

## Pre-pubertal ve Pubertal Dönemlerde Ankara Tavşanı Testis ve Epididimisinde S100 Proteininin İmmunohistokimyasal Lokalizasyonu

Feyzullah BEYAZ, Güner KÜÇÜK BAYRAM, Emel ALAN  
Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji Embriyoloji ABD, Kayseri-TÜRKİYE

**Özet:** Çalışma, ülkemize has bir kültür hayvanı ve bilinen en eski tavşan ırkı olan Ankara tavşanının pre-pubertal ve pubertal dönem testis ve epididimisinde S100 proteinin varlığını ve lokalizasyonunu immunohistokimyasal olarak belirlemek amacıyla planlanmıştır. Çalışmanın materyalini, altısı üç aylık (pre-pubertal dönem) ve altısı da sekiz aylık (pubertal dönem) toplam on iki adet sağlıklı, beyaz Ankara tavşanından alınan testis ve epididimiler oluşturdu. S100 proteinin lokalizasyonunun belirlenmesi amacıyla strept-ABC immunohistokimyasal boyama tekniği uygulandı. Pre-pubertal dönemdeki tavşan testislerinde, seminifer tubül duvarındaki hücrelerden sadece Sertoli hücreleri ile inter-tübüler alanlarda bazı Leydig hücrelerinde S100 pozitifliği belirlendi. Pubertal dönemdeki tavşan testislerinde ise, seminifer tubülüslerin duvarındaki Sertoli hücrelerinde, terminal segmentin modifiye Sertoli hücrelerinde ve tubulus rektus epitelinde S100 pozitif immunreaksiyon gözlemlendi. Multifonksiyonel özellikteki S100 proteinin Ankara tavşanı testislerindeki hücresel lokalizasyonunun laboratuvar hayvanları, primatlar ve karnivorlardan daha çok domuz ve ruminant testislerine benzerlik gösterdiği sonucuna varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Ankara tavşanı, epididimis, S100 proteini, testis.

### Immunohistochemical Localization of S100 Protein in the Pre-pubertal and Pubertal Angora Rabbits Testis and Epididymis

**Summary:** S100 proteins are calcium binding proteins which play an important role in various cellular activities, interacting with different target proteins. There is no available information about the localization of S100 protein in the testis and epididymis of Angora rabbit. The testis and epididymis patterns taken from six, three months (pre-pubertal stage) and six, eight months (pubertal stage) healthy, white Angora rabbits formed the material of our study. For the determination of the localization of S100 protein, a strept-ABC immunohistochemical staining procedure was applied. In the pre-pubertal rabbit testis, S100 positive immunoreactivity was only determined in the Sertoli cells of seminiferous tubules and some Leydig cells in intertubular regions. In the pubertal rabbit testis, S100 positive immunoreaction was shown in the Sertoli cells in seminiferous tubules, modified Sertoli cells in the terminal segment and epithelium of tubulus rectus. 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.

**Key Words:** Angora rabbit, epididymis, S100 proteins, testis.

### Giriş

İsmini 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 (8, 9, 10, 14, 15). S100 proteinleri, hücre içi kalsiyum metabolizmasında önemli rolleri olan ve etkisini vimentin, desmin, tubulin, p53 gibi farklı hedef proteinlerle etkileşime girerek gösteren moleküllerdir (15, 21, 22, 27, 28). S100 proteini ilk olarak beyinde gliya hücrelerinde ve periferik sinir dokuda Schwann hücrelerinde tespit edilmiştir (22). S100 proteinleri, bu özellikleri nedeniyle uzun yıllar sinir sistemine ait moleküller olarak düşünülmüştür (3). Ancak, daha sonra yapılan immunohistokimyasal ve biyokimyasal çalışmalar bu proteinlerin sinir dokusu dışında özellikle testis

gibi bazı organlarda da bulunabilirliğini göstermiştir (11, 13, 20, 26). Günümüzde, insanlarda farklı dokularda lokalize olan yirmi beş farklı S100 proteininin varlığı bildirilmiştir (19, 25).

Aminoasit dizilimleri farklı alfa (S100 $\alpha$ ) ve beta (S100 $\beta$ ) 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 Ca<sup>2+</sup> homeostazisi gibi farklı hücre fonksiyonlarında önemli görev alır (8, 9, 10, 15, 27).

