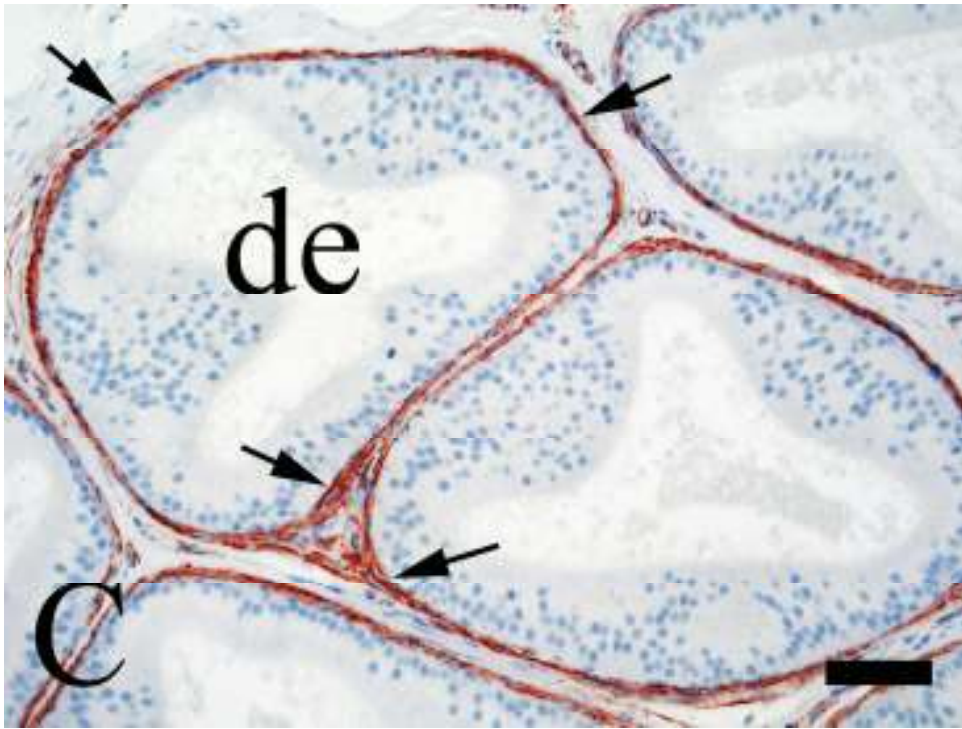
Şekil 1F. Kaput epididimide duktus epididimisin (de) epitelinde sitokeratin pozitif immunboyanma, bar; 100 μ m, immunperoksidaz, AEC.



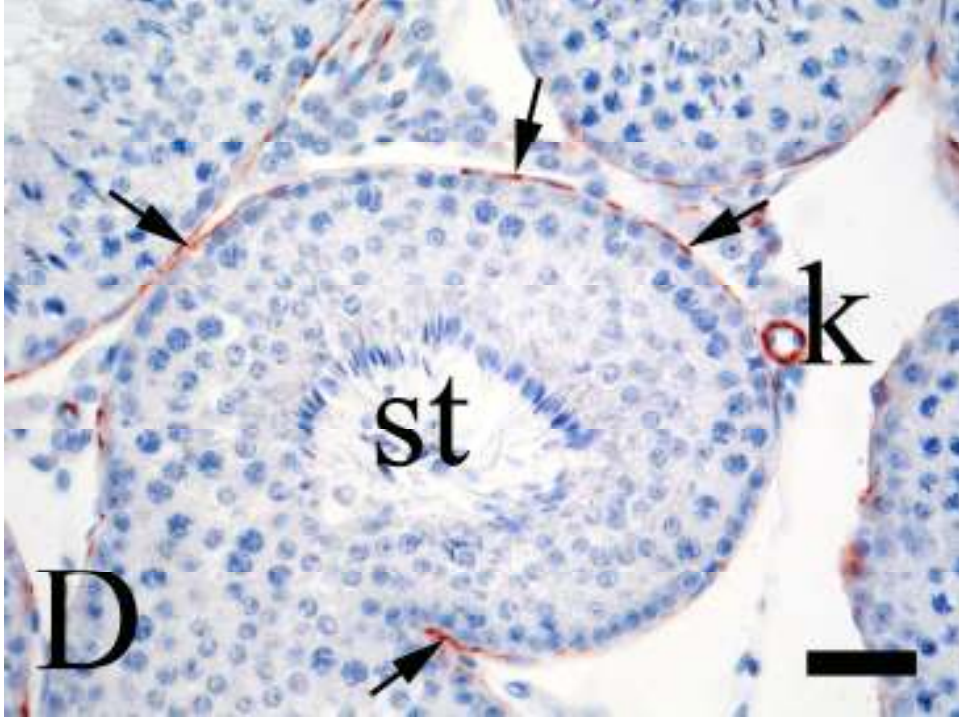
Şekil 2A. Testiste seminifer tubüllerde (st) peritübüler myoid hücrelerde, kan damarı (k) duvarında düz kas hücrelerinde ve tunika albugineyada (ta) düz kas hücrelerinde α -SMA pozitif immunreaksiyon, bar; 100 μ m, immunperoksidaz, AEC.



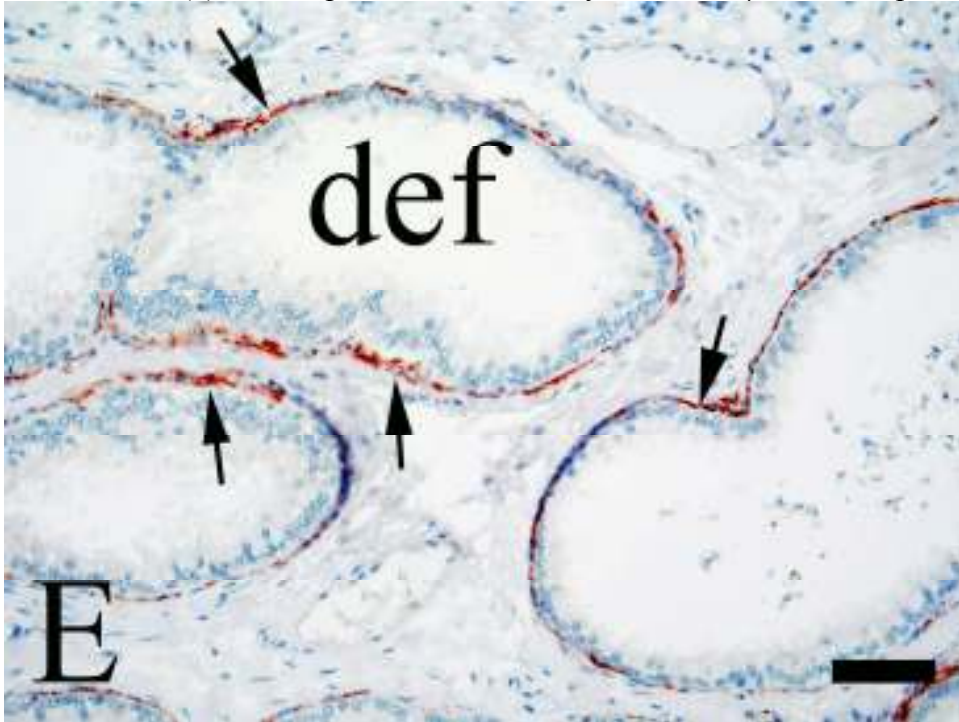
Şekil 2B. Testiste seminifer tubüllerde (st) peritubüler myoid hücrelerde (oklar) α -SMA pozitif immunreaksiyon, bar; 100 μ m, immunperoksidaz, AEC.



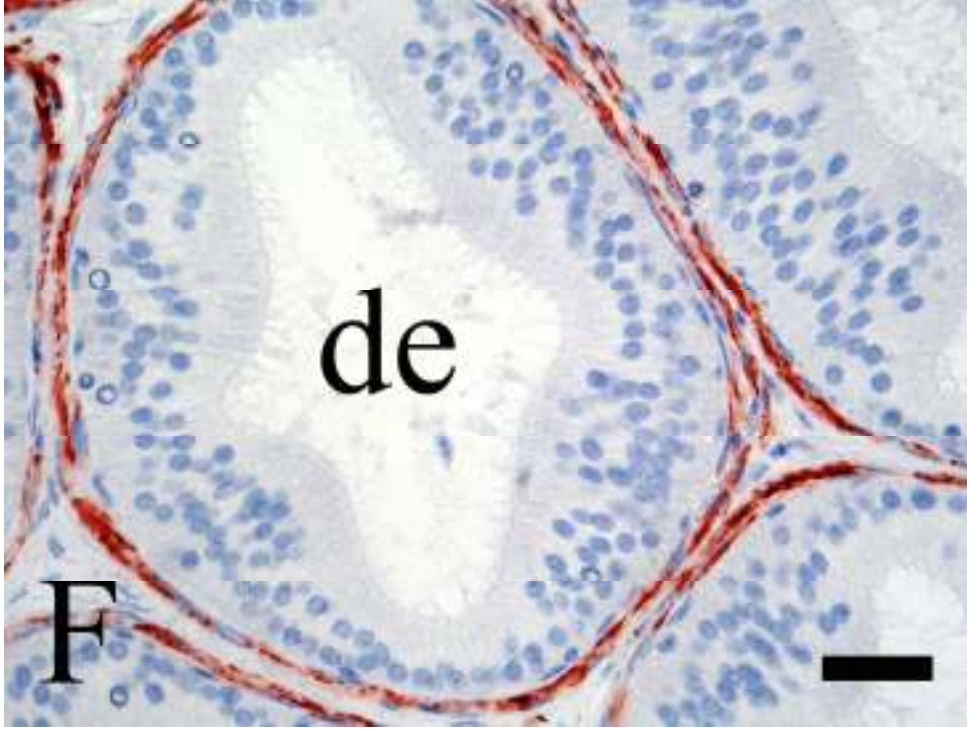
Şekil 2C. Duktus epididimis (de) epiteli altında uzanan α -SMA pozitif myoid hücreler (oklar), bar; 50 μ m, immunperoksidaz, AEC.



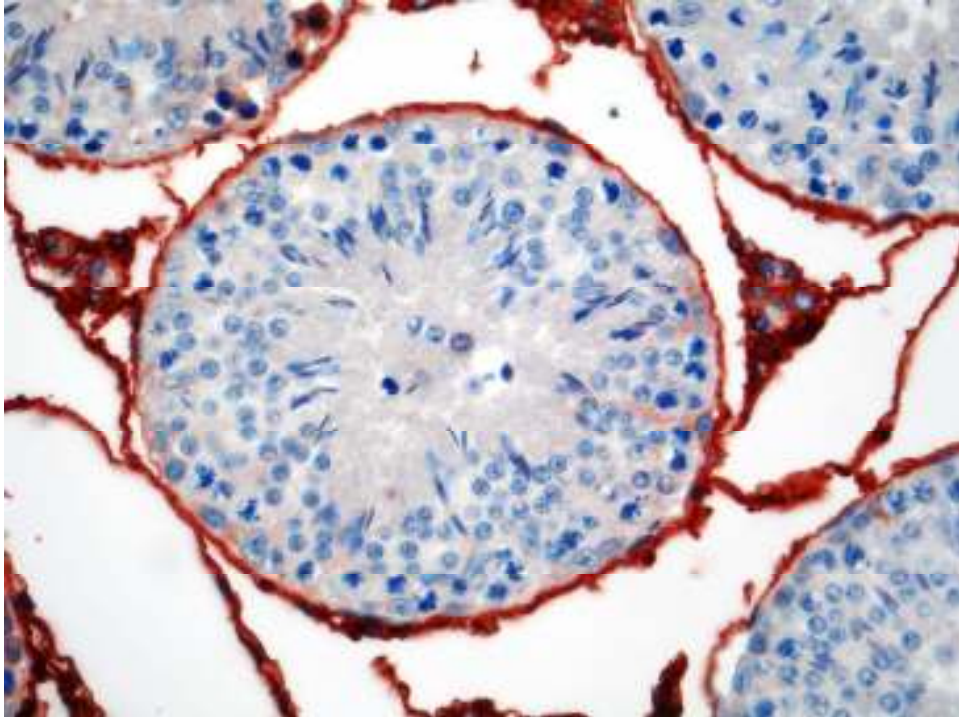
Şekil 2D. Testiste seminifer tubüllerde (st) peritubüler myoid hücrelerde (oklar) ve kan damarlarında (k) desmin pozitif immunreaksiyon, bar; 25 μ m, immunperoksidaz, AEC.



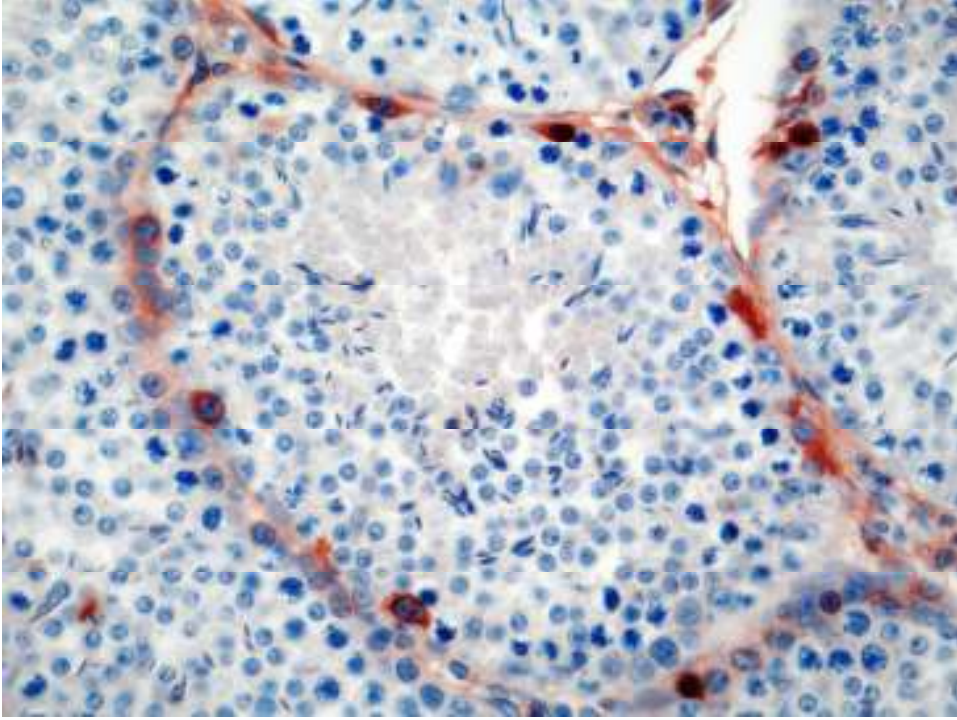
Şekil 2E. Duktuli eferentis (def) epiteli altında uzanan desmin pozitif myoid hücreler, bar; 50 μ m, immunperoksidaz, AEC.



