



Sıçanların Lakrimal Bezlerinde α -SMA, S-100 Protein ve Alt Ünitelerinin Lokalizasyonları

Emel ALAN, Narin LİMAN*

Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Kayseri

***Sorumlu Yazar /
Corresponding Author:**

Emel ALAN
e-mail: emelalan@gmail.com,
ealan@erciyes.edu.tr

Geliş Tarihi / Received:
25 December 2015

Kabul Tarihi / Accepted:
21 March 2016

Anahtar Kelimeler:
 α -SMA, lakrimal bez, S-100 protein, sıçan

Key Words:
 α -SMA, lacrimal gland, rat, S-100 protein

Özet

Bu çalışma, erişkin erkek sıçanların intraorbital ve ekstraorbital lakrimal bezinde kalsiyum bağlayan wbS-100, S-100 α ve S-100 β proteinleri ile α -SMA'nın immunohistokimyasal lokalizasyonlarını ortaya koymak amacıyla planlandı. Sıçanlardan anestezi altında lakrimal bezin ekstraorbital ve intraorbital kısımları çıkartıldıktan sonra rutin histolojik prosedürü takiben bloklanmış doku örneklerinden alınan 4 μ m kalınlığındaki kesitlere wbS-100, S-100 α , S-100 β ve α -SMA proteinlerini belirlemek için Streptavidin-biotin-peroksidaz immunohistokimyasal teknik uygulandı. Ekstraorbital lakrimal bezin asinus epitel, akıcı kanal epitel, mioepitel ve endotel hücrelerinin hem sitoplazmasında hem de çekirdeğinde wbS-100, S-100 α ve S-100 β immunreaksiyonuna rastlandı. İntraorbital bezin bütün yapısal komponentlerinde S-100 α immunreaksiyonu en yoğun derecede çekirdekte gözlenirken, S-100 β immunreaksiyonu mioepitel hücrelerinde negatifti. Aynı zamanda ekstraorbital bezin asinus epitel hücrelerinin lateral membranlarında wbS-100 immunreaksiyonu, intraorbital bezin asinus epitel ve akıcı kanal epitel hücrelerinin lateral membranlarında ise wbS100 ve S-100 β immunreaksiyonu belirlendi. Her iki bezin mioepitel hücreleri ile kan damarlarının duvarında yer alan düz kas hücrelerinde α -SMA immunreaksiyonu saptandı. Sonuç olarak, intraorbital ve ekstraorbital lakrimal bezlerin bütün yapısal komponentlerinde wbS-100, S-100 α ve S-100 β proteinleri arasındaki immunohistokimyasal boyanma yoğunluğu açısından tespit edilen bu farklılıkların her iki lakrimal bez arasında salgı aktivitesi ile ilgili fonksiyonel farklılık olduğu düşüncesini akla getirmektedir.

Abstract

Localizations of α -SMA, S-100 Protein and Their Subunits in the Lacrimal Glands of the Rats

This study is intended to reveal immunohistochemical localizations of α -SMA and calcium binding wbS-100, S-100 α and S-100 β proteins in intraorbital and extraorbital lacrimal gland of adult male rats. After extraorbital and intraorbital sections of the lacrimal gland were extracted from the rats under anesthesia, Streptavidin-biotin-peroxidase immunohistochemical technique to determine wbS-100, S-100 α , S-100 β and α -SMA proteins were applied to the 4- μ m sections taken from the tissue samples blocked following the routine histological procedure. Immunoreaction of wbS-100, S-100 α and S-100 β was determined both in cytoplasm and nucleus of the acinus epithelium, duct epithelium, mioepithelial and endothelial cells of extraorbital lacrimal gland. While S-100 α immunoreaction in all structural components of the intraorbital gland was most densely observed in the nucleus, S-100 β immunoreaction was negative in mioepithelial cells. Moreover, it is detected that wbS-100 immunoreaction was positive in the lateral membranes of acinus epithelial cells of extraorbital gland and wbS100 and S-100 β immunoreaction was positive in the lateral membranes of acinus and duct epithelial cells of intraorbital gland. α -SMA immunoreaction was detected in the mioepithelial cells and the smooth muscle cells in the wall of blood vessels of both glands. In conclusion, the differences detected between wbS-100, S-100 α and S-100 β proteins in all structural components of intraorbital and extraorbital lacrimal glands in terms of immunohistochemical staining density suggest that there is a functional difference between both lacrimal glands with respect to the secretory activity.

Giriş

Sıçanlarda lakrimal bez, superior (ekstraorbital veya eksorbital) ve inferior (intraorbital) olmak üzere iki kısımdan oluşur. İntraorbital bez, küçük olup göz çukurunun hemen altında yer alırken, ekstraorbital

lakrimal bez, göz çukurunun dışında kulağın altında yassı ve disk şeklinde olup intraorbital bezden daha büyüktür. Bu bezlerin kanalları gözün dış açısında bulunan dorsal ve ventral konjunktival keselere ulaşmadan hemen önce birleşir. Sıçanlarda her iki lakrimal bez seröz ve

tubuloasiner karakterde olup birçok intraglanduler ekskretor akıtıcı kanala sahiptir (Komarek ve ark., 2000). Lakrimal bezlerin en önemli fonksiyonu çevresel etkenlere karşı göz yüzeyini (kornea ve konjunktiva) korumak ve kayganlaştırmak için su, protein, elektrolit, lipit, müsin, lizozim, gözyaşı lipokalini, laktoferrin ve IgA sentezlemektir (Liman, 2011). Bu lakrimal sekresyonda fosfolipaz C' nin aktivasyonu, Ca²⁺-mobilize eden mesajın oluşumu ve endoplazmik retikulumda depolanan Ca²⁺ nın serbest bırakılması gibi sinyal mekanizmaları görev almaktadır (Putney ve Bird, 2014).

Kalsiyum, salgı hücrelerinin ekzositozu, sıvı sekresyonu, sinir impuls iletimi, kas kontraksiyonu, hücresel farklılaşma, apoptozis ve nekroz gibi birçok hücresel olaylarda görev alan bir iyonudur. Kalsiyumun bu hücresel fizyolojideki önemli görevleri sitoplazma içine ve dışına hareketi ile gerçekleşmektedir (Petersen, 1992). Case ve ark. (1988) pankreas ve büyük tükürük bezlerinde, artan intrasellüler kalsiyum konsantrasyonları ile salgı süreci arasında pozitif bir ilişki olduğunu ortaya koyarlarken, Donato (1991), S-100 gibi kalsiyum bağlayan proteinlerin, bezlerin salgı işlemi sırasında faaliyet gösteren kalsiyumun sinyal mekanizması üzerinde etkili olduğunu ileri sürmektedir.

S-100 proteinleri, ilk olarak merkezi sinir sisteminde identifiye edilen 10-12 kDa ağırlığında küçük, asidik ve kalsiyum bağlayıcı proteinlerdir. En az 25 farklı S-100 proteini identifiye edilmektedir ve bu ailenin genleri S-100A1, S-100A2, S-100A3 şeklinde kodlanır. İsmi yüzde yüz doymuş amonyum sülfat solüsyonunda eriyebilme özelliğinden alan S-100 (soluble in 100% saturated solution of ammonium sulphate) alfa ve beta zincirlerinin kombinasyonu sonucunda oluşan üç dimerik protein içermektedir: S-100a (αα dimer), S-100b (αβ dimer), and S-100c (ββ dimer) izoformları. S-100'ün α ve β alt ünitelerinin her birinin kalsiyum için farklı bağlanma affinitesi gösteren iki kalsiyum bağlayan bölgesi bulunmaktadır (Dannies ve Lewine, 1971; Isobe ve ark., 1981; Isobe ve Okuyama, 1981). S-100 proteinleri nükleik asitler, transkripsiyon faktörleri, reseptörler, enzimler gibi çeşitli hedef proteinlerle etkileşime girerek protein fosforilasyonunun düzenlenmesi, enzim aktivasyonu, enerji metabolizması, hücre büyümesi, hücre farklılaşması, apoptozis, yangısal cevap, hücre iskelet bileşenleri ile etkileşim ve kalsiyum homeostazisi gibi çok sayıda intrasellüler ve ekstrasellüler fonksiyonlara sahiptir (Donato, 1999; Yao ve ark., 2007).

