

Postnatal gelişme döneminde sıçan kaput epididimisindeki androjen reseptörün immunohistokimyasal lokalizasyonu

Immunohistochemical localization of androgen receptor in rat caput epididymis during postnatal development

Fatih Mehmet Gür¹, Sema Timurkaan²

¹ Sabiha Gökçe Havalimanı Veteriner Sınır Kontrol Noktası Müdürlüğü, İstanbul, Türkiye

² Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı postnatal süreçte kaput epididimisteki androjen reseptör (AR)'ün gelişimsel dağılımını araştırmaktır.

Gereç ve yöntem: Bu çalışmada; rastgele seçilen üçer adet sıçan 21, 56, 90 ve 120 günlük yaşlarda diyet eter ile uyutuldu. Bunu takiben kaput epididimisler, hızlı bir şekilde vücuttan uzaklaştırılarak, Bouin solüsyonunda +4°C de 36 saat süreyle tespit edildi. Bu işlemi müteakip doku örnekleri rutin histolojik prosedürlerden geçirilerek parafine gömüldü. Parafin bloklardan mikrotomda 5µm kalınlığında poly-L-lysin kaplı lamlara alınan doku kesitlerine, immunohistokimyasal boyama öncesinde, antijen maskelenmesi problemini gidermek için, mikrodalga ışınlı "antijen retrieval" yöntemi uygulandı. İmmunohistokimyasal boyama Avidin-Biotin-Peroksidaz Kompleks (ABC) tekniği kullanılarak gerçekleştirildi.

Bulgular: İncelenen tüm yaş grubu sıçanlarda; pozitif AR immunboyanma, epididimal hücrelerin sadece çekirdeklerinde gözlemlendi. AR pozitif hücrelerdeki boyanma yoğunluğu yaşa bağlı olarak değişim göstermedi. Kaput epididimiste pozitif AR immunboyanma; tubuler epitel hücreler (esas hücreler, bazal hücreler ve apikal hücreler) ve peritubuler düz kas hücrelerinde görüldü. Epitel hücrelerdeki boyanma yoğunluğu düz kas hücrelerine göre daha belirgindi. Epitel dokuda ise, esas hücrelerdeki boyanma yoğunluğu bazal ve apikal hücrelere göre daha güçlüydü.

Sonuç: Epididimal hücrelerdeki AR yoğunluğunun, yaşa bağlı olarak değişmediği bulgusu; androjenin epididimisin postnatal farklılaşması ve epitel dokusunun yapısının korunabilmesi için gerekli olduğunu göstermektedir. Esas hücrelerin boyanma yoğunluğunun daha güçlü olması, bu hücrelerin androjen sitümlasyonuna daha duyarlı olduğu şeklinde yorumlanabilir. *Klin Deney Ar Derg 2011; 2 (3): 260-266.*

Anahtar kelimeler: Androjen reseptör, immunohistokimya, kaput epididimis, antijen retrieval, sıçan.

ABSTRACT

Objectives: The aim of this study was to investigate the developmental pattern of androgen receptor (AR) in caput epididymis.

Materials and methods: In this study three randomly selected rats were sacrificed at ages 21, 56, 90 and 120 days old. All male rats were anesthetized with ethyl ether before killing. Then, the caput epididymides were removed and fixed in Bouin's fixative at +4°C for 36 hour. Afterwards the tissue samples were embedded in paraffin for routine histological methods. Later the tissues were sectioned at 5µm and mounted on poly-L-lysin-coated slides. To solve the antigen masking problem, we performed microwave stimulated antigen retrieval technique before the immunohistochemical staining. Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) method was applied for immunohistochemical staining.

Results: In all age groups of rats studied, positive immunohistochemical staining for the AR appeared in nuclei of epididymal cells. The staining intensity of AR positive cells did not change depending on age. In caput epididymis, immunostainable AR was found in tubular epithelial cells (principal cells, basal cells and apical cells) and peritubular smooth muscle cells. The AR staining in the epithelial cells appeared to be stronger than in the peritubular smooth muscle cells. In the epithelial cells; staining intensity was stronger in principal cells than in basal cells and apical cells.

Conclusion: Staining intensity of AR positive epididymal cells irrespective of age indicated the necessity of androgens for postnatal differentiation and maintaining the structure of the epididymis. Stronger staining intensity in principal cells suggested that principal cells are more sensitive to androgen stimulation. *J Clin Exp Invest 2011; 2 (3): 260-266.*

Key words: Androgen receptor, immunohistochemistry, epididymis, antigen retrieval, rat.