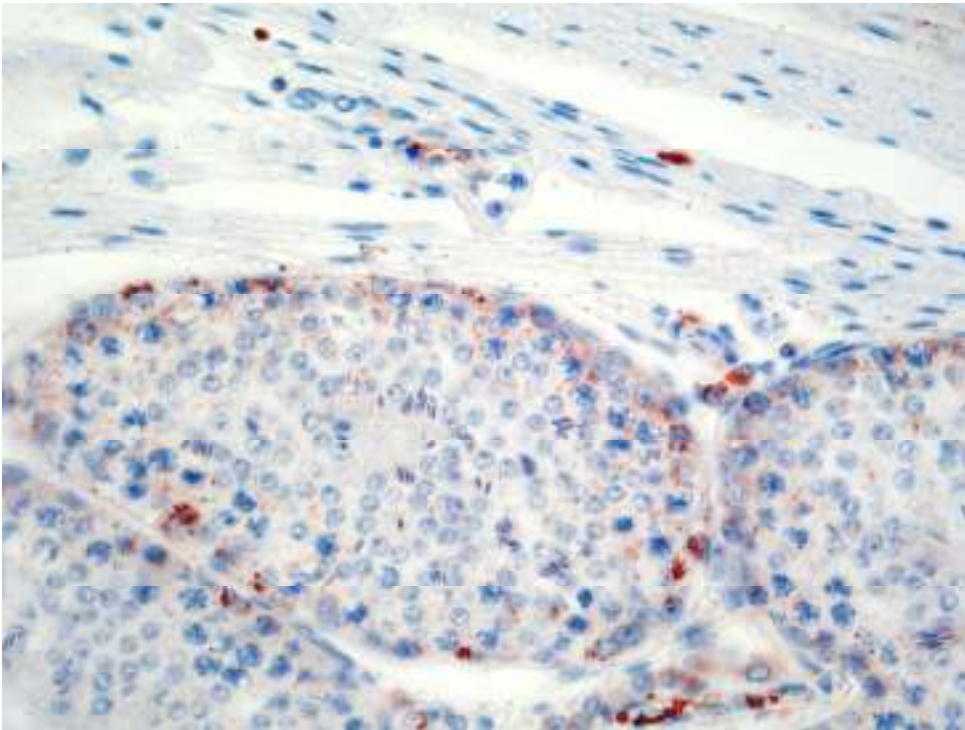
Şekil 2F. Duktus epididimis (de) epiteli altında uzanan desmin pozitif myoid hücreler (oklar), bar; 25 µm, immunperoksidaz, AEC.



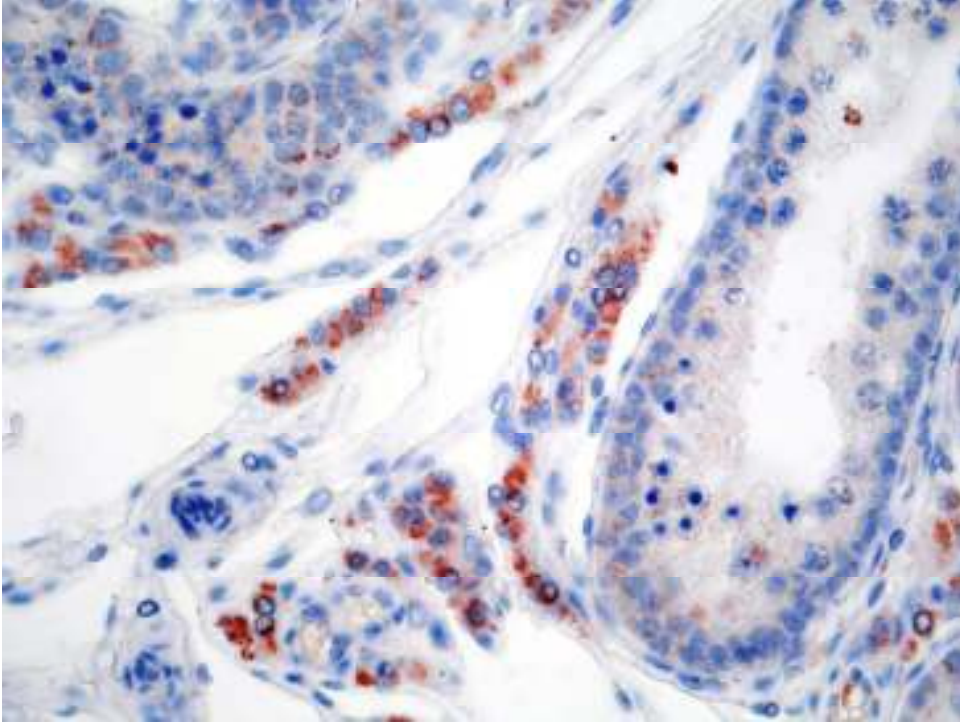
Şekil 3. Tubulus seminiferuslarda myoid hücrelerde ve bazal laminada laminin immunreaktivitesi, bar; 25 µm, immunperoksidaz, AEC.



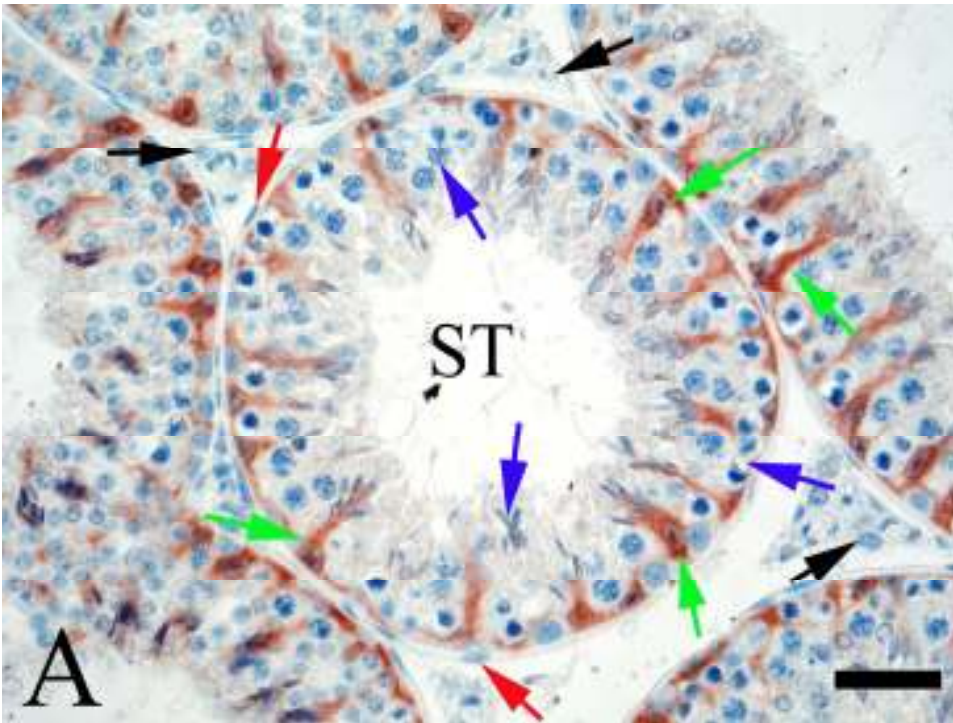
Şekil 4. Tubulus seminiferuslarda Sertoli hücrelerinde laminin immunreaktivitesi, bar; 25 μ m, immunperoksidaz, AEC.



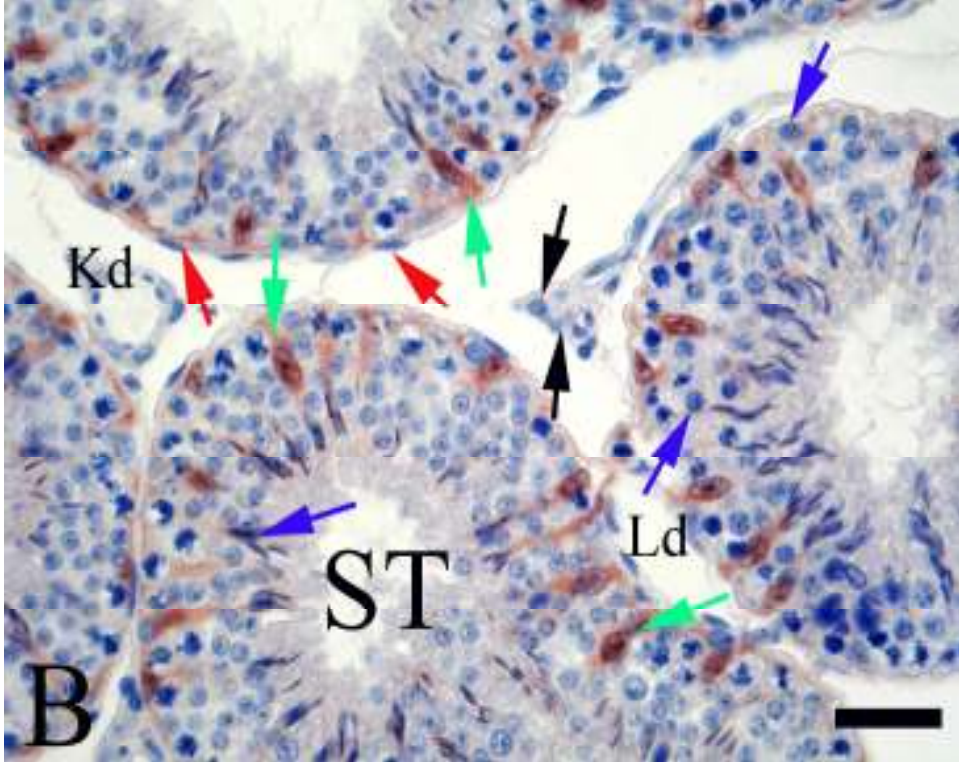
Şekil 5. Tubulus seminiferuslarda spermatogonyum, spermatid ve Leydig hücrelerinde VEGF immunreaktivitesi, bar; 25 μ m, immunperoksidaz, AEC.



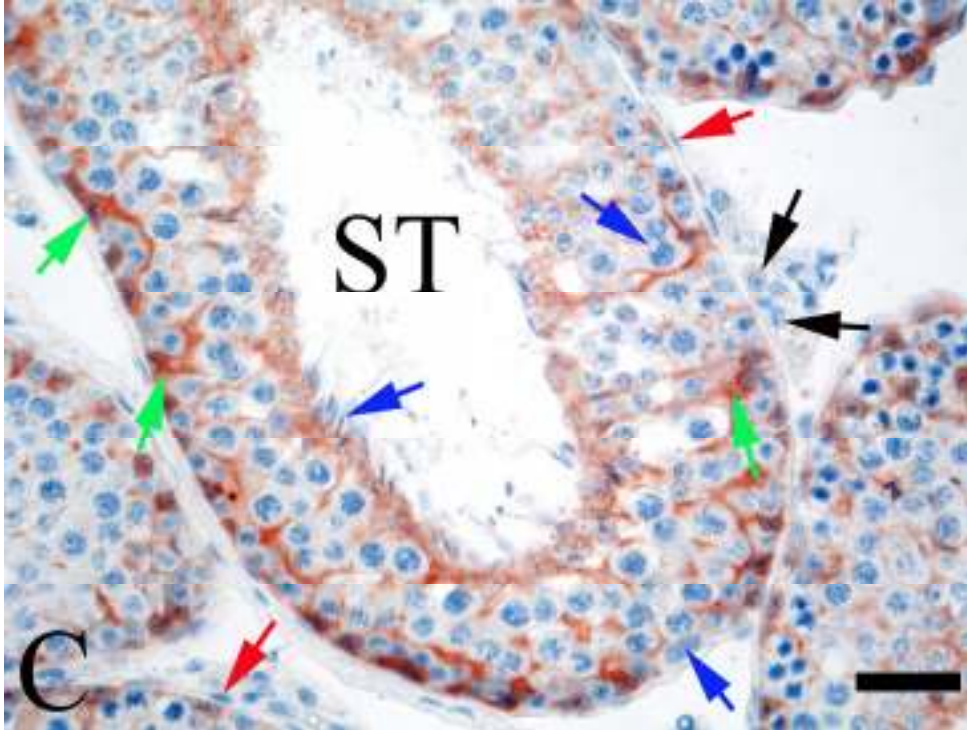
Şekil 6. İntersitisyel alanlardaki Leydig hücrelerinde VEGF immunreaktivitesi, bar; 25 μ m, immunperoksidaz, AEC.



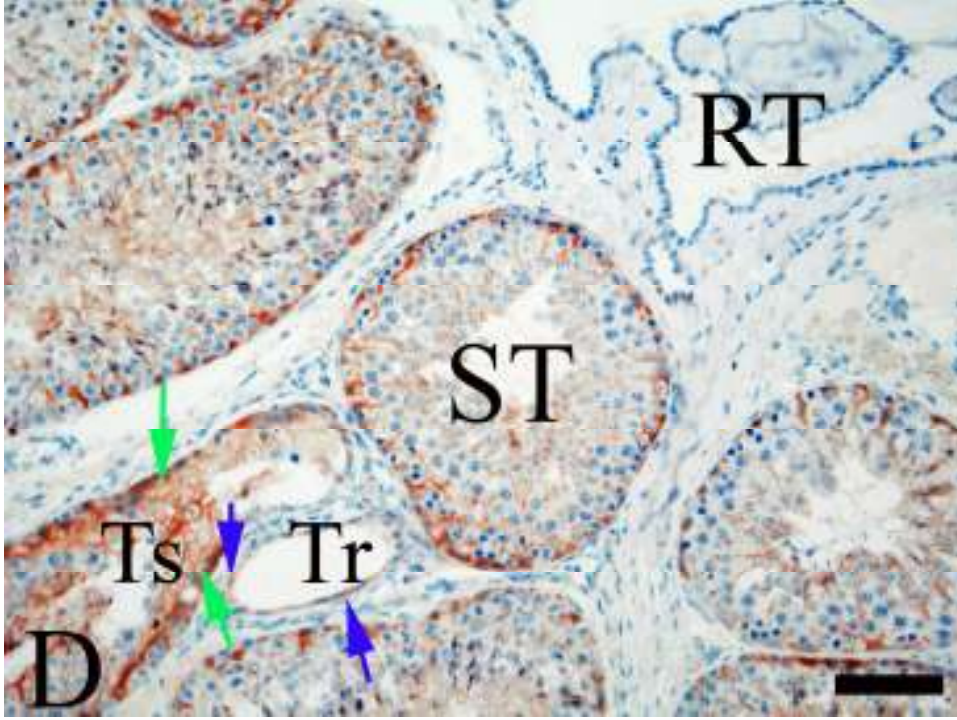
Şekil 7A. Seminifer tubüllerde (ST) S100 pozitif Sertoli hücreleri (yeşil oklar), değişik gelişme aşamalarında immunonegatif germ hücreleri (mavi oklar) ile peritubuler hücreler (kırmızı oklar) ve intertubuler alanlarda immunonegatif Leydig hücreleri (siyah oklar). Bar; 25 μ m, immunperoksidaz, AEC.



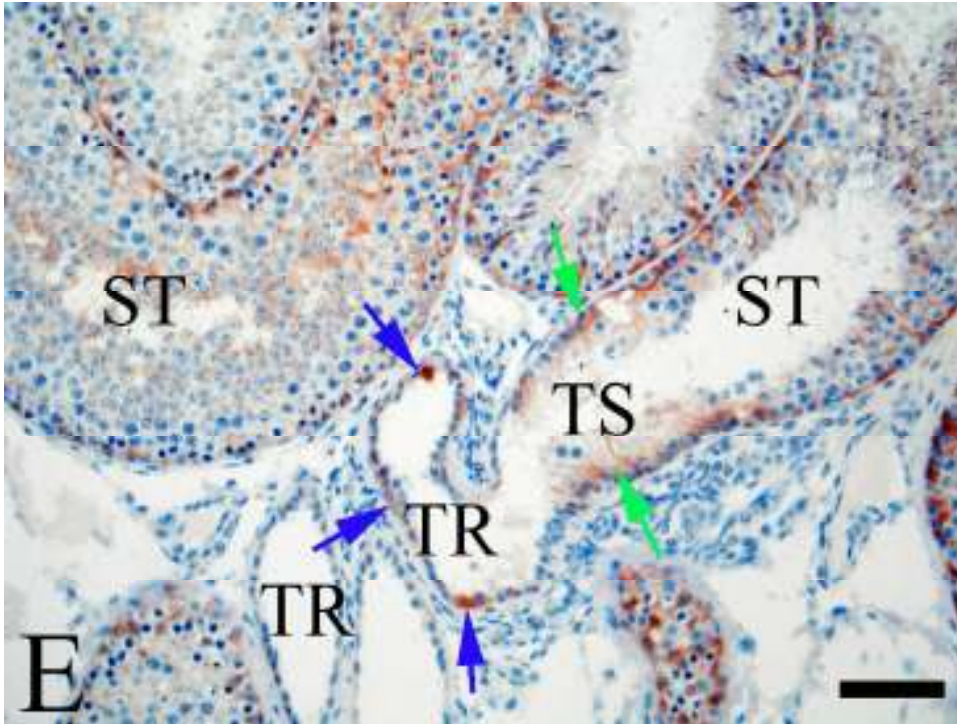
Şekil 7B. Seminifer tubüllerde (ST) S100 pozitif Sertoli hücreleri (yeşil oklar), değişik gelişme aşamalarında immunonegatif germ hücreleri (mavi oklar) ile peritubuler hücreler (kırmızı oklar) ve intertubuler alanlarda immunonegatif Leydig hücreleri (siyah oklar) ile kan damarı (Kd) ve lenf damarları (Ld). Bar; 25 μ m, immunperoksidaz, AEC.