İlk olarak sığırların beyin dokusunda identifiye edilen "whole brain" S-100 (wbS-100) (Moore, 1965) ve iki alt ünitesinin (S-100α ve S-100β) insanların normal ve kanserli ekzokrin bezlerinde belirlemeye yönelik birçok çalışmaya rastlanmaktadır (Haimoto ve ark., 1987; Lee ve ark., 1993; Mori ve ark., 1990; Kivelä, 1992). Bunun

dışında diğer evcil memelilerden sığırların (Lauboeck ve Egerbacher, 1997), koyunların (Marettová ve Legáth, 2008), sıçanların (Molin ve ark., 1984; Mori ve ark., 1998) ve köpeklerin (Hirayama ve ark., 2000; Sandusky ve ark., 1985) ekzokrin bezlerinin salgı epiteli, akıtıcı kanal epiteli ve miyoepitel hücrelerinde değişen oranlarda wbS-100, S-100α ve S-100β immunreaksiyonunun bulunduğu bildirilmektedir.

Alfa-smooth muscle actin (α-SMA), kontraktıl yapıda mikrofilaman demetleri olup ter, meme, trakeyabronşiyal, tükürük ve lakrimal bez gibi çeşitli ekzokrin bezlerin asinuslarının ve küçük akıtıcı kanallarının etrafını saran miyoepitel hücrelerinde ve damarların düz kas hücrelerinde lokalize olmaktadır (Gugliotta ve ark., 1988). Miyoepitel hücreler, pleomorfik adenoma ve epiteliyal-miyoepiteliyal karsinoma gibi çeşitli tükürük bezi tümörlerinin gelişimi üzerinde önemli bir role sahiptir. Diagnostik patolojide miyoepiteliyal farklılaşmanın tespit edilmesinde sitokeratin, vimentin, α-SMA, S-100 ve miyozin gibi birçok antikor belirteç olarak kullanılmaktadır (Hirano ve ark., 1990). Yapılan çalışmalarda insanların lakrimal bezinde (Kivelä, 1992) ve köpeklerin lakrimal bezinin pleomorfik adenomasında (Hirayama ve ark., 2000) α-SMA'nın miyoepitel hücrelerinde immunpozitif olduğu bildirilmektedir.

Oküler hastalıklar, damızlık ve besi hayvanlarının üretiminde ve yetiştiriciliğinde önemli bir etkiye sahiptir. Çevresel faktörlerle gelişen lakrimal bezlerin kronik yangısı kuru göz sendromu (Dry Eye Syndrome-DES) hastalığının veya keratokonjunktivitis sikka (Keratoconjunctivitis sicca-KCS) semptomlarının ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Stern ve ark., 2004). Bu nedenle lakrimal bezlerin sekretorik fonksiyonu ve gözyaşı filminin bileşeni gözün fizyolojisinde ve patolojisinde önemli bir rol oynamaktadır (Kawashima ve ark., 2012). Dolayısıyla sunulan çalışmada evcil memelilerde karşılaşılan oküler hastalıkların aydınlatılmasında bir model oluşturması açısından kullanılan bu sıçanların intraorbital ve ekstraorbital lakrimal bezlerinin sekresyonunda önemli bir etkiye sahip olan wbS-100, S-100α, S-100β ve α-SMA proteinlerinin immunohistokimyasal olarak lokalizasyonlarının belirlenmesi amaçlanmaktadır.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu Başkanlığı tarafından onaylandı (karar no: 13/47, Tarih: 13.02.2013).

Doku Temini

Bu çalışmada Erciyes Üniversitesi deney hayvanları merkezinde yetiştirilen 6-8 haftalık, ortalama ağırlıkları

250-300 gr olan *Rattus norvegicus* (Wistar albino) ırkı 8 adet erkek ergin sıçan kullanıldı. Sıçanlardan rompun ve ketalar anestezisi (Rompun 13 mg/kg, Ketalar 87 mg/kg) altında lakrimal bezin ekstraorbital ve intraorbital kısımları çıkartıldıktan sonra kalbin sağ atriyumu kesilerek hayvanlar ötenazi edildi. Çıkarılan lakrimal bez örnekleri formol-alkol tespit solüsyonunda 12 saat tespitinin ardından sırasıyla dereceli alkoller, metil benzoat ve benzol solüsyonlarından geçirilerek parafinde bloklandı. Parafin bloklardan Leica RM 2125 rotary mikrotomu ile 4 µm kalınlığında dört seri kesit alındı. Alınan seri kesitlere sırayla wbS-100, S-100α, S-100β ve α-SMA proteinlerini belirlemek için Streptavidin-biotin-peroksidaz immunohistokimyasal teknik (Thermo Fisher Scientific Lab Vision Corporation, Fremont, CA, USA) uygulandı.

İmmunohistokimyasal Analizler

İmmunohistokimyasal incelemeler için hazırlanan preparatlar deparafinizasyon ve rehidrasyon işlemlerinden sonra distile suda çalkalanarak metanolde hazırlanan %3' lük hidrojen peroksitte 15 dakika süreyle tutuldu ve PBS (Phosphate Buffer Saline, 0.01 M, pH:7.4)'de iki kez yıkandı. Ardından, bütün antikolar için 0.01 M sitrat buffer'da (pH:6.0) 30 dakika antijen retriyel işlemi yapıldı ve 20 dakika soğutma işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra, bir nem kamarası (Thermo Shandon, UK) içinde non-spesifik bağlanmaları engellemek için %10'luk keçi serumu (Ultra V Block, Thermo Fisher Scientific Lab Vision Corporation, Fremont, CA, USA; TA-125UB) ile 5 dakika süreyle inkube edildi. Bu işlemden sonra, kesitler anti-S-100, anti-S-100α, anti-S-100β ve α-SMA primer antikolarıyla +4 °C de 1 gün süreyle buzdolabında inkübasyona bırakıldı (Tablo 1). Ardından, kesitlere 20 dakika süreyle oda ısısında biotinli goat anti-rabbit (wbS-100 için) ve anti-mouse sekonder antikoları (S-100α, S-100β ve α-SMA için) uygulandı. Daha sonra 20 dakika süreyle avidin-peroksidaz solüsyonu (Labvision, Ultravision kit, TS-125-

HR) ile muamele edildi. Her bir işlemden sonra dört kez PBS'de yıkanan kesitlere antijen-antikor reaksiyonun görüntülenebilmesi için 5-10 dakika süreyle 3,3'-diaminobenzidine tetra hydrochloride (DAB; Thermo Fisher Scientific Lab Vision Corporation, Fremont, CA, USA), ardından zemin boyaması için 5 dakika süreyle Gill'in hematoksileni uygulandı ve kesitler mavileşinceye kadar çeşme suyunda yıkandı. Son olarak alkol ve ksilol serilerinden geçirilen kesitler entellan ile kapatıldı. Kahverengi presipitasyonun görülmesi sonucunda reaksiyon pozitif olarak değerlendirildi ve ışık mikroskopunda (BX51; Olympus, Tokyo, Japan) incelenerek fotoğraflandı. Pozitif kontrol olarak, çalışmada kullanılan wbS-100 antikoru için sıçan akciğeri, S-100α ve α-SMA antikoları için sıçanların prostat ve veziküla seminalis bezleri, S-100β antikoru için sıçan duodenumu kullanıldı. Negatif kontroller olarak alınan doku örnekleri ise primer antikorsuz kullanılan antikorum hazırlandığı hayvan türüne göre non-immun serum ile muamele edildi.