Yazışma Adresi /Correspondence: Doç. Dr. Sema Timurkaan

Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Elazığ, Eposta: stimurkaan@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received: 24.02.2011, Kabul Tarihi / Accepted: 13.06.2011

Copyright © Klinik ve Deneysel Araştırmalar Dergisi 2011, Her hakkı saklıdır / All rights reserved

GİRİŞ

Epididimis; testiste üretilen spermiyumların depolanması, protein sekresyonu ve testis orijinli sıvıların absorpsiyonu gibi fonksiyonları yerine getiren oldukça karmaşık bir organdır.¹ Histolojik olarak kaput (baş) korpus (gövde) ve kavda (kuyruk) olmak üzere üç bölümden oluşan epididimis, duktulus eferentis ve duktus epididimidis adı verilen oldukça kıvrımlı kanalcıklardan oluşur. Epididimis epiteli; esas (principal cells), bazal (basal cells), apikal (apical cells) ve berrak (clear cells, özellikle epididimisin kavda kısmında) hücrelerden oluşmuştur.¹⁻³

Yapılan çalışmalarda epididimisin prenatal ve postnatal farklılaşması ve epitel dokusunun yapısının korunabilmesi için androjenlere ihtiyaç duyulduğu ortaya konulmuştur.⁴⁻⁶ Spermiyum ileri doğru hareket ve ovumu döleme yeteneğini sperm iletim kanallarında, özellikle de epididimiste kazanır.⁷ Spermiyumların bu yetenekleri kazanmasında, epididimis epitelinin sekretorik ve emilimle ilgili fonksiyonları sonucunda oluşturulan mikro çevre önemlidir.^{7,8} Yapılan araştırmalar bu mikro çevrenin birleşenlerinden olan birçok proteinin sentez ve salgılanmasının androjene bağımlı olduğunu göstermiştir.^{9,10} Epididimise, kan yoluyla ya da testis sıvısı vasıtasıyla ulaşan androjenler, etkilerini esas olarak AR aracılığıyla gerçekleştirirler.^{11,12} Çekirdeğe özgü bir transkripsiyon faktörü olan AR, androjenle birleştiğinde DNA'ya bağlanma yeteneği kazanarak, androjene bağlı gen transkripsiyonunu sitümüle eder.^{13,14} Androjenlerin spermiyumun olgunlaşmasındaki rolleri, bilim insanlarını epididimisteki AR varlığını ve dağılımını araştırmaya yöneltmiştir. Yapılan biyokimyasal ve moleküler genetik çalışmalar sonucunda epididimal hücrelerde AR varlığı ve dağılımı ortaya konulmuştur.¹⁵⁻²⁰

Testis tarafından sentezlenen sıvıların %90'dan fazlasının duktulus eferentiste ve epididimisin başlangıç kısımlarında emildiği düşünülmektedir.^{21,22} Ayrıca koçlar üzerinde yapılan çalışmada AR'nin kaput epididimis ile korpus epididimisin başlangıç kısımlarında yoğunlaştığı ve bu bölgelerin androjen sitümülasyonuna daha duyarlı olduğu belirtilmiştir.¹⁸ Elde edilen bu bulgular androjenlerin kaput epididimis ve bünyesindeki spermiyumlar üzerindeki etkilerini göstermesi bakımından önemlidir. Erişkin dönemde epididimisteki AR dağılımını gösteren oldukça fazla literatür olmasına rağmen postnatal gelişim döneminde AR dağılımını inceleyen çalış-

malar sınırlıdır. Bu çalışmanın amacı; prepubertal ve pubertal dönemlerde epididimal hücrelerindeki AR lokalizasyonunu ve yoğunluğunu belirlemek suretiyle androjenlerin epididimisteki etkilerini araştırmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Birimi (FÜTDAM)'nden temin edilen 12 adet 15 günlük wistar cinsi erkek sıçanlardan rastgele bir seçimle üçer adet alınarak 21, 56, 90 ve 120 günlük yaşlarda eter ile uyutuldu. Kaput epididimisler hızlı bir şekilde vücuttan uzaklaştırılarak Bouin solüsyonunda +4°C de 36 saat süreyle tespit edildi. Bu işlemi müteakip dokular %50, 70, 80, 96I, 96II, 100I, 100II'lik alkol serilerinden ve xylol den geçirilip parafine gömüldü. Parafin bloklardan mikrotomda 5µm kalınlığında polysine kaplı lamlara alınan kesitler, mikrodalga ışınımlı "antijen retrieval" protokolü uygulanarak immunohistokimyasal yöntemlerle boyandı.