S100 proteinlerinin, insan (13, 20) ve maymun (11), kedi (2, 4), köpek (2), boğa (1, 2), koç (2), bizon (6), manda (5), domuz (2), at (2), sığan (2, 20), fare (7, 23), ördek (26), gerbil, kobay ve hamster (23) gibi çeşitli hayvanların testislerindeki farklı hücrelerdeki immunohistokimyasal lokalizasyonu üzerinde araştırmalar bulunmaktadır. Yapılan taramalarda, tavşan testis ve epididimisinde S100

proteinin varlığına ve hücrel lokalizasyonuna dair herhangi bir kaynağa rastlanılmamıştır. Çalışma, ülkemize has bir kültür hayvanı ve bilinen en eski tavşan ırkı olan Ankara tavşanının pre-pubertal ve pubertal dönem testis ve epididimisinde S100 proteinin varlığını ve lokalizasyonunu immunohistokimyasal olarak belirlemek amacıyla planlanmıştır.

### Gereç ve Yöntem

Çalışmada materyal olarak, etik kurul onayı alınmış (ERÜ Veteriner Fakültesi Etik Kurulu, 09.04.2003 tarihli, 24 toplantı sayılı, 25 karar nolu araştırma) farklı bir çalışmada kullanılan altı adet üç aylık pre-pubertal dönemdeki ve altı adet sekiz aylık pubertal dönemdeki sağlıklı, erkek, beyaz Ankara tavşanlarından temin edilen 24 adet testis kullanıldı. Tavşanlar, sodyum pentobarbital uygulaması ile ötanazi edildikten hemen sonra hayvanların testisleri çıkarıldı. Testisler, epididimisin tam ortasından geçecek şekilde uzunlamasına bir ensizyonla iki eşit parçaya ayrıldı. Bouine tespit solüsyonunda 12 saat süreyle tespit edilen dokular sırasıyla dereceli alkoller, metil benzoat ve benzol serilerinden geçirilerek parafinde bloklandı. Parafin bloklardan adhesivli lamlara 5 µm kalınlığında alınan kesitlere, S100 proteininin testis ve epididimisteki lokalizasyonunun belirlenmesi amacıyla strept-ABC immunohistokimyasal boyama yöntemi uygulandı (16). Kesitler, endojen peroksidazın inaktivasyonu amacıyla metanolde hazırlanan % 3'lük hidrojen peroksitte 20 dakika süreyle tutuldu. Ardından antijen retrieval işlemi uygulanmaksızın, non-spesifik bağlanmaları engellemek için %10'luk keçi serumu (Labvision, Ultravision kit, TM-125-HL) ile 5 dakika süreyle muamele edildi. Bu işlemden sonra, PBS'le 1/200 oranında sulandırılan monoklonal mouse anti-S100 (Thermo Scientific Kat No. MS-296-P, Klon; 4C4.9) primer antikor ile kesitler 1 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Daha sonra, kesitler 20 dakika süreyle biotinli anti-mouse sekonder antikor (Labvision, Ultravision kit, TM-125-HL) ve 20 dakika süreyle de avidin-peroksidaz solüsyonlarıyla (Labvision, Ultravision kit, TM-125-HL) muamele edildi. 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 hematoksileni uygulandı. Yıkamalar PBS (Phosphate buffer saline, 0.01 M, pH;7.4) ile yapılırken, tüm boyama işlemleri oda ısısında bir nem kamerası (Shandon) içerisinde gerçekleştirildi. Pozitif kontrol olarak, S100 proteini için tavşanların beyin kesitleri kullanıldı. Negatif kontrol için primer antikorların yerine non-

spesifik immun serum damlatılarak geriye kalan boyama işlemlerine normal boyamalarda olduğu gibi devam edildi.