Semi-kantitatif Analizler

İmmunohistokimyasal boyanma yoğunluk skoru (IS) kullanılarak semikantitatif olarak değerlendirildi (Brown ve Lamartiniere, 2000). Yoğunluk skoru, sitoplazma, çekirdek ve membranda bulunan pozitif boyanma yoğunluğunu yansıtmaktadır. Bu metotda, yoğunluk skoru (IS); - : negatif, +: zayıf, ++: orta, +++: kuvvetli olarak değerlendirildi.

Hücrelerde immunohistokimyasal reaksiyonların yoğunluk skoru iki bağımsız araştırmacı tarafından incelendi ve bu iki araştırmacının ortalama skoru hesaplandı. Sıçanların ekstraorbital ve intraorbital lakrimal bezinde wb-S100, S-100α, S-100β, ve α-SMA ekspresyonları mikroskopta farklı büyütmelemlerde incelenerek asinus epitel hücreleri, akıcı kanal epitel hücreleri, miyoepitel hücreleri, kan damarlarının endoteli ve makrofaj olmak üzere beş farklı hücre grubunda değerlendirildi.

Tablo 1. İmmunohistokimyada kullanılan antikolar.

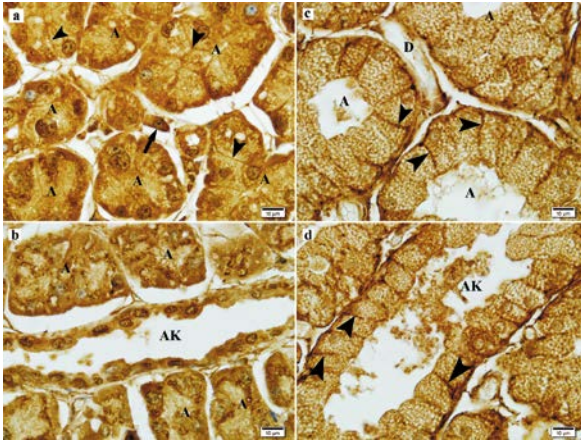
Table 1. Antibodies used in the immunohistochemistry.

Primer Antikolar	Firma adı	Katalog No	Konakçı	Klonu/izotipi	Dilüsyon oranı
Anti-wbS-100	Sigma-Aldrich	S2644	Rabbit	Polyclonal IgG	1:400
Anti-S-100α	Sigma-Aldrich	S2407	Mouse	SH-A1/ Monoklonal IgG	1:400
Anti-S-100β	Sigma-Aldrich	S2532	Mouse	SH-B1/ Monoklonal IgG	1:400
α-SMA	Thermo-Scientific	MS-113-P	Mouse	1A4/ Monoklonal IgG	1:800

Bulgular

Lakrimal bezlerde wbS-100'ün immunlokalizasyonu

Intraorbital ve ekstraorbital lakrimal bezin asinus epiteli, akıtıcı kanal epiteli ve miyoepitel hücrelerinin sitoplazması kuvvetli wbS-100 immunreaksiyonu gösterirken, çekirdekteki reaksiyon daha zayıftı. Aynı zamanda intraorbital bezin hem asinus epiteli hem de akıtıcı kanal epitel hücrelerinin lateral membranlarında, ekstraorbital bezin ise sadece asinus epitel hücrelerinin lateral membranlarında wbS-100 pozitif immunreaksiyonu saptandı. Endotel hücrelerinde orta dereceli bir reaksiyon gözlemlendi. Ekstraorbital lakrimal bezin intersitisyel bağ dokusu içinde bulunan makrofajların hem sitoplazmasında hem de çekirdeğinde kuvvetli wbS-100 immunreaksiyonu belirlendi (Şekil 1, Tablo 2).



Şekil 1. Sıçanların ekstraorbital (a, b) ve intraorbital lakrimal bezlerinde (c, d) wbS-100 immunreaksiyonu. A: Asinus, AK: Akıtıcı kanal, D: Kan damarı, siyah ok: makrofaj, siyah ok başı: wbS-100 immunpozitif lateral membran. Bar: 10 μ m.

Figure 1. wbS-100 immunreaction in the extraorbital (a, b) and intraorbital lacrimal glands (c, d) of the rats. A: Acinus, AK: Duct, D: Blood vessel, black arrow: macrophage, black arrow head: wbS-100 immunpositive lateral membrane. Scala bar: 10 μ m.

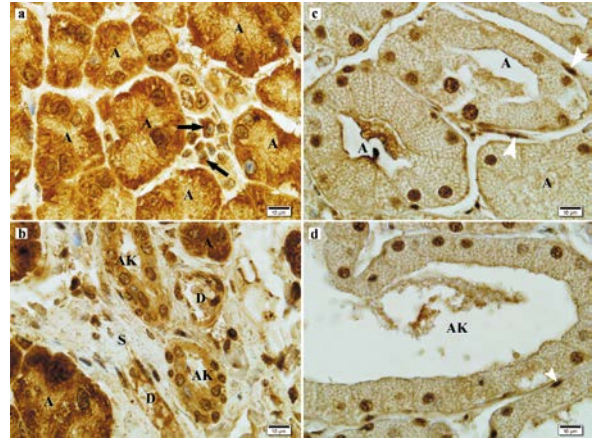
Lakrimal bezlerde S-100 α 'nın immunlokalizasyonu

Intraorbital bezin asinus epiteli, akıtıcı kanal epiteli, miyoepitel ve endotel hücreleri ile makrofajların çekirdeğinde kuvvetli S100 α immunreaksiyonuna rastlanırken, sitoplazmadaki reaksiyon oldukça zayıftı. Ekstraorbital bezin asinus epitel hücrelerinin özellikle bazal kısmı ve miyoepitel hücrelerinin sitoplazması kuvvetli pozitif. Akıtıcı kanal epitel hücrelerinde orta

dereceli bir reaksiyona rastlandı. Endotel hücrelerinin hem çekirdeği hem de sitoplazması S-100 α immunpozitif iken, intersitisyel bağ doku içinde bulunan makrofajların sitoplazmasında da kuvvetli immunreaksiyon saptandı (Şekil 2, Tablo 2).

Lakrimal bezlerde S-100 β 'nin immunlokalizasyonu

Intraorbital bezin asinus epiteli, akıtıcı kanal epiteli ve miyoepitel hücrelerinin çekirdeğinde S-100 β immunreaksiyonu negatif iken, asinus epitel hücrelerinin sitoplazmasında bulunan salgı granüllerinin membranında zayıf reaksiyon tespit edildi. Aynı zamanda intraorbital lakrimal bezin asinus epitel ve akıtıcı kanal epitel hücrelerinin lateral membranlarında S-100 β immunreaksiyonu saptandı. Ekstraorbital bezlerde ise asinus epitel hücrelerinin özellikle bazal kısmı, akıtıcı kanal epitel ve miyoepitel hücrelerinin sitoplazması kuvvetli iken, çekirdeğinde zayıf reaksiyon tespit edildi. Endotel hücrelerinde ise orta dereceli bir reaksiyona rastlandı. Ayrıca hem intraorbital hem de ekstraorbital lakrimal bezin intersitisyel bağ dokusu içinde bulunan makrofajların sitoplazmasında kuvvetli S-100 β immunreaksiyonu saptandı (Şekil 3, Tablo 2).