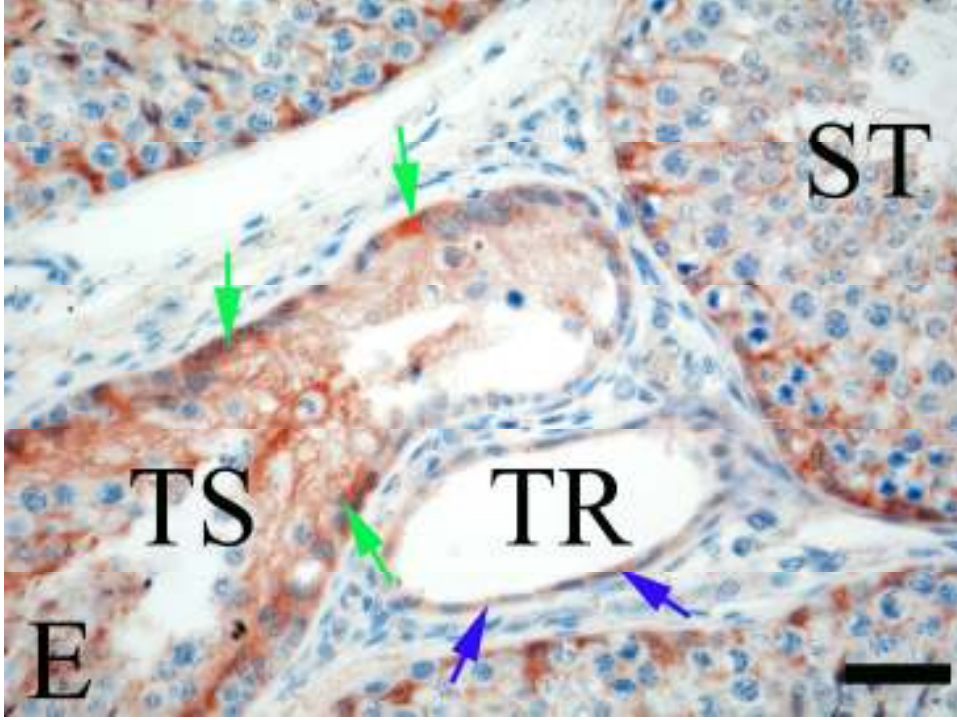
Şekil 7C. Seminifer tubüllerde (ST) S100 pozitif Sertoli hücreleri (yeşil oklar), değişik gelişme aşamalarında immunonegatif germ hücreleri (mavi oklar) ile peritubuler hücreler (kırmızı oklar) ve intertubuler alanlarda immunonegatif Leydig hücreleri (siyah oklar). Bar; 25 μ m, immunperoksidaz, AEC.



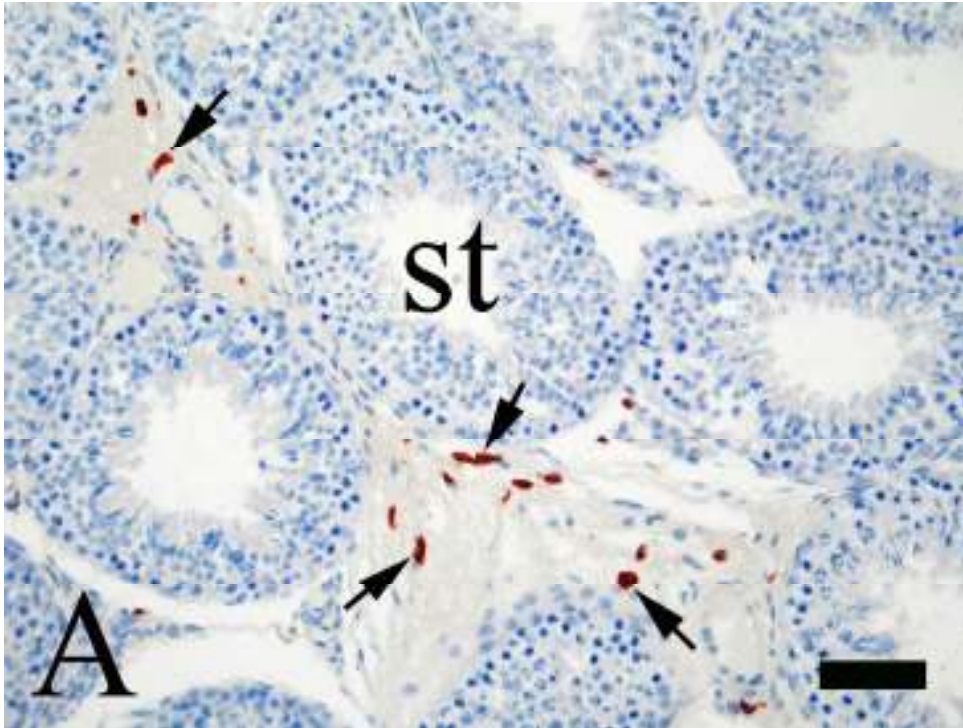
Şekil 7D. Seminifer tubül (ST) ve tubulus rektus (Tr) arasındaki geçiş bölgesi olan terminal segmentteki hücrelerde (Ts) S100 immunoreaktivitesi (yeşil oklar), tubulus rektus epitelinde S100 pozitif hücreler (mavi oklar) ve immuonegatif rete testis (RT) epiteli, 50 μ m, immunperoksidaz, AEC.



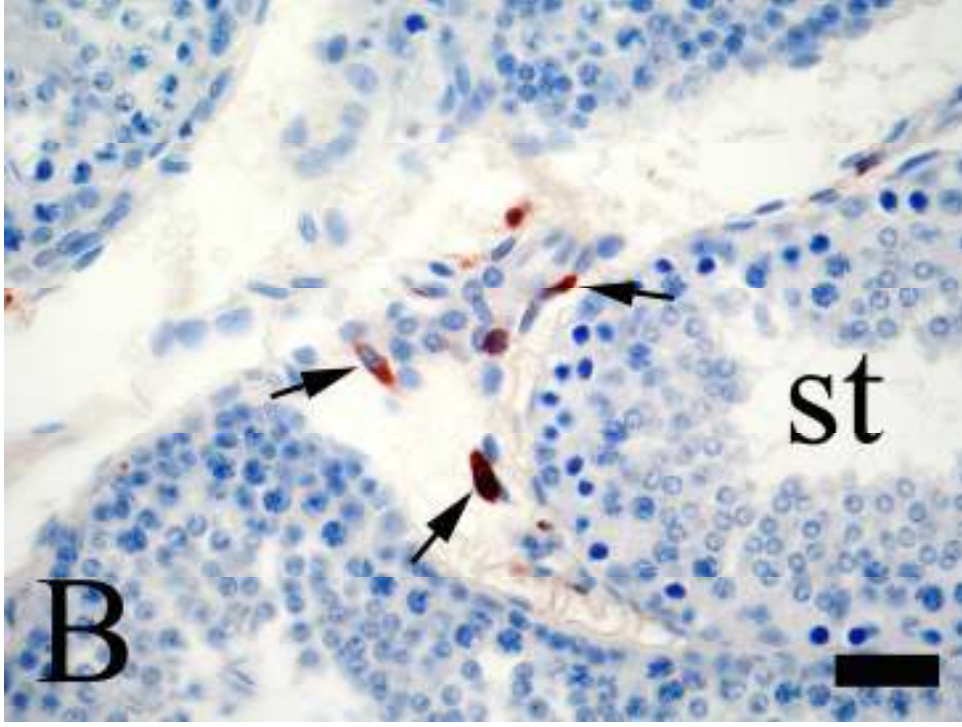
Şekil 7E. Seminifer tubül (ST) ve tubulus rektus (TR) arasında terminal segment bölümünde (TS) modifiye Sertoli hücrelerinde S100 immunoreaktivitesi (yeşil oklar), tubulus rektus epitelinde (TR) S100 pozitif hücreler (mavi oklar), Bar; 25 μ m, immunperoksidaz, AEC.



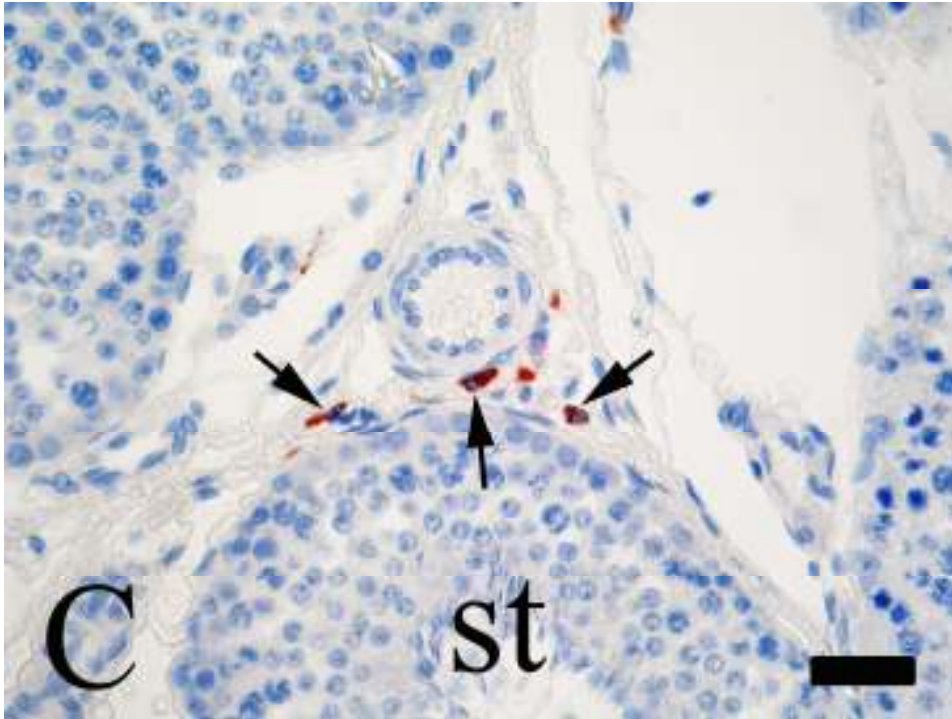
Şekil 7F. Terminal segmentte (TS) S100 pozitif modifiye Sertoli hücreleri (yeşil oklar), tubulus rektus epitelinde (TR) S100 pozitif hücreler (mavi oklar) ve S100 pozitif Sertoli hücrelerini içeren seminifer tubüller (ST), Bar; 25 μ m, immunperoksidaz, AEC.



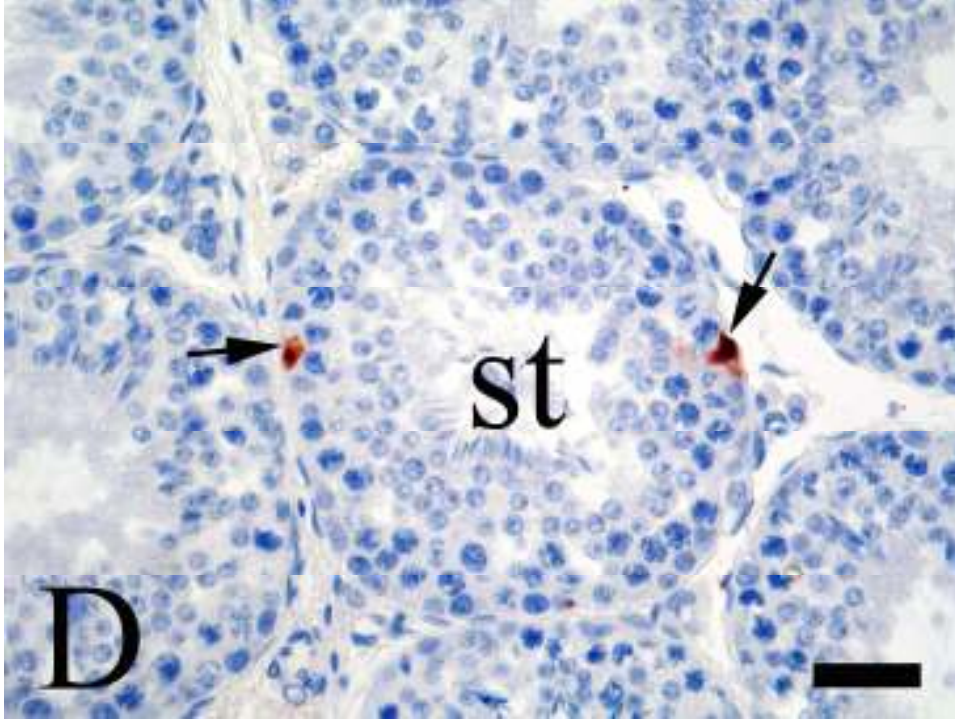
Şekil 8A. Testisin intersitisyumunda lokalize olan RAM11 pozitif makrofajlar (oklar), st; seminifer tubüller, bar; 50 μ m, immunperoksidaz, AEC.



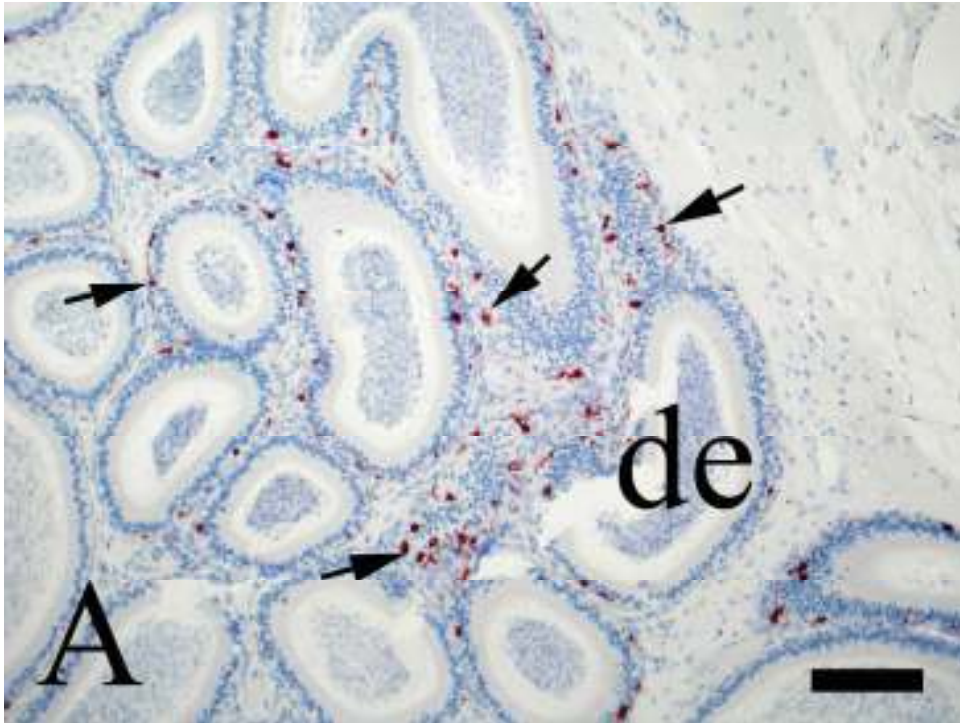
Şekil 8B. Leydig hücrelerine yakın yerleşim gösteren RAM11 pozitif makrofajlar (oklar), st; seminifer tubüller, bar; 25 µm, immunperoksidaz, AEC.