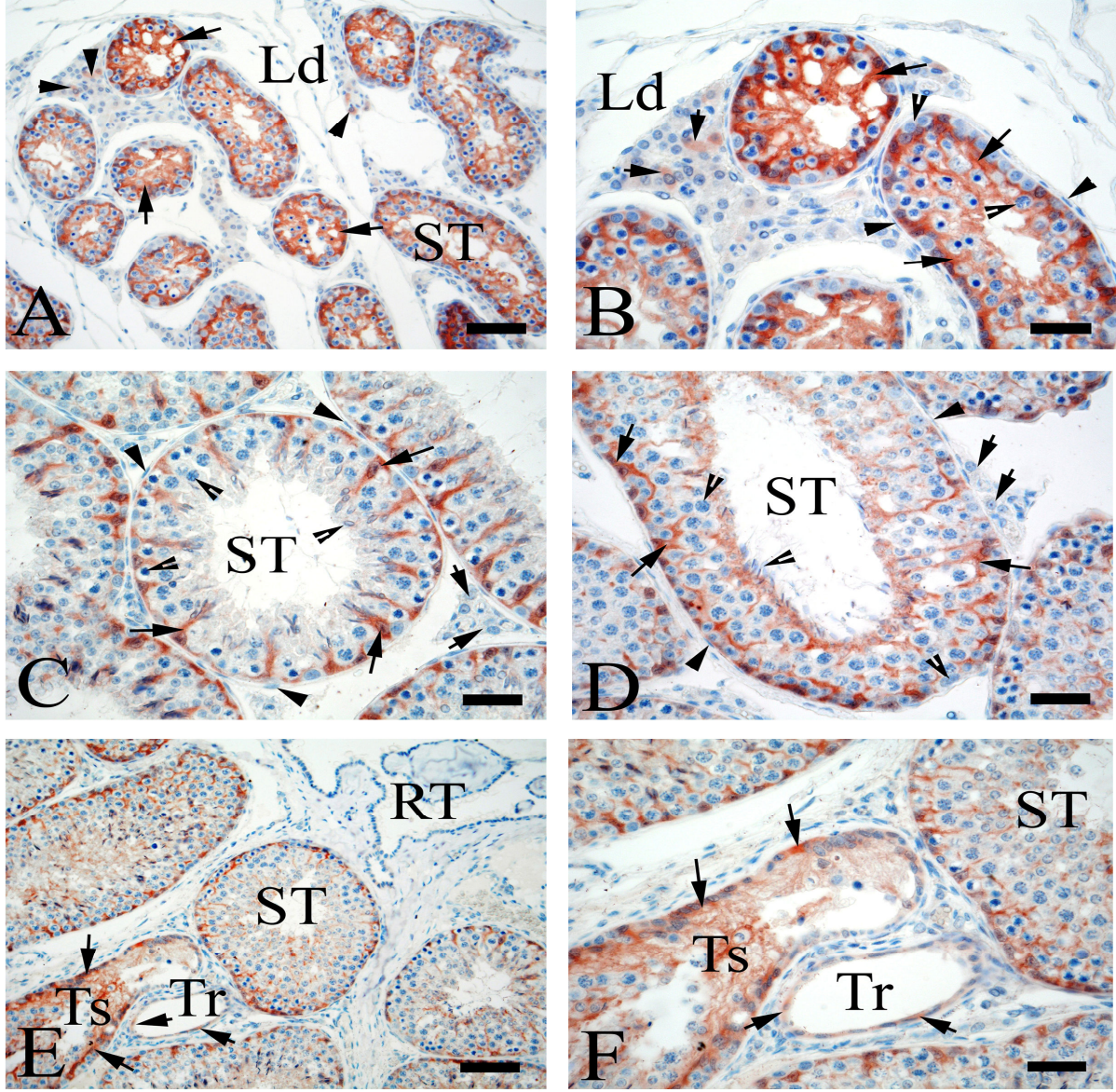
### Bulgular

Anti-S100 primer antikor ile yapılan immunohistokimyasal boyamalarda, pre-pubertal dönemdeki tavşan testislerinde seminifer tubül duvarındaki Sertoli hücrelerinin hem sitoplazmalarında ve hem de çekirdeklerinde S100 pozitif immunreaksiyon gözlenirken, seminifer tubüllerde değişik gelişme aşamalarındaki germ hücrelerinde ve peritubüler hücrelerde S100 negatif immunreaksiyon tespit edildi (Şekil 1A ve 1B). İntertubüler alanlarda bazı Leydig hücrelerinin sitoplazmalarında pozitif immunreaksiyon gözlenirken reaksiyon şiddetinin Sertoli hücrelerine göre daha zayıf olduğu dikkati çekti (Resim 1A ve 1B). Bununla birlikte, damar endotellerinde (Şekil 1B), intratestiküler kanal, duktuli eferentis ve duktus epididimis epitellerinde ise negatif immunreaksiyon saptandı.