Şekil 2. Sıçanların ekstraorbital (a, b) ve intraorbital lakrimal bezlerinde (c, d) S-100 α immunreaksiyonu. A: Asinus, AK: Akıtıcı kanal, D: Kan damarı, S: Stroma, siyah oklar: makrofaj, beyaz ok başı: S-100 α immunpozitif miyoepitel hücreler. Bar: 10 μ m.

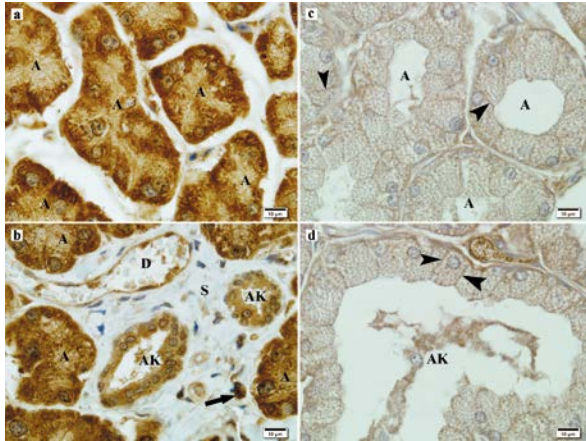
Figure 2. S-100 α immunreaction in the extraorbital (a, b) and intraorbital lacrimal glands (c, d) of the rats. A: Acinus, AK: Duct, D: Blood vessel, S: Stroma, black arrows: macrophage, white arrow head: S-100 α immunpositive myoepithelial cells. Scala bar: 10 μ m.

Tablo 2. Sıçanların intraorbital ve ekstraorbital lakrimal bezinde S100 α , S100 β , wbS100 ve α -SMA proteinlerin immunohistokimyasal lokalizasyonlarının skoru.**Table 2.** Score of the immunohistochemical localizations of the S100 α , S100 β , wbS100 ve α -SMA proteins in the intraorbital and extraorbital lacrimal glands of the rats.

	wbS-100	S-100 α	S-100 β	α -SMA
İntraorbital lakrimal bez				
Asinus epiteli	s/+++, ç/+, lm/++	s/+, ç/+++	s/+, ç/-, lm/+	s/-, ç/-
Akıtıcı Kanal Epiteli	s/+++, ç/+, lm/++	s/+, ç/+++	s/+, ç/-, lm/+	s/-, ç/-
Miyoeptel	s/+++, ç/+	s/+, ç/+++	s/-, ç/-	s/+++, ç/+++
Endotel	s/++, ç/+	s/+, ç/+++	s/+, ç/+	s/-, ç/-, dkh/+++
Makrofaj	s/+++, ç/++	s/+, ç/+++	s/+++, ç/-	s/-, ç/-
Ekstraorbital lakrimal bez				
Asinus epiteli	s/+++, ç/++, lm/++	s/+++, ç/++	s/+++, ç/+	s/-, ç/-
Akıtıcı Kanal Epiteli	s/+++, ç/++	s/++, ç/++	s/+++, ç/+	s/-, ç/-
Miyoeptel	s/+++, ç/++	s/+++, ç/++	s/+++, ç/+	s/+++, ç/+++
Endotel	s/++, ç/++	s/++, ç/+++	s/++, ç/++	s/-, ç/-, dkh/+++
Makrofaj	s/+++, ç/+++	s/+++, ç/++	s/+++, ç/-	s/-, ç/-

Boyanma yoğunluğu: \rightarrow negatif; +, zayıf; ++, orta; +++, kuvvetli.

Hücredeki immun boyanma lokalizasyonları: s, sitoplazmik boyanma; ç, çekirdek boyanması; lm, lateral membran boyanması; dkh, damar duvarında bulunan düz kas hücreleri



Şekil 3. Sıçanların ekstraorbital (a, b) ve intraorbital lakrimal bezlerinde (c, d) S-100 β immunreaksiyonu. A: Asinus, AK: Akıtıcı kanal, D: Kan damarı, S: Stroma, siyah ok: makrofaj, siyah ok başları: S-100 β immunpozitif lateral membran. Bar: 10 μ m.

Figure 3. S-100 β immunreaction in the extraorbital (a, b) and intraorbital lacrimal glands (c, d) of the rats. A: Acinus, AK: Duct, D: Blood vessel, S: Stroma, black arrow: macrophage, black arrow heads: S-100 β immunpositive lateral membrane. Scala bar: 10 μ m.

Lakrimal bezlerde α -SMA'nın immunlokalizasyonu

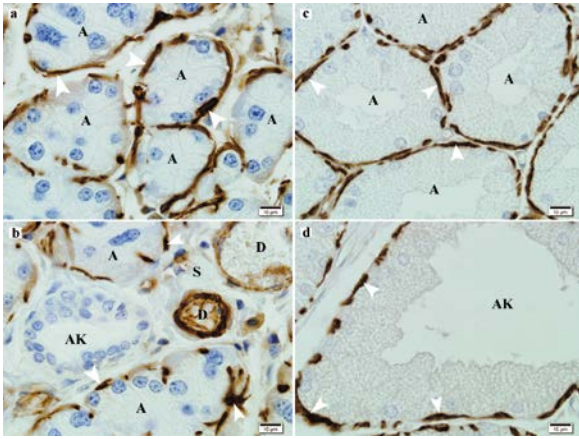
İntraorbital ve ekstraorbital lakrimal bezde asinus epitel hücreleri ile intraorbital bezlerin akıtıcı kanallarının etrafını saran miyoeptel hücrelerinin hem sitoplazması

hem de çekirdeği kuvvetli α -SMA pozitifken, asinus epiteli ve akıtıcı kanal epitel hücreleri negatifti. Aynı zamanda kan damarlarının duvarında yer alan düz kas hücrelerinde de kuvvetli α -SMA immunreaksiyonu saptandı (Şekil 4, Tablo 2).

Negatif kontrol olarak alınan lakrimal bez doku örnekleri ise primer antikorsuz kullanılan antikorun hazırlandığı hayvan türüne göre non-immun serum ile muamele edildiğinde hiçbir immunreaksiyon saptanmadı (Şekil 5).

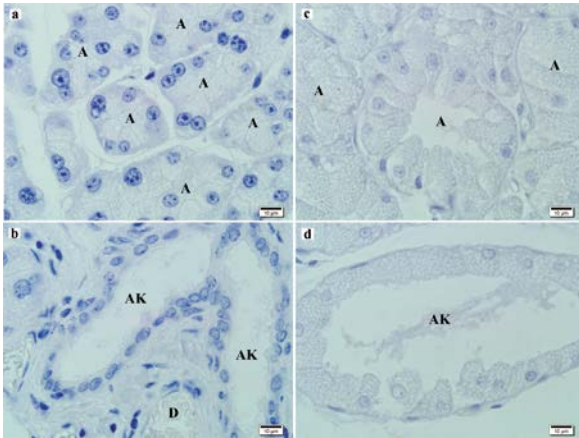
Tartışma

S-100 proteinleri büyüme, çoğalma, farklılaşma, hücre siklusu, kontraksiyon, apoptosis, sekresyon ve motilite gibi biyolojik fonksiyonları düzenlemek için diğer proteinlerle etkileşime giren kalsiyum aktivi sinyal proteinleridir (Botelho ve ark., 2012; Yao ve ark., 2007). S-100 proteinlerinin immunboyanması, diagnostik patolojide ve histolojik çalışmalarda nöroektodermal kökenli dokuları tespit etmek için kullanılmaktadır. Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalar S-100 proteinlerinin sadece nöronal bir belirteç değil aynı zamanda kondrosit (Stefansson ve ark., 1982a), ovidukt epiteli (Walter ve Miller, 1996) ve adrenal bez (Stefansson ve ark., 1982b) gibi kökeni nöroektodermal olmayan dokularda da tespit edildiği yönündedir. Aynı zamanda birkaç memeli türünün ekzokrin bezlerinde de (insan, sıçan, koyun, köpek ve sığır) S-100 proteinleri tanımlanmıştır (Haimoto ve ark., 1987; Hirayama ve ark., 2000; Lauboeck ve Egerbacher, 1997; Marettová ve Legáth, 2008; Molin ve ark., 1984) ve bu proteinlerinin



Şekil 4. Sıçanların ekstraorbital (a, b) ve intraorbital-lakrimal bezlerinde (c, d) α -SMA immunreaksiyonu. A: Asinus, AK: Akırtıcı kanal, D: Kan damarı, S: Stroma, beyaz ok başları: α -SMA immunpozitif miyoepitel hücreler. Bar: 10 μ m.