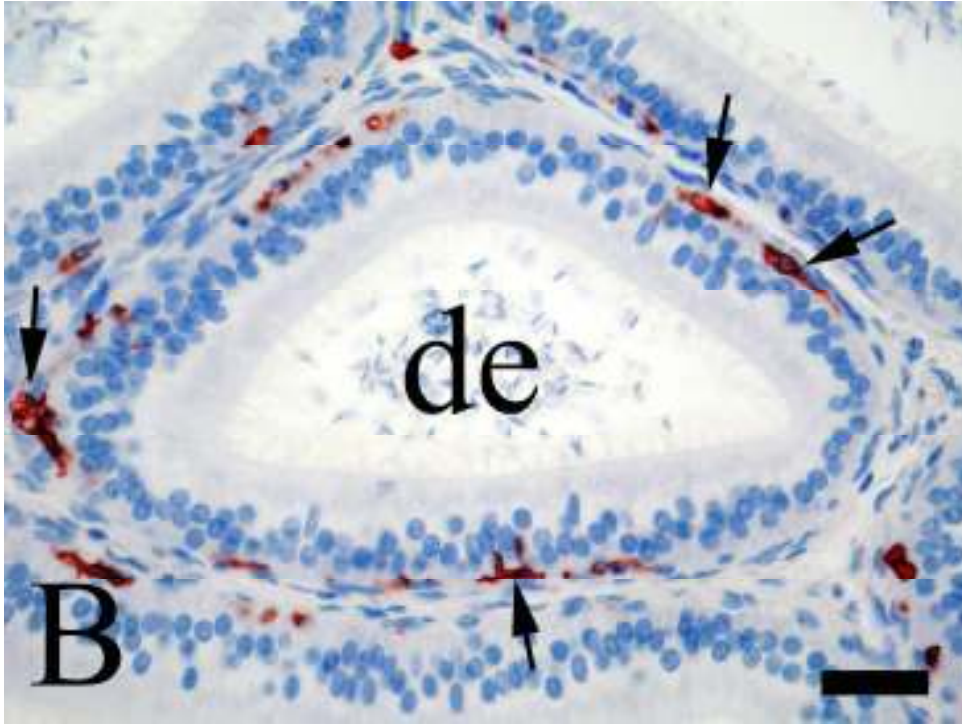
Şekil 8C. Kan damarı etrafında ve peritubüler alanlarda yerleşim gösteren RAM11 pozitif makrofajlar (oklar), st; seminifer tubüller, bar; 25 µm, immunperoksidaz, AEC.



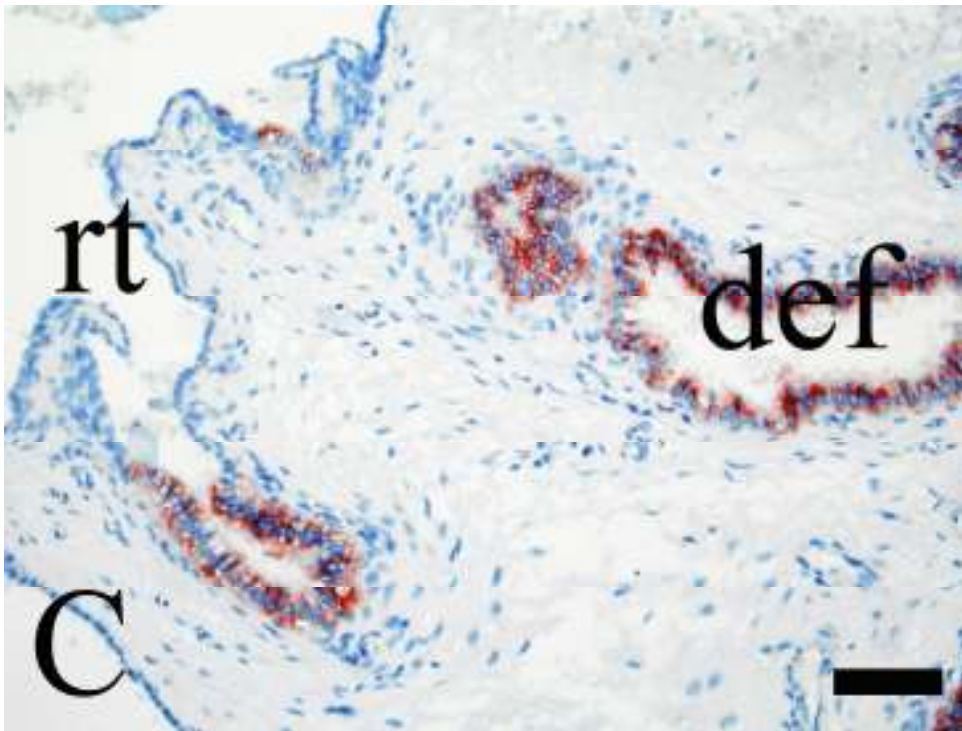
Şekil 8D. Seminifer tubül epitelinde bazal yerleşimli RAM11 pozitif makrofajlar (oklar), st; seminifer tubüller, bar; 25 μ m, immunperoksidaz, AEC.



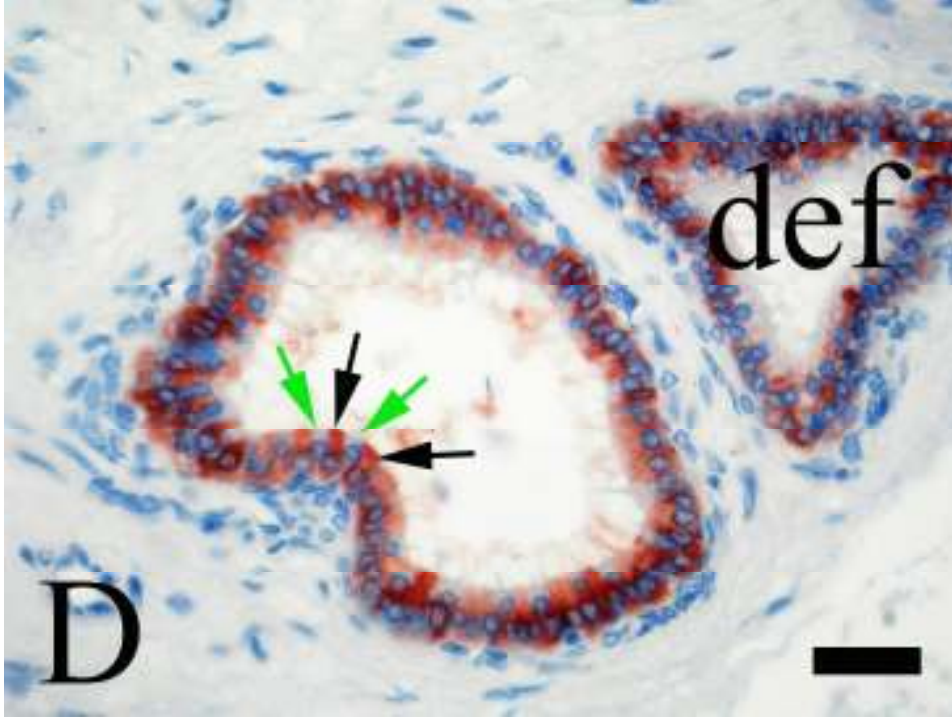
Şekil 9A. Epididimis intersitisyumunda lokalize olan RAM11 pozitif makrofajlar (oklar), de; duktus epididimisler, bar; 100 μ m, immunperoksidaz, AEC.



Şekil 9B. Duktus epididimis (de) epitelinde intraepiteliyal yerleşimli RAM11 pozitif makrofajlar (oklar), bar; 25 μ m, immunperoksidaz, AEC.



Şekil 9C. Duktuli eferentis (def) epitelinde RAM11 pozitif immunreaksiyon, rt; rete testis, bar; 50 μ m, immunperoksidaz, AEC.



Şekil 9D. Duktuli eferentis (def) epitelinde RAM11 pozitif hücreler (siyah oklar) ve negatif hücreler (yeşil oklar), bar; 25 µm, immunperoksidaz, AEC.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Erişkin testislerindeki Sertoli hücrelerinde baskın intermediyer filaman özellikle perinükleer sitoplazmada yerleşim gösteren vimentindir (Aumüller ve ark., 1988; Danahey ve ark., 1995; Franke ve ark., 1979). Bununla birlikte, germ hücrelerinin farklı gelişim aşamalarında bulunma durumuna göre, vimentin filamanlarının Sertoli hücrelerinin perinükleer sitoplazmasıyla birlikte apikal veya bazal sitoplazmalarında da yerleşim gösterdiği belirlenmiştir (Komatsu ve ark., 1998; Miettinen ve ark., 1985; Zhu ve ak., 1997). Sıçan testislerinde seminifer tubüllerdeki farklı gelişim safhalarında Sertoli hücrelerinde vimentin ekspresyonuyla ilgili değişiklikleri olabileceği gösterilmiştir (Kopecky ve ark., 2005). Vimentinin, spermatogenez sırasında Sertoli hücrelerinin sitoplazmasında meydana gelen morfolojik değişikliklere uyum sağlamasına katkı sağladığı düşünülmektedir (Aumüller ve ark., 1988; Aumüller ve ark., 1992, De Miguel ve ark., 1997; Franke ve ark., 1979; Kasper ve Stosiek 1989; Kopecky ve ark., 2005). Tavşan seminifer tubüllerinde, spermatid ve

spermatozoanların durumları dikkate alınarak 8 farklı spermatojenik safha tespit edilmiştir (Swierstra ve Foote 1963). Yapılan çalışmada safha 1-5'deki seminifer tubüllerdeki Sertoli hücrelerinin sadece perinüklear sitoplazmasında, safha 6-8'deki seminifer tubüllerdeki Sertoli hücrelerinde ise perinüklear sitoplazmadan apikal sitoplazmaya doğru bir vimentin immunoreaktivitesi belirlenmiştir. Sertoli hücreleri sitoplazmasındaki bu farklılık, seminer tubüllerin farklı gelişme aşamasındaki germ hücrelerini içermesinden ve özellikle de safha 5'ten itibaren spermatozonlara dönüşümün başlamasından kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte yapılan bazı çalışmalarda (Devkato ve ark., 2006a; Devkato ve ark., 2006b; Dinges ve ark., 1991; Ortega ve ark., 2004; Regadera ve ark., 1993; Wakui ve ark., 1994), vimentinin Leydig hücrelerinde, tubülus rektus ve rete testis epitelleriyle kan damarı endotellerinde pozitif boyandığı gözlenmiştir. Sunulan çalışmada araştırmacıların bulgularıyla uyumlu kuvvetli vimentin immunreaktivitesi belirlenmiştir. Bununla birlikte bazı araştırmacıların (Danahey ve ark., 1995; Kasper ve Stosiek 1989; Wakui ve ark., 1994) bulgularının aksine, duktus epididimis epitelinde vimentin için herhangi bir immunreaksiyon belirlenememiştir. Sunulan çalışmada, Sertoli hücrelerinde, Leydig hücrelerinde, tubülus rektus ve rete testis epitelinde ve damar endotellerinde vimentin pozitif immunboyanmanın tespit edilmesi, tavşan testislerinde bu yapıların mezenşimal kökenli olduğunu göstermiştir. Vimentin ve aktin gibi sitoskelatal proteinlerin adrenal bezi hücrelerinde steroidogeneziste rol oynadığı belirlenmiştir (Hall 1997; Hall ve Almahbobi 1997). Benzer durum şıçan testislerindeki Leydig hücrelerinde de tespit edilmiştir (Almahbobi ve ark., 1993). Sunulan çalışmada, tavşan testis Leydig hücrelerinde belirlenen vimentinin hücre iskeletinin yapısına katılma dışında steroidogeneziste de rol oynayabileceği düşünülebilir.

Sitokeratinlerin, fötus ve yeni doğan testislerindeki Sertoli hücrelerinin sitoplazmalarında vimentinle birlikte yerleşim gösterdikleri ortaya konulmuştur (Franke ve ark., 2004; Kasper ve Stosiek 1989). Ancak, pubertiyle birlikte sitokeratinlerin ortadan kaybolduğu ve sadece

vimentinin hücre iskeletinin yapısına katıldığı bildirilmiştir (Aumüller ve ark., 1988; Danahey ve ark., 1995; Franke ve ark., 1979). Bununla birlikte, yaşlı insanların testislerinde germ hücrelerini içermeyen atrofik seminifer tubüllerde ise Sertoli hücrelerinin yeniden sitokeratinleri içerebildikleri gösterilmiştir (De Miguel ve ark., 1997). Özellikle, sitokeratin 18'in pre-Sertoli hücrelerinde bulunduğu erişkin Sertoli hücrelerinde ise bulunmadığı yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. Sitokeratin 18 testislerde Sertoli hücrelerinin olgunlaşma durumunu gösteren bir hücre farklılaşma belirleyicisi olarak kullanılmaktadır (Franke ve ark., 2004; Maymon ve ark., 2000; Maymon ve ark., 2002). Yapılan çalışmada içerisinde sitokeratin 18 içeren iki farklı anti-sitokeratin primer antikoru kullanılmıştır. Bununla birlikte, yapılan boyamalarda Sertoli hücrelerinde bu antikora karşı negatif reaksiyon görülmüştür. Bu bulgu, çalışmada kullanılan tavşanların testislerindeki Sertoli hücrelerinin gelişimlerini tamamladıklarını göstermiştir. İnsan ve bazı hayvanların rete testis, duktuli eferentis ve duktus epididimis epitel hücrelerinin sitokeratin intermediyer filamanlarını içerdikleri bildirilmiştir (Aire ve Ozegebe 2008; Davidoff ve ark., 1990; Dinges ve ark., 1991; Kasper ve Stosiek 1989; Palacios ve ark., 1993; Regadera ve ark., 1993; Wakui ve ark., 1994). Sunulan çalışmada, bu araştırmacıların bulgularının aksine rete testis epitelinde sitokeratin immunoreaktivitesine rastlanılmamış, duktuli eferentis ve duktus epididimis epitelinde ise pozitif immunreaksiyon belirlenmiştir. Duktuli eferentislerde özellikle silyumlu hücrelerde pozitif immunboyanma dikkati çekerken, duktus epididimis epitelinde prensipal hücrelerin özellikle apikal ve bazal sitoplazmalarında yoğun immunreaksiyon görülmüştür. Bu durumun, çalışmada kullanılan sitokeratinlere (sit. 8/18 ve sit. 5/6/18) özgü olduğu farklı sitokeratinlerin kullanılmasıyla daha başka sonuçların ortaya çıkabileceğini göstermiştir.