İmmunohistokimya

Dokuların, lama daha güçlü yapışmasını sağlamak için 60°C'lik etüvde 1 saat süreyle bekletilen kesitler, bu işlemin ardından xylol ve alkol serilerinden geçirildi. Endojen peroksidazın giderilmesi için 10 dakika %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) (metanolle hazırlanmış) de bekletilen doku kesitleri bunun ardından distile suda (5 dakika) yıkandı.

Antijen retrieval protokolü doku kesitlerinin, içerisinde 0,01M sitrat tamponu (pH 6,0)²³ bulunan plastik koplın jara aktarılmasıyla başladı. Koplın jar mikrodalga fırının dönen platformunun orta noktasına yerleştirilerek 600W'da beşer dakika süreyle ardı ardına dört kez ısıtıldı. Her beş dakikada bir koplın jardaki tampon miktarı kontrol edilerek azalan kısım distile suyla tamamlandı. Daha sonra mikrodalga fırından çıkarılan kesitler oda ısısında 20 dakika soğumaya bırakıldı. Soğuyan doku kesitlerinin 5 dakika süreyle PBS (phosphate buffer saline) de yıkanması ile antijen retrieval işlemi sona erdi.

İmmunohistokimyasal boyama Avidin-Biotin-Peroksidaz Kompleks (ABC) tekniği kullanılarak gerçekleştirildi. Antijen retrieval protokolü sonrası PBS'de yıkanan kesitler, spesifik olmayan antikor bağlanmalarını önlemek amacıyla %10'luk normal keçi serumu ile oda ısısında (10 dakika) inkube

edildi. AR'yi saptamak için primer antikor olarak PG-21 [Rabbit Anti-Rat/Human Androgen Receptor Polyclonal Antiserum (Millipore Corporation)] kullanıldı²⁴. Negatif kontrol olarak kullanılan doku kesitlerine PG-21 yerine non spesifik sığır serumu uygulandı (Şekil 5). Kesitler primer antiserum ile 16–20 saat 4°C de inkube edildi (Antiserum, içerisinde %2,5 bovine serum albumin ve %0,25 sodyum azid içeren PBS' de 1:50 oranında sulandırıldı). Daha sonra biotinleştirilmiş sekonder antiserum [goat anti-rabbit IgG (Zymed 50-235Z)] ile (30 dakika) ve bunu takiben streptavidin horseradish peroksidaz (HRPO conjugate, SA 1007, CALTAG) ile (30 dakika) 37°C nemli ortamda inkube edildi. Kesitler her inkübasyon öncesi 10 dakika süre ile PBS solüsyonu ile yıkandı. Daha sonra kesitler AEC (3-amino-9-ethylcarbozole) kromojen substratına daldırılıp (10 dakika) su ile yıkanıp, hematoksilin ile boyandı (3 dakika) ve mounting medium ile kapatıldı. Boyanan kesitler Olympus BX–51 fotomikroskop ile incelendi ve fotoğrafları çekildi.

İmmunohistokimyasal olarak boyanan preparatlar iki farklı araştırmacı tarafından incelendi. Çekirdeklerinde boyanma görülen hücreler AR pozitif olarak değerlendirildi. İmmunboyanma yoğunluğu negatif (-), pozitif (+), yoğun pozitif (++) ve değişken (+/-, +/-) olarak derecelendirildi.

BULGULAR

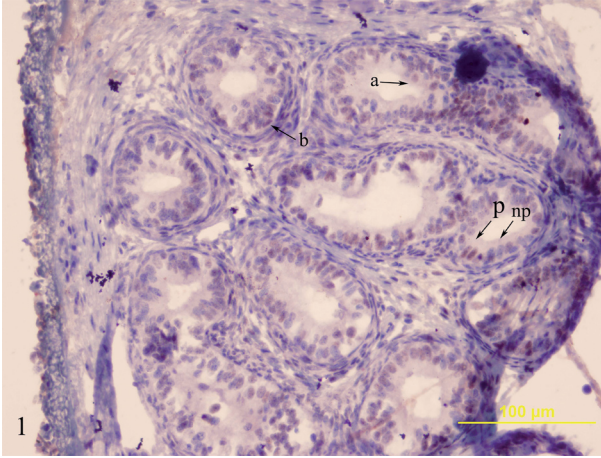
Postnatal gelişme döneminde sıçan kaput epididimisindeki AR dağılımını belirlemek için 21 ile 120 gün arasındaki değişik yaş gurubu sıçanlardan alınan doku kesitleri, immunohistokimyasal yöntemler kullanılarak incelendi. Tablo 1 de bu çalışmadan ve bu konuda yapılmış olan diğer çalışmalardan elde edilen sonuçlar karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir.