Figure 4. α -SMA immunreaction in the extraorbital (a, b) and intraorbital lacrimal glands (c, d) of the rats. A: Acinus, AK: Duct, D: Blood vessel, S: Stroma, white arrow heads: α -SMA immunpositive myoepithelial cells. Scala bar: 10 μ m.



Şekil 5. Primer antikorsuz (wbS-100, S-100 α , S-100 β ve α -SMA) inkube edilen sıçanların ekstraorbital (a, b) ve intraorbital lakrimal bezlerinde (c, d) negatif immunreaksiyon. A: Asinus, AK: Akırtıcı kanal, D: Kan damarı. Bar: 10 μ m.

Figure 5. No immunostaining in the extraorbital (a, b) and intraorbital lacrimal glands (c, d) of the rat sections incubated without the primary antibody (wbS-100, S-100 α , S-100 β ve α -SMA). A: Acinus, AK: Duct, D: Blood vessel. Scale bars: 10 μ m.

sekresyonda spesifik rollerinin olduğu ileri sürülmüştür. Şimdiye kadar lakrimal bez üzerinde S-100 immunreaksiyonunu belirlemeye yönelik yapılan çalışmalar ise köpek (Hirayama ve ark. 2000) ve insanlarda (Tosaka, 1991) lakrimal bezin pleomorfik adenomasında, ayrıca insan (Kivelä, 1992) ve siğirların (Lauboeck ve Egerbacher, 1997) normal lakrimal bezine odaklıdır. Dolayısıyla sunulan çalışma sıçanların intraorbital ve ekstraorbital lakrimal bezlerinde wbS-100 proteini ve iki alt ünitesinin (S-100 α ve S-100 β) immunlokalizasyonunu inceleyen ilk çalışma niteliği taşımaktadır.

Bu çalışmaya göre sıçanların ekstraorbital lakrimal bezinin seröz karakterde olan asinuslarında (bez epiteli, salgı epiteli, korpus glandula) wbS-100, S-100 α ve S-100 β proteinlerinin membransel, sitoplazmik ve nuklear immunreaksiyonunun genel olarak intraorbital bezden daha yoğun olduğu saptanmıştır. İntraorbital lakrimal bezde ise salgı granüllerinden dolayı oldukça köpüklü bir sitoplazmaya sahip olan asinus epitel hücrelerinde en yoğun olarak wbS-100 immunreaksiyonuna rastlanırken, S-100 α immunreaksiyonu en çok çekirdekte, S-100 β immunreaksiyonunun ise salgı granüllerinin membranında ve asinus epitel hücrelerinin lateral membranlarında oldukça zayıf olduğu tespit edilmiştir. İnsanların lakrimal bezinde yapılan bir çalışmada da major ve aksesuar lakrimal bezlerinin sekretorik asiner hücrelerinde sitoplazmik ve nuklear wbS-100 immunreaksiyonuna rastlanmıştır (Kivelä, 1992). Siğirların lakrimal ve Harderian bezinde, wbS-100, S-100 α ve S-100 β immunreaksiyonunun asinus epitel ve akırtıcı kanal epitel hücrelerinin bazılarında nokta şeklinde olduğu tespit edilmiştir. Asinusların seröz hücrelerinde wbS-100 ve S-100 α immunreaksiyonuna rastlanılırken, mukoid hücrelerde wbS-100 ve S-100 β reaktivitesi saptanmıştır. Dolayısıyla lakrimal bezlerin asinus epitel hücrelerinde wbS-100 ve alt ünitesinin boyanma yoğunluklarındaki bu farklılığın hücre siklusu ve salgı aktivitelerindeki fonksiyonel farklılıktan kaynaklanabileceği sonucuna varılmıştır (Lauboeck ve Egerbacher, 1997). Mori ve ark. (1990) ise siğirların lakrimal bezinde (Lauboeck ve Egerbacher, 1997) yapılan çalışmadan farklı olarak sıçanların tükürük bezlerinde yer alan müköz hücrelerinin S-100 için reaksiyon vermediğini rapor etmiştir (Mori ve ark, 1990). Aynı şekilde koyunlarda mandibular tükürük bezinin hem seröz hem de müköz salgı hücrelerinde (Marettová ve Legáth, 2008) ve insanların normal tükürük bezinin asinus epitel hücrelerinde S-100 β immunreaksiyonu saptanmamıştır (Hara ve ark., 1983). Dolayısıyla koyunların, sıçanların ve insanların tükürük bezlerinde S-100 proteinlerini saptayamayan bu çalışmalardan farklı olarak sıçanlarda

hem ekstraorbital hem de intraorbital lakrimal bezlerin sadece seröz özellik gösteren salgı ünitelerinde değişen oranlarda wbS-100, S-100 α ve S-100 β immunreaksiyonu identifiye edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar, sıçanlarda lakrimal bez asinus epitel hücrelerinin ekzositozu için intrasellüler kalsiyum konsantrasyonunun önemli olduğunu ve dolayısıyla kalsiyum bağlayan S-100 proteinlerinin asinus epitel hücrelerinin sekresyonunda önemli bir rol üstlendiğini göstermektedir (Sundermeier ve ark., 2002).

S-100 proteinleri hücrelerde homo- ve heterodimer olarak bulunan kalsiyum sensör proteinlerdir. Ortamda milimolar düzeyde kalsiyum konsantrasyonu arttığında S-100 proteinleri yapısal değişikliklere uğrayarak hedef protein ile etkileşime girer. Biyolojik cevaba neden olan bu etkileşim sonucunda hedef proteinin fonksiyonunda da değişiklikler meydana gelir (Zimmer ve ark., 2003). Subsellüler lokalizasyon bu proteinlerin fonksiyonu üzerinde sinyal transdüksiyonu için önemli bir etkiye sahiptir. Yapılan immunohistokimyasal çalışmalarda beyin S-100 proteinlerinin, sitoplazma içinde diffuz bir şekilde yayılan "sitoplazmik fraksiyon" ve plazma membranı, dış mitokondrial membran, endoplazmik retikulum, Golgi aygıtı ve nuklear membranda lokalize olan "membranöz fraksiyon" olmak üzere iki fraksiyondan oluştuğu tespit edilmiştir (Cocchia, 1981). Daha sonra yapılan çalışmalarda ise sığır ve sıçan beyinlerinde yer alan S-100 proteinlerinin sitoplazmik (soluble) ve membran-bağlı formlarının birbirine benzediği (Donato ve ark., 1975) ve dolayısıyla membran-bağlı S-100'ün sitoplazmik S-100 ile aynı immunolojik, elektroforetik, spektrofotometrik fonksiyonel özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir (Donato ve ark., 1986). Şimdiye kadar yapılan bu çalışmalara ve insanların lakrimal bezinin sekretorik asiner hücrelerinde sitoplazmik ve nuklear wbS-100 immunreaksiyonunu saptayan çalışmaya benzer olarak (Kivelä, 1992) sıçanların her iki lakrimal bezinde de sitoplazmik, nuklear ve membransel wbS-100, S-100 α ve S-100 β immunlokalizasyonunun saptanması bu proteinlerin sıçan lakrimal bezinde de farklı subsellüler lokalizasyonlara sahip olduğunu ve asinus epitel hücrelerinin sekresyonuyla ilgili sinyal transdüksiyonu üzerinde farklı bir etkiye sahip olduğu şeklinde yorumlanabilir. Ayrıca insan düz kas hücrelerinde Mandinova ve ark. (1998)'nin yapmış olduğu çalışmaya göre; S-100A1 ve S-100A4'ün sitoplazmada özellikle sarkoplazmik retikulumda, S-100A6'nın da sarkoplazmik retikulum ve hücre nukleusunda, S-100A2'nin ise sadece nukleusta lokalize olduğu bildirilmiştir. Dolayısıyla bu bulgular sarkoplazmik retikulumda kontraksiyon modüle eden enzimlerle S-100A1, S-100A4 ve S-100A6'nın etkileşim halinde olduğunu ve aynı zamanda