α -SMA, genellikle testislerdeki peritubüler myoid hücreleri gibi kontraktıl fonksiyonlara sahip hücrelerde bulunmaktadır (Arenas ve ark., 1997). α -SMA, son düz kas hücre farklılaşmasının spesifik bir belirleyicisi olarak bilinir (Devkato ve ark., 2006a). Bu nedenle, α -SMA'nın

sadece testiste farklılaşmasını tamamlamış düz kas hücrelerinde bulunması beklenir. Çalışmada, insan ve diğer hayvan türlerinde olduğu gibi (Arenas ve ark., 1997; Devkato ve ark., 2006a; Holt ve ark., 2004; Maekawa ve ark., 1995; Maekawa ve ark., 1996; Rodriguez ve ark., 1999) tavşan testisinde de seminifer tubülleri çevreleyen myoid hücrelerde kuvvetli α -SMA pozitif immunreaktivite belirlendi. Ayrıca, rete testis, duktuli eferentis ve duktus epididimis epitelleri altında uzanan peritübüler kas katmanı ile damar duvarı ve tunika albuginedaki düz kas hücrelerinde α -SMA pozitif immunreaktivite gözlemlendi. Bulgularımıza benzer olarak bazı araştırmacılar sıçan (Maekawa ve ark., 1996; Paranko ve Pelliniemi 1992), maymun (Schlatt ve ark., 1993), koç (Steger ve Wrobel 1994; Steger ve ark., 1994), boğa (Devkato ve ark., 2006a; Devkato ve ark., 2006b; Steger ve ark., 1994), kanatlı (Maretta ve Marettova 2004) ve insan (Palacios ve ark., 1993) testis ve epididimislerinde de benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Peritübüler myoid hücrelerin spermatozoanların ve testiküler sıvının rete testis ve epididimise doğru taşınmasında peristaltik aktiviteden sorumlu oldukları, epididimal kanal boyunca spermin geçişinin ise duktus epididimisin etrafındaki peritübüler kas katmanının aktif kontraksiyonlarına bağlı olduğu bildirilmiştir (Maekawa ve ark., 1996). Peritübüler hücrelerin kontraktıl yeteneklerinden başka, Sertoli hücrelerinde total protein üretimini stimüle ettikleri ve ABP (Androgen-binding protein) ile transferrin üretimini arttırdıkları anlaşılmıştır (Maekawa ve ark., 1996; Steger ve Wrobel 1994). Bu hücrelerin ayrıca in vitro Sertoli hücre fonksiyonlarının önemli bir düzenleyicisi olduğu bilinen P-mod-S (peritubuler factor that modulates Sertoli cell function) isimli bir proteini ürettikleri de bilinmektedir (Verhoeven ve ark., 2000). Ayrıca bu hücrelerin seminifer tubüllerde androjenlerin etkisini modüle ettiklerini ve dolayısıyla spermatogenez üzerinde etkili olduklarını düşündürdükleri belirtilmektedir (Maekawa ve ark., 1996).

Desmin, hem çizgili hem de düz kaslarda bulunan bir intermediyer filaman olup testis ve epididimiste α -SMA ile benzer hücresel fonksiyonlara sahiptir (Arenas ve ark., 1997;

Rodriguez ve ark., 1999; Virtanen ve ark., 1986). Bazı araştırmacılar, özellikle f3tal d3nemdeki testislerde Sertoli h3crelerinin desmin filamanlarını ierebildiklerini bildirmiştir (Rogatsch ve ark., 1996). Bununla birlikte yapılan bazı araştırmalarda, kriptorşik ve t3m3rl3 testislerdeki Sertoli h3crelerinde desmin immunreaktivitesi saptanmıştır (De Miguel ve ark., 1997; Rogatsch ve ark., 1996). Sunulan çalışmada desmin için yapılan immunboyamalarda, α -SMA'ya benzer olarak peritub3ler myoid h3creler ile rete testis, duktuli eferentis ve duktus epididimis epitelleri altında uzanan kas h3crelerinde pozitif immunreaksiyon reaksiyon g3zlenirken, Sertoli h3crelerinde bir immunreaksiyon belirlenmemiştir. Ancak, seminifer tub3llerdeki peritub3ler h3crelerde saptanan pozitif immunreaksiyonun α -SMA'ya g3re daha zayıf olduğu dikkati çekmiştir. Sunulan çalışmada desmin ve α -SMA'nın aynı yapıları boyaması bu iki proteinin benzer fonksiyonlara sahip olduklarını g3stermektedir.

Laminin, bazal laminanın yapısına giren 3nemli glikoproteinlerdendir. Bug3ne kadar, 12 farklı laminin izoformu belirlenmiştir. Lamininin h3cre adezyonu, gelişim, morfoloji, farklılaşma ve migrasyon gibi 3nemli biyolojik aktivitelere sahip bir molek3ld3r. İnsan ve çeşitli hayvan t3rlerinin testislerinde seminifer tub3llerin bazal laminasında laminin varlığını bildirilmektedir (Kleinman ve ark., 1985). Lamininler testiste Sertoli h3creleri ve peritubuler myoid h3crelerde 3retilmektedir. Ereikin testisinde laminin Sertoli h3creleri arasındaki h3cre bağlantılarını ve Sertoli h3cre iskeleti ve ekstrasell3ler laminin arasındaki transmembran bağlantısıyla kan testis bariyerini d3zenler. Sunulan çalışmada, anti-laminin primer antikoru ile yapılan boyamalarda, seminifer tub3llerin bazal laminasında ve peritubuler myoid h3crelerle bazı Sertoli h3crelerinin sitoplasmasında pozitif immunreaksiyon g3zlendi.

Vask3ler endotelial growth fakt3r (VEGF), 21 kDa ağırlığında heparin bağlayıcı homodimerik bir glikoproteindir. VEGF, vask3ler endotelial h3creler 3zerinde mitojenik etkiye sahiptir. Ayrıca, VEGF endotelial h3cre proliferasyonu, anjiogenezis ve vask3ler permabilite 3zerinde bir ana d3zenleyicidir.

VEGF, menstrual siklus ve ovarial folikül gelişimi sırasında fizyolojik aktivitesinin bir parçası olarak vasküler değişiklikleri destekleyerek üreme fonksiyonlarını büyük ölçüde düzenler (LeCouter ve ark., 2001). Buna ilaveten, VEGF, gebelik sırasında, uterus damarlarının yeniden biçimlendirilmesini uyararak implantasyondan sonra endometrial sitotrophoblast oluşumunu düzenler (Charnock-Jones ve ark., 1994). İlginç olarak son yıllarda yapılan çalışmalarla, VEGF ve reseptörlerinin erkek ve dişi genital sisteme ait non-vasküler hücreler (germ hücreleri ve diğerleri) üzerindeki rollerine dikkat çekildi. VEGF, VEGFR-2⁺ spermatogoniya kök hücreleri ve fertilize olmuş oositlerin proliferasyonunu etkilemektedir (Luo ve ark., 2002; Nalbandian ve ark., 2003). Bununla birlikte, spermatozonların ve oositlerin motilitesi VEGFR-1 aracılığıyla düzenlenir (Nalbandian ve ark., 2003; Duchek ve ark., 2001). VEGF insan semeninde son derece yüksek olarak eksprese edilmektedir, ve fare testis ve epididimisinde VEGF'ün aşırı ekspresyonu spermatojenik blokaj nedeniyle infertiliteye neden olur (Brown ve ark., 1995; Korpelainen ve ark., 1998). Brown ve ark., (1995) insan seminal plazmasında çok yüksek konsantrasyonda VEGF bulunduğunu göstermişlerdir. Bu araştırmacılar ayrıca hem prostat hem de vezikula seminalis epitelinde VEGF mRNA ve proteinin kuvvetli bir şekilde eksprese edildiğini göstermişlerdir. Bu sonuçlar, seminal plazmada bulunan VEGF'ün ana kaynağının testis ve epididimis olmayıp prostat ve/veya vezikula seminalis olduğunu göstermektedir (Brown ve ark., 1995). VEGF prostat ve vezikula seminaliste çok yüksek miktarlarda üretildiği için bu gelişim faktörünün fertilitede önemli rolü olduğu düşünülür. Bununla birlikte VEGF'ün genital sistemdeki rolü tamamen açıklığa kavuşturulamamıştır. Brown ve ark., (1995) VEGF'ün üreme üzerindeki birkaç olası fonksiyonundan bahsetmişlerdir. Bir mikrovasküler permabilite düzenleyicisi olarak VEGF, semende sıvı ve protein kompozisyonunun belirlenmesinde bir önemli rol oynayabilir. Ayrıca bu araştırmacılar, semende bulunan VEGF'ün koyitus sırasında dişi genital kanalda mikrovasküler permabiliteyi değiştirebildiği ve sıvı salgılanmasını etkileyebildiğini

düşünmüşlerdir. VEGF hem erkek hem de genital kanal sıvısının miktarı ve kompozisyonu üzerindeki etkisi sperm motilitesi ve canlılığını etkileyerek fertilite üzerinde etkili olmaktadır. Endotelial hücre gelişimi ve anjiogenezis üzerinde stimule edici etkileri bulunan VEGF endometriyumda blastosistin implantasyonu sırasında önemli olan ilk anjigenik olaylarda bir rol oynayabilir. VEGF'ün erkek genital kanalındaki bir olası rolü de, Sertoli ve Leydig hücreleri tarafından üretilen VEGF, testisin seminifer, tubuler ve intersitisyel kompartımanlarında bir elverişli mikroortam sağlayan testikuler mikrodamarlar üzerinde parakrin etkiye sahip olmalarıdır. Ayrıca bu araştırmacılar, Sertoli ve Leydig hücreleri üzerinde VEGF reseptörlerinin varlığını bildirmişlerdir. Bu durum, VEGF'ün bu iki hücre tipi üzerinde bir otokrin düzenleyici etkiye sahip olabileceğini göstermektedir. Ayrıca VEGF reseptörlerinin ekspresyonu spermatozoa üzerinde de gösterilmiştir, bu durum seminal plazma VEGF'ün spermatozoonların kendilerini hedef alabileceğini göstermektedir (Obermair ve ark., 1999). VEGF reseptörlerinin spermatozoların (orta-pakiten spermatositlerde ve yuvarlak spermatidlerde) kendilerinde bulunması, VEGF'ün direk olarak spermojenik hücreler üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. VEGF reseptörlerinin yuvarlak spermatidler üzerindeki ekspresyonu özellikle ilgiçtir, çünkü gözlenen spermatojenik blokaj tam bu noktada olur (Korpelainen ve ark., 1998). Korpelainen ve ark., (1998) da gözlenen infertilitenin VEGF reseptörleri de eksprese eden Leydig hücrelerindeki VEGF'ün bir etkisiyle meydana geldiğini göstermişlerdir.

Germ hücrelerine ilaveten, VEGF germ hücrelerinin hemostazisinde ve gelişimi için önemli diğer genital kanal hücrelerinin (erkeklerde seminifer tubul epiteli, Sertoli ve Leydig hücreleri, dişilerde ovaryumda granuloza hücreleri) fonksiyonlarını da etkiler. Bu hücrelerin tümü VEGF ve reseptörlerinin her ikisini veya birini eksprese ederler (Nalbandian ve ark., 2003; Korpelainen ve ark., 1998; Agrawal ve ark., 2002). Bununla birlikte, VEGF'ün germ hücrelerini aksine Leydig ve Sertoli hücreleri tarafından sentezlendiği ve salgılandığı da

gösterilmiştir (Ergun ve ark., 1997). Bundan dolayı, farelerde VEGF'ün aşırı ekspresyonu duktus epididimiste epitelial hiperplaziye neden oldu (Korpelainen ve ark., 1998).

Erişkin dişilerin aksine, erkek testislerinde bir aktif anjiogenez yoktur. Bu gerçeğe rağmen, testiste çok büyük miktarlarda VEGF üretilmektedir. İnsan ve bazı hayvan testislerinde Sertoli ve Leydig hücreleri ile vasküler yapılarda VEGF'in varlığı bildirilmiştir. Sertoli hücrelerinde bulunan VEGF'in spermatogenezis ve spermiyogeneziste önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Ergun ve ark., 1997; Nalbandian ve ark., 2003). Özellikle bu fonksiyonların başlatılması işleminde rol oynadıkları görülmüştür. Sunulan çalışmada, anti-VEGF primer antikoru ile yapılan boyamalarda, seminifer tubüllerde germ hücrelerinin sitoplazmasında ve intersitisyel alanlarda Leydig hücrelerinin sitoplazmasında pozitif immunreaksiyon gözlemlendi. Bu hücrelerdeki boyanmanın granüler tarzda olduğu dikkati çekti. Bununla birlikte testiküler kan damarlarında da negatif reaksiyon gözlemlendi. Ayrıca, tubulus rektus, rete testis, ductuli efferentis ve duktus epididimis epitellerinde negatif immunreaksiyon gözlemlendi. Sunulan çalışmada sıçan (Kiliç ve ark., 2009) ve geyik (Schön ve ark., 2010) testisleriyle uyumlu olarak sadece germ hücrelerinde ve Leydig hücrelerinde VEGF için pozitif immunreaktivite belirlenmiştir. Oysaki insan (Ergün ve ark., 1997) ve fare (Nalbandian ve ark., 2003) testislerinde Sertoli hücrelerinde de immunreaksiyon bildirilmiştir. Sunulan çalışmayla VEGF'ün tavşan testislerinde immunohistokimyasal lokalizasyonu ilk defa ortaya konulmuştur. VEGF'ün tavşan testislerinde insan (Ergün ve ark., 1997), fare (Nalbandian ve ark., 2003), sıçan (Kiliç ve ark., 2009) ve geyik (Schön ve ark., 2010) testislerindeki benzer fonksiyonları olabileceği sonucuna varılmıştır.

S100 proteininin insan (Haimato ve ark., 1987; Michetti ve ark., 1985) ve maymun (Girod ve ark., 1986), kedi (Amselgruber ve ark., 1994; Cruzana ve ark., 2000), köpek (Amselgruber ve ark., 1994), boğa (Amselgruber ve ark., 1992; Amselgruber ve ark., 1994), koç (Amselgruber ve ark., 1994), bizon (Czykier ve ark., 1999), manda (Cruzana ve ark., 2003), domuz

(Amselgruber ve ark., 1994), at (Amselgruber ve ark., 1994), rat (Amselgruber ve ark., 1994; Michetti ve ark., 1985), fare (Czykier ve ark., 2000; Ortega ve ark., 2004), ördek (Sugimura ve ark., 1989), gerbil, kobay ve hamster (Ortega ve ark., 2004) gibi hayvanların testislerindeki lokalizasyonları ile ilgili çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Buna karşın, çeşitli hücresel fonksiyonlara sahip bu proteinin tavşan testisi ve epididimisindeki varlığı ve hücresel lokalizasyonu ile ilgili herhangi bir kaynak bulunmamaktadır. Bu durumun muhtemel nedeni, geçmişte S100 proteinlerine karşı hazırlanan tüm antikorların tavşan kaynaklı olması ve bu antikorların kullanımının tavşanlarda spesifik olmayan bağlanmalarla sonuçlanması olabilir. Bununla birlikte sunulan bu çalışmada, sığır beyininden izole edilen S100 proteinine karşı farelerde hazırlanmış olan ticari bir monoklonal primer antikor uygulanarak, S100 proteininin tavşan testisindeki varlığı ve hücresel lokalizasyonunu immunohistokimyasal boyama yöntemiyle ortaya konulmuştur.

Doğumdan sonra tavşan testislerinin gelişimi diğer doku ve organların gelişimine göre daha yavaştır, ancak beşinci haftadan itibaren gelişim hızlı bir seyir almaktadır. Seminifer tubüllerde germ hücrelerinin üretimi doğumdan sonra 40-50. günler arasında başlarken, bu kanallar 84. günden itibaren aktiftir. İlk sperma alımı 110. günde gerçekleşirken, içerdiği canlı spermatozoon oranı oldukça düşük olduğundan bu spermayla döllenme gerçekleşmemektedir. Bununla birlikte, tavşanlar ortalama 32. haftada cinsel olgunluğa (puberta) ulaşmaktadır (Huerkamp 2003). Tüm bu bilgiler dikkate alındığında bu çalışmada henüz cinsel olgunluğa erişmemiş üç aylık (pre-pubertal dönem) ve cinsel olgunluğa ulaşmış sekiz aylık (pubertal dönem) Ankara tavşanlarına ait testisler kullanılmıştır. Mouse anti-S100 primer antikorunun kullanılması sonucunda, S100 proteinin pre-pubertal ve pubertal dönemdeki tavşan testislerinde bazı hücrelerde varlığı belirlenmiştir.