İncelenen tüm yaş grubu sıçanlarda; AR pozitif immunoreaktivite, epididimal hücrelerin yalnızca çekirdeklerinde gözlemlendi, sitoplazmada herhangi bir immunoreaktivite şekillenmedi. (Şekil 1, 2, 3, 4). Kaput epididimiste; pozitif immunboyanma, tubuler epitel hücreler ve peritubuler düz kas hücrelerinde görüldü. Epitel hücrelerdeki boyanma yoğunluğu düz kas hücrelerine göre daha belirgindi. Epitel dokuyu oluşturan hücrelerin boyanma özellikleri de birbirinden farklıydı. Esas hücrelerdeki immunoreaktivite bazal ve apikal hücrelere göre daha güçlüydü. Esas hücrelerin büyük çoğunluğu AR pozitifken AR negatif hücreler de mevcuttu (Şekil 1, 2, 3, 4). Peritubuler düz kas hücrelerinin bir kısmı AR pozitifken bir kısmı AR negatifti. (Şekil 2, 3, 4). İncelenen grupların tümünde AR pozitif hücrelerdeki boyanma özellikleri benzerdi yani yaşa bağlı olarak değişim göstermedi.

Tablo 1. Elde edilen bulguların benzer çalışmaların sonuçlarıyla karşılaştırmalı olarak gösterimi.

Epitel Hücreler	Bu çalışma (21, 56, 90 ve 120 günlük gruplar)	İnsan		Fare		Sıçan		Keçi
		(28)	(1)	(20)	(17)	(38)	(39)	(36)*
Esas hücreler	++/-	++	++	++	++/+	++/-	++	++
Bazal hücreler	+	-	++	++	++/+	++/-	++	+
Apikal hücreler	+	(i)	(i)	++	++/+	(i)	+	+
Peritubuler düz kas hücreleri	+/-	++/-	++/-	+/-	+/-	-	+	+

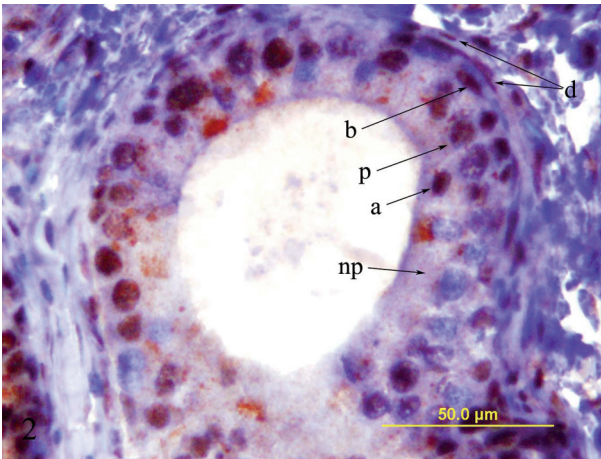
Semboller: Yoğun pozitif (+ +), pozitif (+), negatif (-), değişken (+ +/-, +/-), incelenmedi (i), kaynaklar (*).



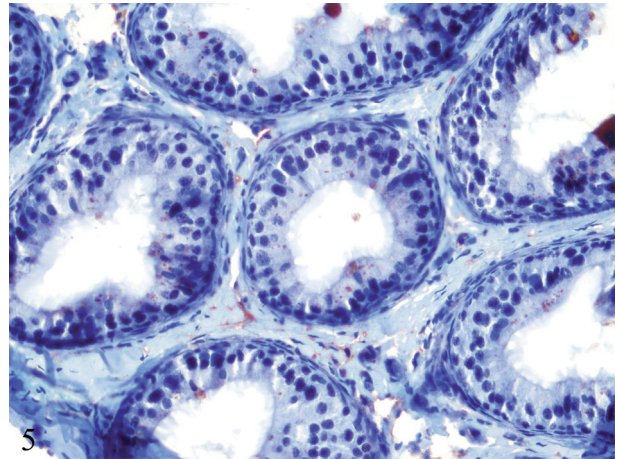
Şekil 1. 21 günlük sıçanlarda kaput epididimal hücrelerdeki AR lokalizasyonu. a, apikal hücre; b, bazal hücre; p, esas hücre; np, negatif esas hücre. Tüm yaş grubu sıçanlarda; pozitif AR immunboyanma, kaput epididimal hücrelerin çekirdeklerinde gözlemlendi. Sitoplazmada boyanma gözlenmedi.