bu proteinlerin kalsiyumun depolandığı sarkoplazmik retikulumdan kalsiyumun serbest bırakılmasını stimüle ettiği sonucuna varılmıştır (Mandinova ve ark., 1998; Treves ve ark., 1997). Sunulan çalışmada da sıçanların özellikle ekstraorbital lakrimal bezlerinde asinusları oluşturan seröz epitel hücrelerinin bazal kısmı kalsiyumu depo eden endoplazmik retikulum yönünden zengin olduğu için bu bölgede yoğun bir şekilde kalsiyum bağlayan wbS-100, S-100 α ve S-100 β proteinlerinin immunreaksiyonuna rastlanmıştır.

İnsanlarda lakrimal bezler modifiye tükürük bezleri olarak identifiye edilmektedir. Her iki bezde önce konjunktival ve daha sonra oral epiteli oluşturacak embriyonik ektodermin invaginasyonlarıyla şekillenir. Morfolojik olarak lakrimal bezler ve tükürük bezleri birbirine benzer olmasına rağmen, kanal sistemleri birbirlerinden farklıdır. Pars inisyalis ve pars sekretorya tükürük bezlerinde identifiye edilirken, lakrimal bezde bu iki kanal tanımlanmamıştır. Immunohistokimyasal olarak bazı minor farklılıklarla birlikte lakrimal bezlerde intralobuler ve interlobuler kanallardan bahsedilmektedir (Iwamoto ve Jacobiec, 1985). Sunulan çalışmada wbS-100, S-100 α ve S-100 β immunreaksiyonu sıçanların intraorbital ve ekstraorbital bezlerinin akıtıcı kanal epitelinde incelenmiş olup bu akıtıcı kanallarının sınıflandırılması yapılmamıştır. Reaksiyon tek bir akıtıcı kanal başlığı altında incelenmiştir. Dolayısıyla bu çalışmaya göre ekstraorbital bezlerinin akıtıcı kanal epitel hücrelerinin sitoplazmasındaki wbS-100, S-100 α ve S-100 β immunreaksiyonu çekirdeğe oranla daha fazla olduğu tespit edilmiştir. İntraorbital bezde ise S-100 α immunreaksiyonuna en çok kanal epitel hücrelerinin çekirdeğinde rastlanırken, wbS-100 immunreaksiyonu sitoplazmada saptanmıştır. S-100 β immunreaksiyonu ise oldukça zayıftır. Akıtıcı kanal ayrımının yapılmadığı insanların normal lakrimal bez dokusunun kanal epitel hücrelerinde de S-100 proteinleri identifiye edilmiştir (Leoncini ve ark., 1988; Tosaka, 1991). İnsanların lakrimal bezinde yapılan başka bir çalışmada ise akıtıcı kanallar pars inisyalis, pars ekskretorya, intralobuler ve interlobuler kanallar şeklinde sınıflandırılmış ve bu kanallarda wbS-100 immunreaksiyonu incelenmiştir. Bu çalışmaya göre pars inisyalisin luminal ve bazal hücrelerinin hem sitoplazmasında hem de çekirdeğinde wbS-100 immunreaksiyonuna rastlanılırken, diğer kanallarda da wbS-100 reaksiyonunun immunpozitif olduğu tespit edilmiştir (Kivelä, 1992). Sığırların lakrimal bezlerinin akıtıcı kanal epitel hücrelerinde ise S-100 α saptanmıştır. Ayrıca bu çalışmada sığırların ekzokrin bezlerinin akıtıcı kanal sistemleri boyunca wbS-100, S-100 α ve S-100 β 'nin farklı bir dağılım gösterdiği ve buna göre; wbS-100 ve S-100 β immunreaksiyonuna pars inisyalis kanal epitelinde rastlanılırken, S-100 α 'nın pars

sekretorya kanal epiteli için pozitif olduğu saptanmıştır. Dolayısıyla bu durum S-100 α 'nın pars sekretorya akıtıcı kanal epitelinde rezorpsiyon ve sekresyon ile ilişkili iken, S-100 β 'nin, glandular hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını düzenlediği ve aynı zamanda asiner ekzositozu yönettiği şeklinde yorumlanmıştır (Lauboeck ve Egerbacher, 1997).

Miyoeptel hücreleri, ter bezleri, meme bezleri, lakrimal bezler, tükürük bezleri, Harderian bezi ve prostat gibi bezsel organlarda asinus (salgı) epiteli ve bazal membran arasında uzanan kontraktıl yapıda olan hücrelerdir. Miyoeptel hücreler, lakrimal bezin gelişimi, homeostazisi, normal yapının stabilizasyonu ve salgı asinuslarının polaritesinde anahtar bir role sahiptir. Miyoeptel hücrelerinin spesifik belirteçlerinin (α -SMA, sitokeratin 5/6, sitokeratin 14) identifikasyonu, normal ve hastalıklı lakrimal bezlerin morfolojisinin ve fonksiyonunun anlaşılmasını mümkün kılmaktadır (Makarenkova ve Dartt, 2015). Sunulan çalışmada sıçanların ekstraorbital ve intraorbital lakrimal bezlerinde miyoeptel hücre belirteci olan α -SMA proteini ve aynı zamanda kontraksiyonda faaliyet gösteren ve kalsiyumu bağlayan proteinler sınıfına ait S-100 proteinlerinin immunreaksiyonu incelenmiştir. Yapılan bu çalışmaya göre; ekstraorbital lakrimal bezde miyoeptel hücrelerinin hem sitoplazmasında hem de çekirdeğinde wbS100, S-100 α , S100 β ve α -SMA immunreaksiyonu saptanmıştır. İntraorbital lakrimal bezin miyoeptel hücrelerinde ise wbS100, S-100 α ve α -SMA immunreaksiyonu tespit edilirken, S100 β immunreaksiyonuna rastlanmamıştır. Köpeklerin lakrimal bezinin pleomorfik adenomlarında yapılan bir çalışmada da miyoeptel hücrelerinin α -SMA için immunpozitif olduğu ve S-100 immunreaksiyonunun ise nadir olarak pleomorfik miyoeptel hücrelerinde gözlemlendiği tespit edilmiştir (Hirayama ve ark., 2000). Aynı şekilde Kivelä (1992) insan lakrimal bezinde bulunan miyoeptel hücrelerinin S-100, α -SMA, vimentin ve glial fibrillar asidik protein (GFAP) için immunpozitif olduğunu saptamıştır. Dolayısıyla hem yapmış olduğumuz bu çalışmada hem de lakrimal bez üzerine yapılan diğer çalışmalarda miyoeptel hücrelerinde S-100 ve α -SMA pozitif reaksiyonunun saptanması bu proteinlerin kontraksiyonda rol aldığını ve aynı zamanda miyoeptel hücrelerinin belirlenmesinde bir önemli bir belirteç olabileceğini düşündürmektedir.