Sunulan çalışmada, anti-S100 primer antikor ile yapılan immunohistokimyasal boyamalarda, pre-pubertal dönemdeki tavşan testislerinde seminifer tubül duvarında Sertoli hücreleriyle,

intertübüler alanlarda bazı Leydig hücrelerinde S100 pozitif immunreaksiyon tespit edildi. Buna karşın, seminifer tubül duvarında farklı gelişme aşamalarındaki germ hücreleri ve peritübüler hücrelerde, kan damarları endotellerinde, intratestiküler kanallarda, duktuli eferentislerde ve duktus epididimiste S100 negatif immunreaksiyon belirlendi. S100 proteinin testikuler lokalizasyonu ile ilgili olarak insan ve hayvanlar üzerinde yapılan çalışmaların büyük bir çoğunluğu erişkin testisi üzerine odaklanmıştır (Amselgruber ve ark., 1994; Cruzana ve ark., 2000; Cruzana ve ark., 2003; Czykier ve ark., 1999; Girod ve ark., 1986; Haimato ve ark., 1987; Michetti ve ark., 1985). Buna karşın, pre-pubertal dönemdeki testisler üzerindeki araştırmalar (Kagi ve ark., 1988) oldukça yetersizdir. Rat testislerinin gelişimi üzerinde yapılan bir çalışmada araştırmacılar, S100 immunreaktivitesinin Leydig hücrelerinde fetal dönemde çok zayıf, pre-pubertal dönemde negatif, pubertal dönemde ise pozitif olduğunu bildirmişlerdir (Kagi ve ark., 1988). Sunulan bu çalışmada ise, pre-pubertal dönemde Leydig hücrelerinin bazıları pozitif bazıları ise negatif immunreaktivite sergilerken, pubertal dönemdeki Leydig hücrelerinde S100 immunreaktivitesinin kaybolduğu görülmüştür. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar doğrultusunda, tavşan testisi ve sıçan testisleri (Kagi ve ark., 1988) arasında S100 proteinin Leydig hücrelerindeki immunoreaktivitesi üzerine bir benzerlik kurulamamıştır. Bununla birlikte, intertübüler alanlardaki bazı Leydig hücrelerinde S100 immunoreaktivitesinin görüldüğü halde diğerlerinde görülmemesinin muhtemelen, S100 pozitif Leydig hücrelerinin salgısal aktivite bakımından S100 negatif Leydig hücrelerine göre daha aktif olmalarına ve S100 proteininin immunopozitif hücrelerde hücre iskeletinin oluşturulmasından ziyade sekresyonla ilgili bir görev görmesine bağlı olabilir.

Sunulan çalışmada, anti-S100 primer antikoru ile yapılan immunohistokimyasal boyamalarda, pubertal dönemdeki tavşan testisinde seminifer tubüllerdeki Sertoli hücreleri, terminal segmentteki modifiye Sertoli hücreleri ve tubulus rektusu döşeyen epitel hücreleri S100 immunopozitif reaksiyon verirken, Leydig hücreleri, germ hücreleri, peritubuler hücreler, rete

testis, duktuli efferentis ile duktus epididimis epitelleri ve lenf ile kan damarı endotelleri ise S100 immunnegatif reaksiyon verdi. Gerek pre-pubertal gerekse de pubertal dönemdeki testislerde, Sertoli hücrelerindeki immunreaktivitenin kedi (Amselgruber ve ark., 1994; Cruzana ve ark., 2000), boğa (Amselgruber ve ark., 1992; Amselgruber ve ark., 1994), koç (Amselgruber ve ark., 1994), manda (Cruzana ve ark., 2003), domuz (Amselgruber ve ark., 1994), at (Amselgruber ve ark., 1994), ördek (Sugimura ve ark., 1989) ve maymun (Girod ve ark., 1986) testislerinde olduğu gibi sitoplazma ve çekirdeğe özgü olduğu belirlendi. Ayrıca, seminifer tubülleri düz tubüllere bağlayan ve terminal segment olarak da isimlendirilen kısa geçiş bölümündeki epitel katmanı oluşturan (Osman 1979) modifiye Sertoli hücrelerinin de kedi (Amselgruber ve ark., 1994; Cruzana ve ark., 2000), boğa (Amselgruber ve ark., 1992; Amselgruber ve ark., 1994), koç, domuz, at (Amselgruber ve ark., 1994) ve manda (Cruzana ve ark., 2003) testislerinde olduğu gibi güçlü S100 pozitif immunreaktivite gösterdiği dikkati çekti. Bunlara ilaveten, tubulus rektus epitelinin boğa (Amselgruber ve ark., 1992; Amselgruber ve ark., 1994), koç (Amselgruber ve ark., 1994), manda (Cruzana ve ark., 2003) ve domuz (Amselgruber ve ark., 1994) testisinde olduğu gibi S100 pozitif reaksiyon gösterdiği saptandı.

İnsan (Haimato ve ark., 1987; Michetti ve ark., 1985), kedi (Amselgruber ve ark., 1994; Cruzana ve ark., 2000), rat (Amselgruber ve ark., 1994; Marenholz ve ark., 2006), fare (Czykier ve ark., 2000; Ortega ve ark., 2004), kobay, hamster ve gerbil (Ortega ve ark., 2004) ve daha zayıf olmak üzere at ve domuz (Amselgruber ve ark., 1994) testislerindeki Leydig hücrelerinde S100 proteinin bulunduğunu bildirilmesine karşın; sunulan çalışmada, pre-pubertal dönemdeki tavşan testislerinde bazı Leydig hücrelerinin S100 proteinini içerdikleri, pubertal dönemde ise pozitif reaksiyonun ortadan kalktığı görülmüştür.

Köpek (Amselgruber ve ark., 1994), kedi (Amselgruber ve ark., 1994; Cruzana ve ark., 2000) ve rat (Amselgruber ve ark., 1994; Michetti ve ark., 1985) testislerinde seminifer tubulleri

çevreleyen peritubuler hücrelerin, boğa (Amselgruber ve ark., 1992; Amselgruber ve ark., 1994), koç (Amselgruber ve ark., 1994), manda (Cruzana ve ark., 2003) ve domuz (Amselgruber ve ark., 1994) testislerinde rete testis epitelinin ve boğa (Amselgruber ve ark., 1992; Amselgruber ve ark., 1994), koç (Amselgruber ve ark., 1994), manda (Cruzana ve ark., 2003), bizon (Czykier ve ark., 2003), domuz (Amselgruber ve ark., 1994) ve rat (Amselgruber ve ark., 1994; Michetti ve ark., 1985) testislerinde ise ven, kapillar ve lenf damarları endotellerinin S100 proteinini içerdikleri bildirilmiştir. Tavşan testisi üzerinde yapılan bu çalışmada ise, yukarıdaki araştırmacıların bulgularının aksine adı geçen testiküler yapıların hiç birisinin S100 proteinini içermediği görülmüştür. Hayvan türlerindeki farklılıklar, kullanılan antikör ve teknik farklılığından dolayı olabilir.

İnsan (Haimato ve ark., 1987; Michetti ve ark., 1985) ve fare (Cyzkier ve ark., 2000) epididimisinde duktuli eferentes ve duktus epididimis epitellerinde zayıf S100 pozitif immunreaksiyon gözlenmesine karşın sunulan bu çalışmada sözü edilen oluşumlar da immunreaksiyon gözlenmemiştir. İnsan ve hayvan testisleri üzerinde bugüne kadar yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, sunulan çalışmada belirlenen S100 immunreaksiyonun Sertoli hücreleri, modifiye Sertoli hücreleri ve düz tubulus epitel hücrelerine özgü olması nedeniyle tavşan testislerinin S100 pozitivitesi bakımından laboratuvar hayvanları (Amselgruber ve ark., 1994; Cyzkier ve ark., 2000; Ortega ve ark., 2004) primatlar (Girod ve ark., 1986; Haimato ve ark., 1987; Michetti ve ark., 1985) ve karnivorlardan (Amselgruber ve ark., 1994; Cruzana ve ark., 2000) ziyade domuz (2 Amselgruber ve ark., 1994) ve ruminant (Amselgruber ve ark., 1992, Amselgruber ve ark., 1994; Cruzana ve ark., 2003) testislerine daha benzerlik gösterdiği sonucuna varılmıştır.

S100 proteinlerinin, farklı hedef proteinlerle etkileşimlere girerek protein fosforilasyonu, immun yanıt, büyüme, farklılaşma, hücre iskeleti hareketi, enzim aktivitesi, sekresyon, apoptozis ve Ca^{2+} homeostazisi gibi çeşitli fonksiyonlarda önemli görevler aldıkları

bilinmektedir (Donato 1999; Donato 2001; Donato 2003; Heizmann ve ark., 2002; Zimmer ve ark., 1995). S100 proteininin, insan ve farklı hayvan türlerinin testislerindeki değişik hücrelerde lokalize olması (Amselgruber ve ark., 1994; Cruzana ve ark., 2000, Cruzana ve ark., 2003, Girod ve ark., 1986; Marenholz ve ark., 2006) bu proteinin multifonksiyonel olduğu görüşünü desteklemektedir.

S100 protein ailesi, hücre içi kalsiyum metabolizmasında önemli rolleri olan ve etkisini vimentin, desmin, tubulin ve p53 gibi farklı hedef proteinlerle etkileşime girerek gösteren moleküllerdir (Heizmann ve ark., 2002; McNutt 1998; Santamaria-Kisiel ve ark., 2006; Zimmer ve ark., 1995; Zimmer ve ark., 2003). Bununla birlikte S100 proteinlerinin testisteki fonksiyonları kesin olarak aydınlatılamamıştır. Ancak, bazı araştırmacılar (Amselgruber ve ark., 1992; Amselgruber ve ark., 1994; Cruzana ve ark., 2003) S100 proteinin Sertoli hücrelerinde özellikle hücre morfolojisinin düzenlenmesi ile ilişkili olduğunu düşünmektedirler. S100 proteinlerinin mikrotubuluslar, intermediyer filamanlar ve mikrofilamanlar gibi hücre iskeletini oluşturan yapılarla direkt veya indirekt ilişki içinde bulunması (Donato 1999; Donato 2001) ve Sertoli hücrelerinin gelişmekte olan germ hücrelerini destekleme ve koruma fonksiyonlarının sürdürülebilmesi için değişkenlik gösterebilen bir hücre iskeletine sahip olması (Griswold 1998) bu araştırmacıların görüşlerini desteklemektedir. Bununla birlikte, S100 proteinlerinin seminifer tubüllerde kan-testis bariyerinin oluşturulması, intratestikular kanal sisteminde ise sekresyon ve absorpsiyon gibi fonksiyonlarda rollerinin olabileceği de bildirilmiştir (Amselgruber ve ark., 1994; Cruzana ve ark., 2003).

Beyin, göz, ovaryum, adrenal korteks, gebe uterus desiduası ve plasentanın fõtal yarımı gibi bazı dokular ve organlar immunolojik açıdan özel yapılar olarak bilinmektedir (Schuppe ve Meinhardt 2005). Belirgin lenf drenajına sahip olmamaları ve otoantijenlere karşı immun reaksiyon göstermemeleri nedeniyle bu organlar immunolojik açıdan özel yapılar olarak

tanımlanmışlardır (Fijak ve Meinhardt 2006). Bununla birlikte, testis yapısında çok sayıda lenf sinuzoidleri içermesine karşın, immunolojik açıdan özel organlar grubuna dahil edilmiştir. Kendi ürettiği germ hücrelerine karşı bir immun yanıt oluşturmada bir tolerans geliştirmesi testise bu özelliği kazandırmıştır (Filippini ve ark., 2001). Bu fonksiyonun gerçekleştirmesinde Sertoli hücreleri ve peritubüler hücreler tarafından oluşturulan kan-testis bariyerinin yanı sıra makrofajların önemli rolleri olduğu görülmüştür (Cohen ve ark., 1999; Fijak ve Meinhardt 2006; Schuppe ve Meinhardt 2005). Özellikle insan, fare ve sıçan testisleri üzerinde testiküler makrofajların yapısı ve fonksiyonlarıyla ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır (Bryniarski ve ark., 2004; Bryniarski ve ark., 2005; Giannesi ve ark., 2005; Meinhardt ve ark., 1998; Pöllanen ve Maddocks 1988). Buna karşın, tavşan testis ve epididimisinde makrofajların varlığı ve dağılımlarıyla ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Anti-RAM11 primer antikoru yardımıyla makrofajların erişkin tavşan testis ve epididimislerindeki varlığı ve lokalizasyonları immunohistokimyasal olarak ilk defa bu çalışmayla ortaya konulmuştur.

Testiküler makrofajlar, diğer organların bağ dokularında lokalize olan makrofajların genel özelliklerine sahip olmakla birlikte, testise spesifik fonksiyonlara da sahiptirler (Cohen ve ark., 1999; Gaytan ve ark., 1995; Hutson 1990; Rival ve ark., 2008). Özellikle, sıçan ve fare testisleri üzerinde yapılan araştırmalar testiküler makrofajların Leydig hücre gelişimi ve erişkinlerde steroidogeneziste önemli rol oynadığını göstermiştir. Elektron mikroskopik gözlemler sonucunda, Leydig hücreleri ve makrofajlar arasında parmak benzeri sitoplazmik bağlantıların olduğu tespit edilmiştir. Bu durum iki hücre arasında yakın fonksiyonel bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur (Hutson 1992; Hutson 2006). Testiküler makrofajların sayısı ve gelişimi direkt Leydig hücre aracılı mekanizmalarla ayarlanmaktadır (Bryniarski ve ark., 2004). Makrofajların Leydig hücreleriyle etkileşimleri yanında, salgıladıkları bazı mediyatörler aracılığıyla Sertoli hücre fonksiyonları ve spermatogenezis üzerinde de etkili

olabildikleri anlaşılmıştır (Hedger ve Meinhardt 2003; Hutson 1994). Araştırmalar, testiküler makrofajların Leydig hücrelerinin steroidogenik fonksiyonları üzerinde direkt uyarıcı etkisi olan 25-hidroksikolesterolü sentezledikleri ve salgıladıklarını ortaya koymuştur (Hales 2002; Hutson 2006; Zirkin ve Chen 2000). Testiküler makrofajların ayrıca tümör nekrozis faktör- α (TNF- α), interlökin-1 α (IL-1 α) ve interlökin-1 β (IL-1 β) sitokinlerini sentezledikleri belirlenmiştir. Bu sitokinlerin, Leydig hücrelerinde steroidogenezis üzerinde düzenleyici etkilerinin olduğu tespit edilmiştir (Hedger ve Meinhardt 2003, Kern ve ark., 1995; Lysiak 2004; Suescun ve ark., 2003). Bununla birlikte, TNF- α Sertoli hücrelerinde gelişim faktörlerinin ekspresyonunu ve germ hücreleri için önemli metabolitlerin üretiminin arttırılmasında rol oynadığı bildirilmiştir (Xiong ve Hales 1993). IL-1'in ise Sertoli hücrelerinde nitrik oksit, gama glutamil transpeptidaz ve laktat üretimini düzenlediği bilinmektedir (Hedger ve Meinhardt 2003, Weissman ve ark., 2005). Bunların yanı sıra, testiküler makrofajların, Leydig hücre fonksiyonlarını önleyen hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerini (ROS) de ürettiği belirlenmiştir (Hales 2002). Sunulan çalışma, koç (Pöllanen ve Maddocks 1998) ve kemirgenlerin (Gaytan ve ark., 1994; Giannesi ve ark., 2005; Hutson 1992; Kazeem 1988; Niemi ve ark., 1986) testislerine benzer şekilde makrofajların tavşan testislerinin intersitisyumunda da yaygın bir biçimde yerleşim gösterdikleri göstermiştir. Özellikle, kemirgenlerin testisleri (Gaytan ve ark., 1994; Giannesi ve ark., 2005; Hutson 1992; Kazeem 1988; Pöllanen ve Maddocks 1988) için bildirilenlere benzer şekilde tavşan testislerinde de makrofajların Leydig hücrelerine çok yakın olarak lokalize oldukları görülmüştür. Bu iki hücre arasındaki yakın yerleşim, tavşan testiküler makrofajlarının muhtemelen diğer türlerin testislerindeki makrofajlarla benzer fonksiyonlara sahip olduğunu göstermektedir.