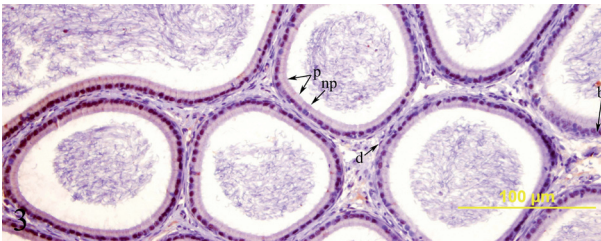
Şekil 4. 120 günlük sıçanlarda kaput epididimal hücrelerdeki AR lokalizasyonu. b, bazal hücre; p, esas hücre; np, negatif esas hücre; d, peritubuler düz kas hücresi.



Şekil 2. 56 günlük sıçanlarda kaput epididimal hücrelerdeki AR lokalizasyonu. a, apikal hücre; b, bazal hücre; p, esas hücre; np, negatif esas hücre; d, peritubuler düz kas hücresi.



Şekil 5. Negatif kontrol.



Şekil 3. 90 günlük sıçanlarda kaput epididimal hücrelerdeki AR lokalizasyonu. b, bazal hücre; p, esas hücre; np, negatif esas hücre; d, peritubuler düz kas hücresi.

TARTIŞMA

Bu çalışmada immunohistokimyasal teknikler kullanılarak postnatal gelişim sürecinde sıçan kaput epididimisinde AR'nin hüresel lokalizasyonu incelendi. AR pozitif İmmunoreaktivite epididimal hücrelerin yalnızca çekirdeklerinde gözlemlendi. Sitoplazmada herhangi bir immunboyanma şekillenmedi. AR'nin hücre çekirdeğinde lokalize olduğunu gösteren bu bulgu, yaygın olarak kabul gören ve AR gibi; androjenlerin bağlanmasıyla aktifleşen transkripsiyonel regülatörlerin, esas olarak steroidlere duyarlı hedef hücrelerin çekirdeğinde lokalize olduğunu belirten, hipotezi²⁵ desteklemektedir. İnsanlarda,²⁶⁻²⁸ maymunlarda²⁹ sıçanlarda³⁰ ve farelerde³¹ yapılan çalışmalarda AR'nin hüresel lokalizasyonuna ilişkin benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Kaput epididimiste; AR dağılımının ve yoğunluğunun yaşa bağlı olarak değişimini inceleyen çalışmalar oldukça sınırlıdır. Mevcut çalışmada, ortaya konulan “epididimal hücrelerdeki AR dağılımının ve yoğunluğunun, yaşa bağlı olarak değişmediği” bulgusu literatürlerin bir kısmıyla^{32,33} örtüşürken bir kısmıyla³⁴ uyuşmamaktadır. Bu bulgu androjenin epididimisin postnatal farklılaşması ve epitel dokusunun yapısının korunabilmesi için gerekli olduğunu belirten görüşü desteklemektedir.⁴⁻⁶ Ayrıca henüz intraluminal sıvı akışının olmadığı prepubertal dönemdeki sıçan epididimisinde AR'nin bulunması AR regülasyonunun intraluminal androjenlerden ziyade dolaşım yoluyla ulaşan androjenlerce sağlandığı şeklindeki görüşü³² teyit etmektedir.