Pubertal dönemdeki 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 1C ve 1D). Farklı gelişme aşamalarındaki germ hücreleri ve peritubüler hücrelerde ise immunreaksiyon gözlenmedi (Şekil 1C ve 1D). İntertubüler alanlarda, Leydig hücreleri, kan ve lenf damarı endotelleri ve bağ dokusu hücreleri de S100 negatif immunreaksiyon gösterdiler (Şekil 1C ve 1D). 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 1E ve 1F), rete testis (Şekil 1E), duktuli eferentes ve duktus epididimidis epitellerinin ise negatif immunreaktivite gösterdikleri saptandı.

### Tartışma ve Sonuç

S100 proteininin insan (13, 20) ve maymun (11), kedi (2, 4), köpek (2), boğa (1, 2), koç (2), bizon (6), manda (5), domuz (2), at (2), rat (2, 20), fare (7, 23), ördek (26), gerbil, kobay ve hamster (23) gibi hayvanların testislerindeki lokalizasyonları ile ilgili çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Buna karşın, çeşitli hücrel fonksiyonlara sahip bu proteinin tavşan testisi ve epididimisindeki varlığı ve hücrel lokalizasyonu ile ilgili herhangi bir kaynak bulunmamaktadır. Bu durumun muhtemel nedeni,



**Şekil 1.** Ankara tavşanı testisinde S100 immunreaktivitesi, immunperoksidaz, AEC.

A) Pre-pubertal dönemde, semifer tubüllerde (ST) S100 immunreaktivitesi (uzun oklar), intertübüler alanlarda S100 immunpozitif Leydig hücreleri (kısa oklar) ve immunnegatif lenf damarları (Ld). Bar; 50 µm.

B) Pre-pubertal dönemde, semifer tubüllerde (ST) S100 pozitif Sertoli hücreleri (uzun oklar), değişik gelişme aşamalarında immunnegatif germ hücreleri (çentikli oklar) ile peritübuler hücreler (ok başları) ve intertübuler alanlarda immunpozitif Leydig hücreleri (kısa oklar) ile immunnegatif lenf damarları (Ld). Bar; 25 µm.

C) Pubertal dönemde, seminifer tubüllerde (ST) S100 pozitif Sertoli hücreleri (uzun oklar), değişik gelişme aşamalarında immunnegatif germ hücreleri (çentikli oklar) ile peritübuler hücreler (ok başları) ve intertübuler alanlarda immunnegatif Leydig hücreleri (kısa oklar). Bar; 25 µm.

D) Pubertal dönemde, seminifer tubüllerde (ST) S100 pozitif Sertoli hücreleri (uzun oklar), değişik gelişme aşamalarında immunnegatif germ hücreleri (çentikli oklar) ile peritübuler hücreler (ok başları) ve intertübuler alanlarda immunnegatif Leydig hücreleri (kısa oklar). Bar; 25 µm.

E) Pubertal dönemde, seminifer tubül (ST) ve tubulus rektus (Tr) arasındaki geçiş bölgesi olan terminal segmentteki hücrelerde (Ts) S100 immunreaktivitesi (uzun oklar), tubulus rektus epitelinde S100 pozitif hücreler (kısa oklar) ve immunnegatif rete testis (RT) epiteli, 50 µm.

F) Pubertal dönemde, terminal segmentte (Ts) S100 pozitif modifiye Sertoli hücreleri (uzun oklar), tubulus rektus epitelinde (TR) S100 pozitif hücreler (kısa oklar) ve S100 pozitif Sertoli hücrelerini içeren seminifer tubüller (ST), Bar; 25 µm.

geçmişte S100 proteinlerine karşı hazırlanan tüm antikörlerin tavşan kaynaklı olması ve bu antikörlerin kullanımının tavşanlarda spesifik olmayan bağlanmalarla sonuçlanması olabilir. Bununla birlikte sunulan bu çalışmada, sıgır beyininden izole edilen S100 proteinine karşı farelerde hazırlanmış olan ticari bir monoklonal primer antikor uygulanarak, S100 proteininin tavşan testisindeki varlığı ve hücrel 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 (17). 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 antikörünün kullanılması sonucunda, S100 proteinin pre-pubertal ve pubertal dönemdeki tavşan testislerinde bazı hücrelerde varlığı belirlenmiştir.