Erişkin testisinde, makrofajların intersitisyel dokunun önemli hücreleri olduğu ve normal durumlarda bu hücrelerin sadece intersitisyel dokuda yerleşim gösterdikleri bildirilmiştir

(Cohen ve ark., 1999; Hedger 2002). Buna karşın patolojik durumlarda ve mevsimsel üreyen hayvanların regresyona uğramış testislerinde makrofajların germinal hücre katmanına girebileceği görülmüştür (Gaytan ve ark., 1994; Yee ve Hutson 1983). Farklı etiyojilere bağlı olarak spermatozisinde hasar oluşmuş insan testislerinde ise tubül epiteli içerisindeki CD68 pozitif makrofajların sayısında artış tespit edilmiştir (Niemi ve ark., 1986). Sunulan çalışmada, bazı seminifer tubül epiteli içerisinde az sayıda RAM11 pozitif makrofajlara rastlanılmıştır. Bu durum, hasar görmüş germ hücrelerinin veya Sertoli hücrelerinin ortadan kaldırılması için makrofajların seminifer tubül epitelleri içerisine girmesi şeklinde açıklanabilir.

Sunulan çalışmada sıçan ve insan epididimisine (Marchlewicz 2001) benzer olarak tavşanların kaput, korpus ve kauda epididimislerinde intersitisyel dokuda ve kanal epitelleri içerisinde çok sayıda intraepitelyal RAM11 pozitif makrofajlara rastlanılmıştır. İntraepitelyal makrofajların, kan-epididimis bariyerine destek olduğu ve denatüre olmuş spermatozonların ortadan kaldırılmasında rol oynadığı düşünülmektedir (Kazeem 1988; Marchlewicz 2001; Serre ve Robaire 1999).

Lis ve ark., (2007) yaptıkları bir araştırmada, tavşanların deri, oral mukoza ve özafagusunun çok katlı epitelinin bazal hücre katmanındaki hücrelerin bir makrofaj proteini olan RAM11 için üretilmiş antikorlarla pozitif reaksiyon verdiklerini saptamışlardır. Sunulan araştırmada, bu araştırmacıların bulgularına (Lis ve ark., 2007) benzer olarak duktuli eferentislerin epitelinde özellikle siliyalı hücrelerde RAM11 pozitif immunreaktivite belirlenmiştir. Bu durum, siliyalı hücrelerin sitoplazmalarında RAM11 proteinini veya anti-RAM11 primer antikoruyla çapraz reaksiyon veren başka bir molekülü içerdiğini göstermektedir.

Sunulan çalışmada, Sertoli hücrelerinin vimentin intermediyer filamanlarını içermesi sitokeratin 18 intermediyer filamanını ise içermemesi, bu hücrelerin olgunlaşmalarını tamamladıklarını göstermiştir. Sertoli hücrelerinde vimentin ekspresyonu, seminifer

tubüllerdeki spermatojenik safhalara göre değişmektedir. Epididimiste, duktuli eferentis ve duktus epididimis epitellerindeki hücrelerin sitokeratinlerden sadece sitokeratin 8'i içerdikleri anlaşılmıştır. Sonuç olarak, Sertoli hücreleri, Leydig hücreleri, tubulus rektus ile rete testis epitellerindeki hücreler ile damar endotel hücrelerinin vimentin intermediyer filamanlarını içermesi, tavşan testislerinde bu yapıların mezenşimal kökenli olduğunun belirtisidir. Ayrıca, α -SMA ve desminin aynı hücresel yapılarda bulunması, spermatozoanların ve testiküler sıvının rete testis ve epididimise doğru taşınması ve duktus epididimis boyunca spermin geçişinde bu iki proteinin birlikte görev yaptığını göstermektedir.

Sunulan çalışmayla, insan, rat, fare ve geyik testislerindeki benzer şekilde tavşan testislerinde de VEGF'nin varlığının belirlenmesi bu proteinin testis fizyolojisinde ne kadar önemli olabileceğinin bir göstergesidir.

Bu çalışmada, S100 proteininin pre-pubertal ve pubertal tavşanların testis dokusundaki varlığı ve hücresel lokalizasyonu immunohistokimyasal olarak ortaya konmuştur. Multifonksiyonel özellikteki S100 proteinin, Ankara tavşanı testislerindeki hücresel lokalizasyonunun laboratuvar hayvanları, primatlar ve karnivorlardan çok domuz ve ruminant testislerine benzerlik gösterdiği sonucuna varılmıştır.

Sunulan çalışmayla, tavşan testis ve epididimisinde yerleşim gösteren makrofajların RAM11 proteinini içerdiği, özellikle insan makrofajlarında varlığı bildirilen CD68 molekülünü ise içermediği anlaşılmıştır. Makrofajlar, tavşan testis ve epididimisinin intersitisyumunda yaygın bir biçimde yerleşim göstermektedir. Tavşan testis ve epididimisinde belirlenen RAM11 pozitif makrofajlar muhtemelen insan ve kemirgenlerin testis ve epididimislerindeki makrofajlarla benzer hücresel fonksiyonlara sahiptirler.

Yapılan çalışmada, çalışma öncesi hedeflenen tüm amaçlara ulaşılmıştır. Tavşan testis ve epididimislerinde lokalize olan proteinlerin immunhistokimyasal demonstrasyonu için kullanılan primer antikorlar dokulara Strept ABC yöntemi kullanılarak uygulanmış ve başarılı

sonuçlar alınmıştır. Elde edilen bu sonuçların tümü tavşan testisleri için bir ilk niteliğindedir. Bu çalışmadan elde edilen bulgular, tavşan testisleri üzerinde ileride yapılacak tüm histolojik, fizyolojik, immunolojik ve patolojik çalışmalara ışık tutacaktır.

KAYNAKLAR

Abd-Elmaksud A, 2005. Morphological, glycohistochemical, and immunohistochemical studies on the embryonic and adult bovine testis. A thesis submitted for the Doctor Degree in Veterinary Medicine Faculty of Veterinary Medicine. Ludwig-Maximilians-Universitat, Munchen.

Aire TA, Ozegebe PC, 2008. Immunohistochemistry of the cytoskeleton in the excurrent ducts of the testis of the Galloanserae monophyly. *Cell Tissue Res*, 333: 311-321.

Almahbobi G, Williams LJ, Han XG, Hall PF, 1993. Binding of lipid droplets and mitochondria to intermediate filaments in rat Leydig cells. *J Reprod Fertil*, 98(1): 209-217.

Amselgruber W, Sinowatz F, Schams D, Lehmann M, 1992. S-100 protein immunoreactivity in bovine testis. *Andrologia*, 24: 231-235.

Amselgruber W, Sinowatz F, Erhard M, 1994. Differential distribution of immunoreactive S-100 protein in mammalian testis. *Histochemistry*, 102: 241-245.

Arenas MI, Bethencourt FR, De Miguel MP, Fraile B, Romo E, Paniagua R, 1997. Immunohistochemical and quantitative study of actin, desmin, vimentin in the peritubular cells of the testes from elderly men. *J Reprod Fertil*, 110(1): 183-193.

Ariyaratne S, Mendis-Handagama C, 2000. Changes in the testis interstitium of sprague dawleys rats from birth to sexual maturity. *Biol Reproductio*., 62: 680-690.

Aumüller G, Steinbrck M, Krause W, Wagner HJ, 1988. Distribution of vimentin-type intermediate filaments in Sertoli cells of human testis, normal and pathologic. *Anat Embryol*, 178(2): 129-136.

- Aumüller G, Schulze C, Viebahn C, 1992. Intermediate filaments in Sertoli cells. *Microsc Rec Tech*, 20(1): 50-72.
- Bates DO, Hillman NJ, Williams B, Neal CR, Pocock TM, 2002. Regulation of microvascular permability by vascular endothelial growth factors. *J Anat*, 200: 581-597.
- Berndtson WE, Igboeli G, Pickett BW, 1987. Relationship of absolute numbers of Sertoli cells to testicular size and spermatogenesis in young beef bulls. *J Anim Sci*, 64: 241-246.
- Bock E, 1978. Nervous system spesific proteins. *J Neurochem*, 30(1): 7-14.
- Borg CL, Wolski KM, Gibbs GM, O'Bryan MK, 2009. Phenotyping male infertility in the mouse: how to get the most out of a 'non-performer'. *Hum Reprod Update*, 1: 1-20.
- Breen EC, 2007. VEGF in biological control. *J Cellular Biochemist*, 102: 1358-1367.
- Bryniarski K, Szczepanik M, Maresz K, Ptak M, Ptak W, 2004. Subpopulations of mouse testicular macrophages and their immunoregulatory function. *AJRI*, 52: 27-35.
- Bryniarski K, Szczepanik M, Ptak M, Wlodzimierz P, 2005. Modulation of testicular macrophage activity by collagenase. *Folia Histochem Cytobiol*, 43(1): 37-41.
- Christl HW, 1990. The lamina propria of vertebrate seminiferous tubules: a comparative light and electron microcopic investigation. *Andrologia*, 22: 85-94.
- Cohen PE, Nishimura K, Zhu L, Pollard JW, 1999. Macrophages: important accessory cells for reproductive function. *J Leukoc Biol*, 66: 765-772.
- Cruzana BC, Hondo E, Kitamura N, Matsuzaki S, Nakagawa M, Yamada J, 2000. Differential localization of immunoreactive α - and β -subunits of S-100 protein in feline testis. *Anat Histol Embryol*, 29(2): 83-86.
- Cruzana BC, Budipitojo T, De Ocampo G, Sasaki M, Kitamura N, Yamada J, 2003. Immunohistochemical distribution of S-100 protein and subunits (S100- α and S100- β) in the swamp-type water buffalo (*Bubalus bubalis*) testis. *Andrologia*, 35(3): 142-145.

- Czykier E, Sawicki B, Zabel M, 1999. Immunohistochemical localization of S-100 protein in the European bison testis and epididymis. *Folia Histochem Cytobiol*, 37(2): 83-84.
- Czykier E, Sawicki B, Zabel M, 2000. S-100 protein immunoreactivity in mammalian testis and epididymis. *Folia Histochem Cytobiol*, 38(4): 163-166.
- Çakır A, Bozkurt EÜ, Düzler A, 2001. Tavşan, kobay ve sıçanda testisin şekli, konumu ve testis epididymis ilişkisi. *Ankara Ünv. Vet. Fak. Derg*, 48: 129-132.
- Danahey DG, Wu JC, Lin LH, DePhilip RM, 1995. A monoclonal antibody identifies vimentin filaments in Sertoli cells and in a subset of epithelial cells in the rat epididymis, urinary bladder, and prostate. *J Urol*, 154(6): 2190-2196.
- Davidoff MS, Breucker H, Holstein AF, Seidl K, 1990. Cellular architecture of lamina propria of human seminiferous tubules. *Cell Tissue Res*, 262: 253-261.
- De Miguel MP, Bethencourt FR, Arenas MI, Fraile B, Paniagua R, 1997. Intermediate filaments in the Sertoli cells of ageing human testis. *Virchows Arch*, 431: 131-138.
- Devkato B, Sasaki M, Takahashi K, Matsuzaki S, Matsui M, Haneda S, Takahashi M, Osawa T, Miyake Y, 2006. Postnatal developmental changes in immunohistochemical localization of α -smooth muscle actin (SMA) and vimentin in bovine testis. *J Reprod Dev*, 52: 43-49.
- Devkato B, Sasaki M, Matsui M, Montoya CA, Miyake Y, 2006. Alteration in the immunohistochemical localization patterns of α -smooth muscle actin (SMA) and vimentin in the postnatally developing bovine cryptorchid testis. *J Reprod Dev*, 52: 329-334.
- Dinges HP, Zatloukal K, Schmid C, Mair S, Wirnberger G, 1991. Co-expression of cytokeratin and vimentin filaments in rete testis and epididymidis. An immunohistochemical study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 418(2): 119-127.
- Donato R, 1999. Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *BBA*, 1450(3): 191-231.
- Donato R, 2001. S100. a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand

type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol*, 33(7): 637-668.

Donato R, 2003. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech*, 60(6): 540-551.

Dym M, 1994. Basement membrane regulation of Sertoli cells. *Endocrin Rev*, 15: 102-105.

Ergun A, Kilic N, Fiedler W, Mukhopadhyay AK, 1997. Vascular endothelial growth factor and its receptors in normal human testicular tissue. *Mol Cell Endocrinol*, 131: 9-20.

Fawcett DW, Neaves WB, Flores MN, 1973. Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biol. Reprod*, 9: 500-532.

Fijak M, Meinhardt A, 2006. The testis in immune privilege. *Immunol Rev*, 213: 66-81.

Filippini A, Riccioli A, Padula F, Lauretti P, D'Alessio A, De Cesaris P, Gandini L, Lenzi A, Ziparo E, 2001. Immunology and immunopathology of the male genital tract: control and impairment of immune privilege in the testis and semen. *Hum Reprod Update*, 7(5): 444-449.

Franke WW, Grund C, Schmid E, 1979. Intermediate-sized filaments present in Sertoli cells are the vimentin. *Eur J Cell Biol*, 19(3): 269-275.

Franke FE, Paulus K, Rey R, Marks A, Bergmann M, Steger K, 2004. Differentiation markers of Sertoli cells and germ cells in fetal and early postnatal human testis. *Anat Embryol*, 209: 169-177.

Frenette G, Legare C, Saez F, Sullivan R, 2005. Macrophage migration inhibitory factor in the human epididymis and semen. *Mol Hum Reprod*, 11(8): 575-582.

Gaytan F, Bellido C, Aguilar E, van Rooijen N, 1994. Requirement for testicular macrophages in Leydig cell proliferation and differentiation during prepubertal development in rats. *J Reprod Fertil*, 102: 393-399.

- Gaytan F, Bellido C, Morales C, Reymundo C, Aguilar E, van Rooijen N, 1995. Response to Leydig cell apoptosis in the absence of testicular macrophages. *J Reprod Immunol*, 29(1): 81-94.
- Giannessi F, Giambelluca MA, Scavuzzo MC, Ruffoli R, 2005. Ultrastructure of testicular macrophages in aging mice. *J Morphol*, 263: 39-46.
- Girod C, Durand N, Raccurt M, 1986. A comparative study of immunocytochemical localization of S-100 protein in the monkey (*Macaca irus*) and albino rat testis. *Biomed Res*, 7: 333-337.
- Griswold MD, 1998. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Sem Cell Dev Biol*, 9(4): 411-416.
- Gondos B, Renston RH, Goldstein DA, 1976. Postnatal differentiation of Leydig cells in the rabbit testis. *Am J Anat*, 145: 167-181.
- Gondos B, Morrison KP, Renston RH, 1977. Leydig cell differentiation in the prepubertal rabbit testis. *Biol Reprod*, 17: 745-748.
- Ergün S, Kiliç N, Fiedler W, Mukhopadhyay, 1997. Vascular endothelial growth factor and its receptors in normal human testicular tissue. *Mol Cell Endocrinol*, 131: 9-20.
- Haimato H, Hosoda S, Kato K, 1987. Differential distribution of immunoreactive S100- α and S100- β proteins in normal nonnervous human tissues. *Lab Invest*, 57(5): 489-498.
- Hall PF, 1997. The roles of calmodulin, actin, and vimentin in steroids synthesis by adrenal cells. *Steroids*, 62: 185-189.
- Hall PF, Almahbobi G, 1997. Roles of microfilaments and intermediate filaments in adrenal steroidogenesis. *Microsc Res Tech*, 36: 463-479.
- Hales DB, 2002. Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. *J Reprod Immunol*, 57: 3-18.