Bu çalışmada ortaya konulan, AR pozitif immunboyanmanın tubuler epitel hücreler ve peritubuler düz kas hücrelerinde görüldüğü ve epitel hücrelerdeki boyanma yoğunluğunun düz kas hücrelerine göre daha güçlü olduğu sonucu, daha önce yapılan çalışmalarla benzerdir.^{17,29,35} Ayrıca esas hücrelerin boyanma yoğunluğunun bazal ve apikal hücrelere göre daha güçlü olduğu bulgusu, epitel hücrelerin boyanma yoğunluklarının birbirinden farklı olduğunu göstermesi bakımından önemlidir. Ayrıca elde edilen bu bulgu; esas hücrelerin androjen sitümlasyonuna daha duyarlı olduğu şeklinde yorumlanabilir. Bu yorum esas hücrelerin yapısının ve fonksiyonlarının devam ettirilmesinde androjenlerin elzem olduğu fikrini³⁶ desteklemektedir. Mevcut çalışmada; esas hücrelerin, hemen hemen tamamının yoğun bir şekilde AR immunboyanma gösterdiği, bununla beraber az miktarda AR negatif hücrelerinde bulunduğu ortaya konulmuştur. Esas hücrelerdeki AR lokalizasyonuna yönelik bu bulgular bir çok çalışmada^{14,17,20,28,29,32,35-39} elde edilen sonuçları teyit etmektedir. Peritubuler düz kas hücrelerinin bazılarında görülen AR pozitif immunoreaktivite sıçanlarda,^{17,20} maymunlarda^{35,36,40} ve insanlarda^{28,29} yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlarla paralellik arz etmektedir.

Spermiyumlar, epididimisteki intraluminal sıvı içerisinde olgunlaşırlar.⁷ Lumen sıvısı tarafından sağlanan bu mikro çevre; epididimis epitelince gerçekleştirilen; hidrojen iyon sekresyonu,⁴¹ proteinlerin reabsorbsiyonu,^{42,43} protein sentezi ve sekresyonu^{9,44,45} gibi fonksiyonlar sonucunda oluşturulur. Epididimisteki protein sentezi ve sekresyonu araştırmacıların üzerinde yoğunlaştığı bir konudur.

Çünkü bu proteinler spermin fertilitate kazanmasında rol oynarlar.^{44,46,47,48} Yapılan çalışmalar; epididimis epitelinin protein sentezi ve salgılanması ile ilgili fonksiyonlarının androjenler tarafından kontrol edildiğini ve androjen yokluğunun genel olarak protein sentezi ve salgılanmasını inhibe ettiğini göstermiştir.^{49,50} Mevcut çalışmada, androjenlerin etkisine aracılık eden AR'nin epididimis epitelindeki dağılımı ve yoğunluğuyla ilgili elde edilen veriler, androjenin epididimis fonksiyonlarının regülasyonundaki önemini teyit etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Ungefroren H, Ivell R, Ergün S. Region-specific expression of the androgen receptor in the human epididymis. *Mol Hum Reprod* 1997; 11(3):933-40.
2. Abraham L, Kierszenbaum AL. Histology and Cell Biology. An Introduction to Pathology. In, Spermatogenesis. Second ed. 2007:569-94, Philadelphia.
3. Moonjit P, Suwanpuddee A. Histological structure of testes and ductus epididymis of rusa deer (*Cervus timorensis*). *Kasetsart J (Nat Sci)* 2007; 41:86-90.
4. Brooks DE. Influence of androgens on the weights of the male accessory reproductive organs and on the activities of mitochondrial enzymes in the epididymis of the rat. *J Endocrinol* 1979; 82(2):293-303.
5. Maneenly RB. Epididymal structure and function: a historical and critical review. *Acta Zoologica* 1959;40(1): 1-21.
6. Orgebin-Christ MC. Androgens and epididymal function. In, Shalender B, Henry LG, Jeffrey MS, Ronald SS and Christina W (Ed): *Pharmacology, Biology and Clinical Applications of Androgens*. Second ed. New York: Wiley; 1996:27-34.
7. Robaire B, Hermo H. Efferent ducts, epididymis, and vas deferens: structure, functions, and their regulation. In: Knobil E, Neill JD (eds.), *The Physiology of Reproduction*. Vol. 1. New York: Raven Press; 1988:1037-55.
8. Amann RP, Hammerstedt RH, Veeramanchani DNR. The epididymis and sperm maturation-a perspective. *Reprod Fertil Dev* 1993;5(4):361-81.
9. Brooks DE. Effect of androgens on protein synthesis and secretion in various regions of the rat epididymis, as analyzed by 2 dimensional gel electrophoresis. *Mol Cell Endocrinol* 1983; 29(3):255-70.
10. Holland MK, Orgebin-Crist MC. Characterization and hormonal regulation of protein synthesis by the murine epididymis. *Biol Reprod* 1988; 38(4):487-96.
11. Carson-Jurica MA, Schrader WT, O'Malley BW. Steroid receptor family: Structure and functions. *End Rev* 1990; 11(3): 201-20.
12. Turner TT, Jones CE, Howards SS, Ewing LL, Zegeye B, Gunsalus GL. On the androgen microenvironment of maturing spermatozoa in the adult rat. *Endocrinol* 1984;115(5):1925-32.