Endotel hücreleri, anjiogenezis ve vaskulogenezis gibi birçok vasküler fizyolojik olayları düzenleyen ve bu fonksiyonlarını gerçekleştirmek için ortamda kalsiyum iyonlarına ihtiyaç duyan hücrelerdir. Vasküler endotel hücrelerdeki kalsiyum homeostazisinin bozulmasının bu hücrelerde fonksiyonel yetersizliğe yol açtığı bildirilmiştir. Dolayısıyla kalsiyum bağlayan bir protein

olan S-100'ün vasküler fizyolojide rol oynadığı sonucuna varılmıştır. (Bao ve ark., 2012). Cruzana ve ark. (2003) buffalo testisinde yapmış oldukları bir çalışmada wbS-100, S-100 α ve S-100 β immunreaksiyonunun endotel hücrelerinde pozitif olduğunu bildirirlerken, kedi testisinde yapılan başka bir çalışmada ise wbS-100 ve her iki alt ünitesinin endotel hücrelerinde negatif olduğu tespit edilmiştir (Cruzana ve ark., 2000). Koyunların mandibular tükürük bezinde yer alan endotel hücrelerinde de kuvvetli wbS-100 immunreaksiyonuna rastlanmıştır (Marettová ve Legáth, 2008). Sıçanların ekstraorbital ve intraorbital lakrimal bezinde yapılan bu çalışmada da buffalo testisinde ve koyunların tükürük bezinde yapılan çalışmalara benzer olarak endotel hücrelerinin hem çekirdeğinde hem de sitoplazmasında wbS-100, S-100 α ve S-100 β immunreaksiyonunun saptanması kalsiyum bağlayan bu proteinlerin vasküler fizyolojide rol aldığını göstermektedir.

Sunulan çalışmada ayrıca intraorbital lakrimal bezin intersitisyel bağ dokusu (stroma) içinde bulunan makrofajların sitoplazmasında en yoğun derecede wbS-100 ve S-100 β immunreaksiyonuna rastlanılırken, çekirdekte S-100 α immunreaksiyonunun daha kuvvetli olduğu tespit edilmiştir. Ekstraorbital lakrimal bezde ise makrofajların hem çekirdeğinde hem de sitoplazmasında wbS-100 ve S-100 α immunreaksiyonu saptanırken, S100 β immunreaksiyonunun çekirdekte negatif olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda fagosit-spesifik kalsiyum bağlayan protein olan S-100 ailesinin, doğal immun sistemde önemli rol oynayan fagositler tarafından salgılanan ve eksprese edilen pro-inflamatuvar moleküller olduğu ileri sürülmüştür. Ayrıca, yangısel süreçte S-100 ailesinin üç üyesinin (S-100A8, S-100A9 ve S-100A12) eklem sıvısı, balgam, serum/plazma ve dışkıda yüksek konsantrasyonlarda eksprese edildiği belirtilmiştir. Arthritis, kronik inflamatuvar akciğer ve bağırsak hastalığı gibi enfeksiyöz olmayan hastalıklarda inflamasyonun diagnostik teşhisinde kullanılan bu S-100A8, S-100A9 ve S-100A12 proteinlerinin, rutin olarak kullanılan inflamasyon parametrelerinden çok daha hassas olan fagosit aktivasyonunu gösterdiği rapor edilmiştir (Foell ve ark., 2004).

Sonuç

Sunulan bu çalışmada, sıçanların intraorbital ve ekstraorbital lakrimal bezlerinin asinus epiteli, akıtıcı kanal epiteli, miyoeptel ve kan damarlarının endotel hücrelerinde wbS-100, S-100 α , S-100 β ve α -SMA proteinlerinin değişen derecelerde immunlokalizasyonları ve dağılımları incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar semikantitatif immunohistokimyasal analizler ile sınırlı olduğundan sıçanların lakrimal bezlerinde bu proteinlerin görevlerinin tam olarak anlaşılabilmesi için

detaylı deneysel çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bununla birlikte sıçanların her iki lakrimal bezinin tüm yapısal komponentlerinde kalsiyum bağlayan S-100 proteinlerinin çekirdek, sitoplazma ve hücre membranlarındaki lokalizasyonları dikkate alındığında, başta sekresyon olmak üzere kalsiyum homeostazisi, kontraksiyon, protein sentezi, enzim aktivitesi, vasküler fizyoloji ve yangısal cevap gibi birçok kritik fonksiyonlarının olabileceği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Bao, L., Odell, A.F., Stephen, S.L., Wheatcroft, S.B., Walker, J.H., Ponnambalam, S., 2012.** The S100A6 calcium-binding protein regulates endothelial cell-cycle progression and senescence. *FEBS Journal* 279, 4576-4588.
- Botelho, H.M., Fritz, G., Gomes, C.M., 2012.** Analysis of S100 oligomers and amyloids. *Methods in Molecular Biology* 849, 373-386.
- Brown, N.M., Lamartiniere, C.A., 2000.** Genistein regulation of transforming growth factor- α , epidermal growth factor (EGF), and EGF Receptor expression in the rat uterus and vagina. *Cell Growth and Differentiation* 11, 255-260.
- Case, R.M., Ansah, T.A., Dho, S., Miziniak, A., Wilson, L., 1988.** Calcium homeostasis in exocrine secretory cells. In: Gerdary CH, Gilles R, Bolis L (Eds), Calcium and calcium binding proteins. Molecular and functional aspects. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 211-219.
- Cocchia, D., 1981.** Immunocytochemical localization of S-100 protein in the brain of adult rat. An ultrastructural study. *Cell and Tissue Research* 214, 529-540.
- Cruzana, B.C., Hondo, E., Kitamura, N., Nakagawa, M., Yamada, J., 2000.** Differential localization of immunoreactive α - and β -subunits of S-100 protein in feline testis. *Anatomia Histologia Embryologia* 29, 83-86.
- Cruzana, B.C., Budipitojo, T., Ocampo, G.D., 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, 142-145
- Dannies, P.S., Lewine, L., 1971.** Structural properties of bovine brain S-100 protein. *Journal of Biological Chemistry* 246, 6276-6283.
- Donato, R., 1991.** Perspectives in S-100 biology. *Cell Calcium* 12, 713-726.
- Donato, R., 1999.** Functional roles of S-100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochimica et Biophysica Acta* 1450, 191-231.
- Donato, R., Michetti, F., Miani, N., 1975.** Soluble and membrane-bound S-100 protein in cerebral cortex synaptosomes. Properties of the S-100 receptor. *Brain Research* 98, 561-573.
- Donato, R., Prestagiovanni, B., Zelano, G., 1986.** Identity between cytoplasmic and membrane-bound S-100 proteins purified from bovine and rat brain. *Journal of Neurochemistry* 46, 1333-1337.
- Foell, D., Frosch, M., Sorg, C., Roth, J., 2004.** Phagocyte-specific calcium-binding S100 proteins as clinical laboratory markers of inflammation. *Clinica Chimica Acta* 334, 37-51.
- Gugliotta, P., Sapino, A., Macri, L., Skalli, O., Gabbiani, G., Bussolatti, G., 1988.** Specific Demonstration of myoepithelial cells by anti-alpha smooth muscle actin antibody. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 36, 659-663.
- Haimoto, H., Hosoda, S., Kato, K., 1987.** Differential distribution of immunoreactive S-100 α and S-100 β proteins in normal non-nervous human tissues. *Laboratory Investigation*, 57, 489-498.
- Hara, K., Ito, M., Takeuchi, J., Iijima, S., Endo, T., Hidaka, H., 1983.** Distribution of S-100b protein in normal salivary glands and salivary gland tumors. *Virchows Archiv A* 401, 237-249.
- Hirano, T., Gluckman, J.L., de Vries, E.J., 1990.** The expression of a vascular smooth muscle actin in salivary gland tumors. *Archives of Otolaryngology- Head and Neck Surgery* 116, 692-696.
- Hirayama, K., Kagawa, Y., Tsuzuki, K., Kotani, T., Azuma, Y., Yoshino, T., Taniyama, H., 2000.** A pleomorphic adenoma of the lacrimal gland in a dog. *Veterinary Pathology* 37, 353-356.
- Isobe, T., Okuyama, T., 1981.** The amino acid sequence of the subunit in bovine brain S-100a protein. *European Journal of Biochemistry* 166, 79-86
- Isobe, T., Ishioka, N., Okuyama, T., 1981.** Structural relation of two S-100 proteins in bovine brain; subunit composition of S-100a protein. *European Journal of Biochemistry* 115, 469-474.
- Iwamoto, T., Jacobiec, F.A., 1985.** Lacrimal glands. In: Duane, T.D., Jaeger, E.A., (Eds.), *Biomedical Foundation of Ophthalmology*. Vol 1. Revised ed. Philadelphia, Harper & Row, 30, 1.
- Kawashima, M., Kawaikata, T., Inaba, T., Okada, N., Ito, M., Shimmura, S., Watanabe, M., Shinmura, K., Tsubota, K., 2012.** Dietary lactoferrin alleviates age-related lacrimal gland dysfunction in mice. *PLoS One* 7, e33148.
- Kivelä, T., 1992.** Antigenic profile of the human lacrimal gland. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 40, 629-642.
- Komarek, V., Gembardt, C., Krinke, A., Mahrous, T.A., Schaetti, P., 2000.** Synopsis of The Organ Anatomy. In: Krinke, G.J., *Handbook of The Experimental Animals. The Laboratory Rat*. London, Academic Press, pp. 283-319.
- Lauboeck, S., Egerbacher, M., 1997.** Distribution of S-100 protein and its subunits in bovine exocrine glands. *Histochemistry and Cell Biology* 108, 83-91.