- Hedger MP, 2002. Macrophages and the immune responsiveness of the testis. *J Reprod Immunol*, 57: 19-34.
- Hedger MP, Meinhardt A, 2003. Cytokines and the immune-testicular axis. *J Reprod Immunol*, 58: 1-26.
- Heizmann CW, Cox J, 1998. A new perspectives on S100 proteins: a multi-functional Ca^{2+} , Zn^{2+} and Cu^{2+} binding protein family. *BioMetals*, 11: 383-397.
- Heizmann CW, Fritz G, Schafer BW, 2002. S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front Biosci*, 1(7): 1356-1368.
- Herrmann H, Bar H, Kreplak L, Strelkov SV, Aebi U, 2007. Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nature Rev*, 8: 562-573.
- Herrmann H, Strelkov SV, Burkhard P, Aebi U, 2009. Intermediate filaments: primary determinants of cell architecture and plasticity. *J Clin Invest*, 119(7): 1772-1783.
- Holt WV, Waller J, Moore A, Jepson PD, Deaville R, Bennett PM, 2004. Smooth muscle actin and vimentin as markers of testis development in the harbour porpoise (*Phocoena phocoena*). *J Anat*, 205: 201-211.
- Huerkamp MJ, 2003. The rabbit. In: B. Ballard R. Cheek (1st Ed), Exotic Animal Medicine for the Veterinary Technician. Iowa State Press, Ames, Iowa, pp 192-196.
- Hutson JC, 1990. Changes in the concentration and size of testicular macrophages during development. *Biol Reprod*, 43: 885-890.
- Hutson JC, 1992. Development of cytoplasmic digitations between Leydig cells and testicular macrophages of the rat. *Cell Tissue Res*, 267: 385-389.
- Hutson JC, 1994. Testicular macrophages. *Int Rev Cytol*, 149: 99-143.
- Hutson JC, 2006. Physiologic interactions between macrophages and Leydig cells. *Exp Biol Med*, 231(1): 1-7.
- Ivaska J, Pallari H-M, Nevo J, Eriksson JE, 2007. Novel functions of vimentin in cell

adhesion, migration, and signaling. *Exp Cell Res*, 313: 2050-2062.

Kagi U, Chafoullas JG, Norman AW, Heizmann CW, 1988. Developmental appearance of the Ca^{2+} -binding proteins parvalbumin, calbindin, D-28K, S-100 proteins and calmodulin during testicular development in the rat. *Cell Tissue Res*, 252(2): 359-365.

Kasper M, Stosiek P, 1989. Immunohistochemical investigation of different cytokeratins and vimentin in the human epididymis from the fetal period up to adulthood. *Cell Tissue Res*, 257(3): 661-664.

Kazeem AA, 1988. A critical consideration of the rat epididymis as an immunologically privileged site. *Scand J Immunol*, 27: 149-156.

Kern S, Robertson SA, Mau VJ, Maddocks S, 1995. Cytokine secretion by macrophages in the rat testis. *Biol Reprod*, 53: 1407-1416.

Kierszenbaum AL, 2006. Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Demir R. Çeviri editörü, Palme yayıncılık. s. 552-554.

Kleinman HK, Cannon FB, Laurie GW, Hassel JR, Aumailley M, Terranova VP, Martin GR, DuBois-Dacq M, 1985. Biological activities of laminin. *J Cell Biochem*, 27: 317-325.

Komatsu T, Yamamoto Y, Atoji Y, Tsubota T, Suzuki Y, 1998. Immunohistochemical demonstration of cytoskeletal proteins in the testis of the Japanese Black Bear, *Ursus thibetanus japonicus*. *Anat Histol Embryol*, 27: 209-213.

Kopecky M, Semecky V, Nachtigal P, 2005. Vimentin expression during altered spermatogenesis in rats. *Acta Histochem*, 107: 279-289.

Lis GJ, Litwin JA, Furgal-Borzych A, Zarzecka J, Cichocki, T, 2007. Macrophage-specific RAM-11 monoclonal antibody cross-reacts with basal cells of stratified squamous epithelia. *Folia Histochem Cytobiol*, 45(3): 229-232.

Leeson CR, Forman DE, 1981. Postnatal development and differentiation of contractile cells within the rabbit testis. *J Anat*, 132: 491-511.

- Lysiak JL, 2004. The role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 in the mammalian testis and their involvement in testicular torsion and autoimmune orchitis. *Reprod Biol Endocrinol*, 2: 9-18.
- Maddocks S, Setchell BB, 1988. The physiology of the endocrine testis. *Oxford Rev Reprod Biol*, 10: 53-123.
- Maekawa M, Kazama H, Kamimura K, Nagano T, 1995. Changes in the arrangement of actin filaments in myoid cells and Sertoli cells of rat testes during postnatal development and after experimental cryptorchidism. *Anat Rec*, 241(1): 59-69.
- Maekawa M, Kamimura K, Nagano T, 1996. Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function. *Arch Histol Cytol*, 59(1): 1-13.
- Maharaj ASR, Saint-Geniez, Maldonado AE, D'Amore PA, 2006. Vascular endothelial growth factor localization in the adult. *Am J Pathol*, 168(2): 639-648.
- Maharaj ASR, D'Amore PA, 2007. Roles for VEGF in the adult. *Microvascular Res*, 74: 100-113.
- Marenholz I, Lovering RC, Heizmann CW, 2006. An update of the S100 nomenclature. *BBA*, 1763(11): 1282-1283.
22. Marchlewicz M, 2001. Localization of immunocompetent cells in the human epididymis. *Folia Histochem Cytobiol*, 39(2): 173-174.
- Maretta M, Marettova E, 2004. Immunohistochemical demonstration of myoid cells in the testis and its excurrent ducts in the domestic fowl. *British Poult Sci*, 45(5): 585-589.
- Maymon B-S, Paz G, Elliott DJ, Hammel I, Kleiman SE, Yogev L, Hauser R, Botchan A, Yavetz H, 2000. Maturation phenotype of Sertoli cells in the testicular biopsies of azoospermic men. *Human Reprod*, 15(7): 1537-1542.
- Maymon B-S, Yavetz H, Schreiber L, Paz G, 2002. Immunohistochemistry in the evaluation of spermatogenesis and Sertoli cell's maturation status. *Clin Chem Lab Med*, 40(3): 217-220.

- Meinhardt A, Bacher M, Metz C, Bucala R, Wreford N, Lan H, Atkins R, Hedger M, 1998. Local regulation of macrophage subsets in the adult rat testis: examination of the roles of the seminiferous tubules, testosterone, and macrophage-migration inhibitory factor. *Biol Reprod*, 59: 371-378.
- McNutt NS, 1998. S100 family of multipurpose calcium-binding proteins. *J Cutan Pathol*, 25(10): 521-529.
- Michetti F, Lauriola L, Rende M, Stolfi VM, Battaglia F, Cocchia D, 1985. S-100 protein in the testis: An immunochemical and immunohistochemical study. *Cell Tissue Res*, 240(1): 137-142.
- Miettinen M, Virtanen I, Talerman A, 1985. Intermediate filaments proteins in human testis and testicular germ-cell tumors. *Am J Pathol*, 120: 402-410.
- Moore B, 1965. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun*, 19(6): 739-744.
- Nalbandian A, Dettin L, Dym M, Ravindranth N, 2003. Expression of vascular endothelial growth factor receptors during male germ cell differentiation in the mouse. *Biol Reprod*, 69: 985-994.
- Nashan D, Malorny U, Sorg C, Cooper T, Nieschlag E, 1989. Immuno-competent cells in the murine epididymis. *Int J Androl*, 12(1): 85-94.
- Niemi M, Sharpe RM, Brown WRA, 1986. Macrophages in the interstitial tissue of the rat testis. *Cell Tissue Res*, 243: 337-344.
- Obermair A, Obruca A, Pöhl M, Kaider A, Vales A, Leodolter S, Wojta J, Feichtinger, 1999. Vascular endothelial growth factor and its receptors in male fertility. *Fertility and Sterility*, 72(2): 269-275.

- Ortega HH, Lorente JA, Salvetti NR, 2004. Immunohistochemical study of intermediate filaments and neuroendocrine marker expression in Leydig cells of laboratory rodents. *Anat Histol Embryol*, 33: 309-315.
- Osman DI, 1979. A comparative ultrastructural study on typical and modified Sertoli cells before and after ligation of the efferent ductules in the rabbit. *Anat Histol Embryol*, 8(2): 114-123.
- Palacios J, Regadera J, Paniagua R, Gamallo C, Nistal M, 1993. Immunohistochemistry of the human ductus epididymis. *Anat Rec*, 235(4): 560-566.
- Paranko J, Pelliniemi LJ, 1992. Differentiation of smooth muscle cells in fetal rat testis and ovary: localization of alkaline phosphatase, smooth muscle myosin, F-actin, and desmin. *Cell Tissue Res*, 268: 521-530.
- Petrova TV, Makinen T, Alitalo K, 1999. Signalling via vascular endothelial growth factor receptors. *Experimental Cell Res*, 253: 117-130.
- Pöllänen P, Maddocks S, 1988: Macrophages, lymphocytes and MHC II antigen in the ram and the rat testis. *J Reprod Fert*, 82: 437-445.
- Regadera J, Palacios J, Martin-Cordova C, Nistal M, Cobo P, Paniagua R, 1993. Enzymohistochemical and immunohistochemical study of the human efferent ducts. *Int J Androl*, 16(5): 315-323.
- Reisinger K, Baal N, McKinnon, Münstedt K, Zygmunt M, 2007. The gonadotrophins: Tissue-specific angiogenic factors? *Mol Cell Endocrinol*, 269: 65-80.
- Rival C, Theas MS, Suescun MO, Jacobo P, Guazzone V, van Rooijen N, Lustig L, 2008. Functional and phenotypic characteristics of testicular macrophages in experimental autoimmune orchitis. *J Pathol*, 215: 108-117.

Rodriguez A, Rojas MA, Bustos-Obregon E, Urquieta B, Regadera J, 1999. Distribution of keratins, vimentin, and actin in the testis of two south American camelids: Vicuna (*Vicugna vicugna*) and Llama (*Lama glama*). An immunohistochemical study. *Anat Rec*, 254: 330-335.

Rogatsch H, Jezek D, Hittmair A, Mikuz G, Feichtinger H, 1996. Expression of vimentin, cytokeratin, and desmin in sertoli cells of human fetal, cryptorchid, and tumour-adjacent testicular cells. *Virchows Arch*, 427(5): 497-502.

Santamaria-Kisiel L, Rintala-Dempsey AC, Shaw GS, 2006. Calcium dependent and – independent interactions of the S100 protein family. *Biochem J*, 396: 201-214.

Sasaki M, Yamamoto M, Arishima K, Eguchi Y, 1998. Effects of follicle-stimulating hormone on intermediate filaments and cell division of Sertoli cells of fetal rat testis in culture. *J Vet Med Sci*, 60(1): 35-39.

Schlatt S, Weinbauer GF, Arslan M, Nieschlag E, 1993. Appearance of alpha-smooth muscle actin in peritubular cells of monkey testes induced by androgens, modulated by follicle-stimulating hormone, and maintained after hormonal withdrawal. *J Androl*, 14: 340-350.

Schön J, Blottner S, Gabler C, Fickel J, 2010. Vascular endothelial growth factor A is a putative paracrine regulator in seasonally controlled spermatogenesis: Insights from a ruminant model, the roe deer. *Growth Factors*, 1-9.

Schuppe HC, Meinhardt A, 2005. Immune privilege and inflammation of the testis. *Chem. Immunol Allergy*, 88: 1-14.

Serre V, Robaire B, 1999. Distribution of immune cells in the epididymis of the aging Brown Norway rat is segment-specific and related to the luminal content. *Biol Reprod*, 61: 705-714.

Suescun MO, Rival C, Theas MS, Calandra RS, Lustig L, 2003. Involvement of tumor necrosis factor- α in the pathogenesis of autoimmune orchitis in rats. *Biol Reprod*, 68: 2114-2121.

- Steger K, Wrobel K-H, 1994. Immunohistochemical demonstration of cytoskeletal proteins in the ovine testis during postnatal development. *Anat Embryol*, 189(6): 521-530.
- Steger K, Schimmel M, Wrobel K-H, 1994. Immunohistochemical demonstration of cytoskeletal proteins in seminiferous tubules of adult rams and bulls. *Arch Histol Cytol*, 57(1): 17-28.
- Sugimura M, Miura M, Suzuki Y, Atoji Y, 1989. S-100 immunoreactive cells in non-nervous duck tissues. *Avian Pathol*, 18(3): 503-510.
- Swierstra EE, Foote RH, 1963. Cytology and kinetics of spermatogenesis in the rabbit. *J Reprod Fertil*, 5: 309-322.
- Tjwa M, Aernout L, Autiero M, Carmaliet P, 2003. VEGF and PlGF: two pleiotrophic growth factors with distinct roles in development and homeostasis. *Cell Tissue Res*, 314: 5-14.
- Xiong Y, Hales DB, 1993. The role of tumor necrosis factor- α in the regulation of mouse Leydig cell steroidogenesis. *Endocrinology*, 132: 2438-2444.
- Veikkola T, Alitalo K, 1999. VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol*, 9: 211-220.
- Verhoeven G, Hoeber E, De Gendt K, 2000. Peritubular cell-Sertoli cell interaction: factors involved in PmodS activity. *Andrologia*, 32: 41-64.
- Virtanen I, Kallojoki M, Narvanen O, Paranko J, Thornell LE, Miettinen M, Lehto VP, 1986. Peritubular myoid cells of human and rat testis are smooth muscle cells that contain desmin-type intermediate filaments. *Anat Rec*, 215(1): 10-20.
- Von Vorstenbosch CJ, Colenbrander B, Wensing CJ, Ramaekers FC, Vooijs GP, 1984. Cytoplasmic filaments in fetal and neonatal pig testis. *Eur J Cell Biol*, 34: 292-299.
- Wakui S, Furusato M, Shinichiro U, Kano Y, 1994. Coexpression of different cytokeratins, vimentin and desmin in the rete testis and epididymis in the dog. *J Anat*, 184: 147-151.

- Weissman BA, Niu E, Ge R, Sottas CM, Holmes M, Hutson JC, Hardy MP, 2005. Paracrine modulation of androgen synthesis in rat Leydig cells by nitric oxide. *J Androl*, 26(3): 369-378.
- Wrobel KH, Bickel D, Kujat R, 1995. Distribution pattern of F-actin, vimentin and alpha-tubulin in the bovine testis during postnatal development. *Acta Anat*, 153(4): 263-272.
- Wrobel KH, 1998. Male reproductive system. In Delmann H.D., Eurell J.A.(Eds). Textbook of Veterinary Histology 5th Ed. Williams and Wilkins, Pennsylvania, USA. 226-235.
- Yee JB, Hutson JC, 1983. Testicular macrophages: isolation, characterization and hormonal responsiveness. *Biol Reprod*, 29: 1319-1326.
- Zhu L-J, Zong S-H, Phillips DM, Moo-Young AJ, Bardin W, 1997. Changes in the distribution of intermediate filaments in rat Sertoli cells during the seminiferous epithelium cycle and postnatal development. *Anat Rec*, 248: 391-405.
- Zimmer DB, Cornwall EH, Landar A, Song W, 1995. The S100 protein family: history, function and expression. *Brain Res Bull*, 37(4): 417-429.
- Zimmer DB, Sadosky PW, Weber DJ, 2003. Molecular mechanism of S100-target protein interactions. *Microsc Res Tech*, 60(6): 552-559.
- Zirkin BR, Chen H, 2000. Regulation of Leydig cell steroidogenic function during aging. *Biol Reprod*, 63: 977-981.