13. Bardin CW, Hardy MP, Catterall JF. Androgen. In: Adashi EY, Rock JA, Rosenwaks Z (Ed): Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology. Lippincott-Raven, Philadelphia. 1996;505-25.
14. Zho ZX, Wong CI, Sar M, Wilson EM. The androgen receptor. *Recent Prog Horm Res* 1994;49(3): 249-74.
15. Carreau S, Drosdowsky MA, Courot M. Androgen-binding protein in sheep epididymis: characterization of a cytoplasmic receptor in the ram epididymis. *J Endocrinol* 1984;103(3):273-9.
16. Paris F, Weinbauer GF, Blum V, Nieschlag E. The effect of androgens and antiandrogens on the immunohistochemical localization of the androgen receptor in accessory reproductive organs of the male rat. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1994;48(2):129-37.
17. Takeda H, Chodak G, Mutchnik S, Nakamoto T, Chang C. Immunohistochemical localization of androgen receptors with mono- and polyclonal antibodies to androgen receptor. *J Endocrinol* 1990;126(1):17-25.
18. Tekpetey FR, Veeramachaneni DN, Amann RP. Localization of androgen receptors in ram epididymal principal cells. *J Reprod Fertil* 1989;87(3):311-9.
19. Tindall DJ, Hansson V, McLean WS, Ritzen EM, Nayfeh SN, French FS. Androgen-binding proteins in rat epididymis: properties of a cytoplasmic receptor for androgen similar to the androgen receptor in ventral prostate and different from androgen-binding protein (ABP). *Mol Cell Endocr* 1975;3(2):83-101.
20. Zhou Q, Nie R, Prins G S, Saunders PTK, Katzenellenbogen BS, Hess RA. Localization of androgen and estrogen receptors in adult male mouse reproductive tract. *J Androl* 2002;23(6):870-81.
21. Crabo B. Studies on the composition of epididymal contents in bulls and boars. *Acta Vet Scand* 1965; 6(5):1-94.
22. Turner TT. Resorption versus secretion in the rat epididymis. *J Reprod Fertil* 1984;21(7):883-90.
23. Iwamura M, Abrahamsson PA, Benning CM, Cockett ATK, Di Sant'Agnes PA. Androgen receptor immunostaining and its tissue distribution in formalin-fixed, paraffin-embedded sections after microwave treatment. *J Histochem Cytochem* 1994; 42(6):783-8.
24. Collins PM, Tsang WN. An assessment of the function of the seminiferous tubules and interstitium of the rat testis following ligation of the vasa efferentia. *Biol Reprod* 1979; 20(7):671-80.
25. Malayer JR, Gorski J. An integrated model of estrogen receptor action. *Domest Anim Endocrinol* 1993; 10(2):159-77.
26. Janssen PJ, Brinkmann AO, Boersma WJ, van der Kwast TH. Immunohistochemical detection of the androgen receptor with monoclonal antibody F39.4 in routinely processed, paraffin-embedded human tissues after microwave pretreatment. *J Histochem Cytochem* 1994;42(8):1169-75.
27. Kimura N, Mizokami A, Oonuma T, Sasano H, Nagura H. Immunocytochemical localization of androgen receptor with polyclonal antibody in paraffin-embedded human tissues. *J Histochem Cytochem* 1993;41(5):671-8.
28. Ruizeveld de Winter JA, Trampan M, Vermey M, Mulder E, Zegers ND, van der Kwast TH. Androgen receptor expression in human tissues: An immunohistochemical study. *J Histochem Cytochem* 1991; 39(7): 927-36.
29. West NB, Brenner RM. Estrogen receptor in the ductuli efferentes, epididymis and testis of rhesus and cynomolgus macaques. *Biol Reprod* 1990;42(3):533-8.
30. Bremner WJ, Millar MR, Sharpe RM, Saunders PTK. Immunohistochemical localization of androgen receptor in the rat testis: evidence for stage-dependent expression and regulation by androgens. *Endocrin* 1994;135(3):1227-34.
31. Iguchi T, Uesugi Y, Sato T, Ohta Y, Takasugi N. Developmental pattern of estrogen receptor expression in male mouse genital organs. *Mol Androl* 1991;3:109-19.
32. Goyal HO, Bartol FF, Wiley AA, Khalil MK, Chiu J, Vig MM. Immunolocalization of androgen receptor and estrogen receptor in the developing testis and excurrent ducts of goats. *Anat rec* 1997b;249:54-62.
33. Parlevliet JM, Pearl CA, Hess MF, Famula TR, Roser JF. Immunolocalization of estrogen and androgen receptors and steroid concentrations in the stallion epididymis. *Theorogenology* 2006;66(4):755-65.
34. Carreau S, Drosdowsky MA, Courot M. Androgen-binding proteins in sheep epididymis: age-related effects on androgen-binding protein, cytosolic androgen receptor and testosterone concentrations. Correlations with histological studies. *J Endocrin* 1984a;103:281-6.
35. Zhu LJ, Hardy MP, Inigo IV, Huhtaniemi I, Bardin CW, Moo-Young AJ. Effects of androgen on androgen receptor expression in rat testicular and epididymal cells: a quantitative immunohistochemical study. *Biol Reprod* 2000;63(2):368-76.
36. Goyal HO, Bartol FF, Wiley AA, Neff CW. Immunolocalization of receptors for androgen and estrogen in male caprine reproductive tissues: Unique distribution of estrogen receptors in efferent ductal epithelium. *Biol Reprod* 1997a;56:90-101.
37. Goyal HO, Bartol FF, Wiley AA, Khalil MK, Williams CS, Vig MM. Regulation of androgen and estrogen receptors in male excurrent ducts of the goat: an immunohistochemical study. *Anat Rec* 1998;250: 164-71.
38. Trybek G, Kolasa A, Marchlewicz M, Wenda-Rozewicka L, Wiszniewska B. Immunolocalization of androgen receptor in the epididymis of rats with dihydrotestosterone deficiency. *Biol Reprod* 2005;5(3): 291-301.
39. Yamashita S. Localization of estrogen and androgen receptors in male reproductive tissues of mice and rats. *The Anat Rec* 2004;279(2):768-78.
40. Roselli CE, West NB, Brenner RM. Androgen receptor and 5 α -reductase activity in the ductuli efferentes and epididymis of adult rhesus macaques. *Biol Reprod* 1991;44:739-45.
41. Levine N, Kelly H. Measurement of pH in the rat epididymis in vivo. *J Reprod Fertil* 1978;52:333-5.
42. Pelliniemi L, Dym M, Gunsalus GL, Musto NA, Bardin CW, Fawcett DW. Immunocytochemical localization of androgen binding protein in the male reproductive tract. *Endocrinology* 1981;108(3):925-31.
43. Turner TT. Resorption and secretion in the rat epididymis. *J Reprod Fertil* 1984;72(2):509-14.