- Lee, S.K., Kim, E.C., Chi, J.G., Hashimura, K., Mori, M., 1993.** Immunohistochemical detection of S-100, S-100 α , S-100 β proteins, glial fibrillary acidic protein, and neuron specific enolase in the prenatal and adult human salivary glands. *Pathology, Research and Practice* 189, 1036-1043.
- Leoncini, P., Cintonino, M., Vindigni, C., Leoncini, L., Armellini, D., Bugnoli, M., Skalli, O., Gabbiani, G., 1988.** Distribution of cytoskeletal and contractile proteins in normal and tumor bearing salivary and lacrimal gland. *Virchows Archive A: Pathological Anatomy and Histopathology* 412, 329-337.
- Liman, N., 2011.** Duyu Sistemi. Özer, A. (Ed.), *Veteriner Özel Histoloji, Birinci Baskı. Nobel Tıp Kitabevi, Ankara, Türkiye*, pp. 269-322.
- Makarenkova, H.P., Dartt, D.A., 2015.** Myoepithelial cells: Their origin and function in lacrimal gland morphogenesis, homeostasis, and repair. *Current Molecular Biology Reports*, 1, 115-123.
- Mandinova, A., Atar, D., Schäfer, B.W., Spiess, M., Aebi, U., Heizmann, C.W., 1998.** Distinct subcellular localization of calcium binding S-100 proteins in human smooth muscle cells and their relocation in response to rises in intracellular calcium. *Journal of Cell Science*, 111, 2043-2054.
- Marettová, E., Legáth, J., 2008.** Distribution of S-100 protein in mandibular salivary gland of the sheep. *Folia Veterinaria* 52, 181-184.
- Molin, S-O, Rosengren, L., Haglid, K., Baudier, J., Hamberger, A., 1984.** Differential localization of "Brain-specific" S-100 and its subunits in rat salivary glands. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 32, 805-814.
- Moore, B.W., 1965.** A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 19, 739-744
- Mori, M., Kasai, T., Yuba, R., Chomette, G., Auriol, M., Vaillant, J.M., 1990.** Immunohistochemical distribution studies of S-100 protein α and β subunits in adenoid cystic carcinoma of salivary glands. *Virchows Archives Journal* 59, 115-123.
- Mori, M., Yamada, K., Ohomura, H., Wataru, K., Takai, Y., Iig, E., Schäfer, B.W., Heizmann, C.W., 1998.** Immunohistochemical localization of S100A1 and S100A6 in postnatally developing salivary glands of rats. *Histochemistry and Cell Biology* 110, 579-587.
- Petersen, O.H., 1992.** Stimulus secretion coupling: cytoplasmic calcium signals and the control of ion channels in exocrine acinar cells. *Journal of Physiology* 448, 1-51.
- Putney, J.W., Bird, G.S., 2014.** Calcium signaling in lacrimal glands. *Cell Calcium* 55, 290-296.
- Sandusky, G.E., Carlton, W.W., Wightman, K.A., 1985.** Immunohistochemical staining for S-100 protein in the diagnosis of canine amelanotic melanoma. *Veterinary Pathology* 22, 577-581.
- Stefansson, K., Wollmann, R.L., Moore, B.W., Arnason, B.G., 1982a.** S-100 protein in human chondrocytes. *Nature* 295, 63-64.
- Stefansson, K., Wollmann, R.L., Moore, B.W., 1982b.** Distribution of S-100 protein outside the central nervous system. *Brain Research* 234, 309-317.
- Stern, M.E., Gao, J., Siemasko, K.F., Beuerman, R.W., Pflugfelder, S.C., 2004.** The role of the lacrimal functional unit in the pathophysiology of dry eye. *Experimental Eye Research* 78, 409-416.
- Sundermeier, T., Matthews, G., Brink, P.R., Walcott, B., 2002.** Calcium dependence of exocytosis in lacrimal gland acinar cells. *American Journal of Physiology- Cell Physiology* 282, 360-365.
- Tosaka, Y., 1991.** Immunohistochemical study of pleomorphic adenoma of lacrimal gland. *Japanese Journal Ophthalmology* 35, 367-376.
- Treves, S., Scutari, E., Robert, M., Groh, S., Ottolia, M., Prestipino, G., Ronjat, M., Zorzato, F., 1997.** Interaction of S-100A1 with the Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) of skeletal muscle. *Biochemistry* 36, 11496-11503.
- Walter, I., Miller, I., 1996.** S-100 protein subunits in bovine oviduct epithelium: in situ distribution and changes during primary cell culture. *Histochemical Journal* 28, 671-680.
- Yao, R., Lopez-Beltran, A., MacLennan, G.T., Montironi, R., Eble, J.N., Cheng, L., 2007.** Expression of S100 protein family members in the pathogenesis of bladder tumors. *Anticancer Research* 27, 3051-3058.
- Zimmer, D.B., Sadosky, P.W., Weber, D.J., 2003.** Molecular mechanisms of S-100-target protein interactions. *Microscopy Research and Technique* 60, 552-559.