44. Vreeburg JTM, Holland MK, Orgebin-Crist MC. Binding of epididymal proteins to rat spermatozoa in vivo. *Biol Reprod* 1992;47:588-97.
45. Turner IT, Avery EA, Sawchuk TJ. An assessment of protein synthesis and secretion by rat seminiferous and epididymal tubules in vivo. *Int J Androl* 1994;17(4):205-13.
46. Voglmayr JK, Sawyer RF, Dacheux JL. Glycoprotein-a variable factor in surface transformation of ram sperm during epididymal transit. *Biol Reprod* 1985;33(1):165-76.
47. Orgebin-Crist MC, Jahad N. The maturation of rabbit epididymal spermatozoa in organ culture: inhibition by anti-androgens and inhibitors of ribonucleic acid and protein synthesis. *Endocrinology* 1979; 103(1):46-53.
48. Fournier-Delpech S, Courot M, Dubois MP. Decreased fertility and motility of spermatozoa from rats immunized with prealbumin epididymal specific glycoprotein. *J Androl* 1985;6:246-50.
49. Brooks DE. Metabolic activity in the epididymis and its regulation by androgens. *Physiol Rev* 1981; 61(3):515-55.
50. Holland MK, Vreeburg JTM, Orgebin-Crist MC. Testicular regulation of epididymal protein secretion. *J Androl* 1992;13(3):266-73.