Sunulan çalışmada, anti-S100 primer antikoru 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 endotelinde, intratestiküler kanallarda, duktuli eferentlerde 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 (2, 4, 5, 6, 11, 13, 20). Buna karşın, pre-pubertal dönemdeki testisler üzerindeki araştırmalar (18) 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 (18). Sunulan bu çalışmada ise, pre-pubertal dönemde Leydig hücrelerinin bazıları pozitif bazıları ise negatif immunreaktivite sergilerken, pubertal dönemdeki Leydig hücrelerinde S100 im-

munreaktivitesinin kaybolduğu görülmüştür. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar doğrultusunda, tavşan testisi ve sıçan testisleri (18) arasında S100 proteinin Leydig hücrelerindeki immunreaktivitesi üzerine bir benzerlik kurulamamıştır. Bununla birlikte, intertübüler alanlardaki bazı Leydig hücrelerinde S100 immunreaktivitesinin 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 immunpozitif reaksiyon verirken, Leydig hücreleri, germ hücreleri, peritübüler hücreler, rete testis, duktuli efferentisi ile duktus epididimis epitelleri ve lenf ile kan damarı endotelileri ise S100 immunnegatif reaksiyon verdi. Gerek pre-pubertal gerekse de pubertal dönemdeki testislerde, Sertoli hücrelerindeki immunreaktivitenin kedi (2, 4), boğa (1, 2), koç (2), manda (5), domuz (2), at (2), ördek ve maymun (11) 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 (24) modifiye Sertoli hücrelerinin de kedi (2, 4), boğa (1, 2), koç, domuz, at (2) ve manda (5) testislerinde olduğu gibi güçlü S100 pozitif immunreaktivite gösterdiği dikkati çekti. Bunlara ilaveten, tubulus rektus epitelinin boğa (1, 2), koç (2), manda (5) ve domuz (2) testisinde olduğu gibi S100 pozitif reaksiyon gösterdiği saptandı.

İnsan (13, 20), kedi (2, 4), rat (2, 19), fare (7, 23), kobay, hamster ve gerbil (23) ve daha zayıf olarak at ve domuz (2) testislerindeki Leydig hücrelerinde S100 proteinin bulunduğu bildirilmesine karşın; sunulan çalışmada, pre-pubertal dönemdeki tavşan testislerinde bazı Leydig hücrelerinin S100 proteinini içerdikleri, pubertal dönemde ise pozitif reaksiyonun ortadan kalktığı görülmüştür.

Köpek (2), kedi (2, 4) ve rat (2, 20) testislerinde seminifer tubülleri çevreleyen peritübüler hücrelerin, boğa (1, 2), koç (2), manda (5) ve domuz (2) testislerinde rete testis epitelinin ve boğa (1, 2), koç (2), manda (5), bizon (6), domuz (2) ve rat (2, 20) 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 (13, 20) ve fare (7) 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 immunreaksiyonunun Sertoli hücreleri, modifiye Sertoli hücreleri ve düz tubulus epitel hücrelerine özgü olması nedeniyle tavşan testislerinin S100 pozitifitesi bakımından laboratuvar hayvanları (2, 7, 23) primatlar (11, 13, 20) ve karnivorlardan (2, 4) ziyade domuz (2) ve ruminant (1, 2, 5) testislerine daha benzerlik göstermiştir.

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 (8, 9, 10, 15, 27). S100 proteininin, insan ve farklı hayvan türlerinin testislerindeki değişik hücrelerde lokalize olması (2, 4, 5, 11, 19) 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 (15, 21, 25, 27, 28). Bununla birlikte S100 proteinlerinin testisteki fonksiyonları kesin olarak aydınlatılmamıştır. Ancak, bazı araştırmacılar (1, 2, 5) 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 (9, 10) ve Sertoli hücrelerinin gelişmekte olan germ hücrelerini destekleme ve koruma fonksiyonlarının sürdürülebilmesi için değişkenlik gösterebilen bir hücre iskeletine sahip olması (12) 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 (2, 5).

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.

### Kaynaklar

1. Amselgruber W, Sinowatz F, Schams D, Lehmann M, 1992. S-100 protein immunoreactivity in bovine testis. *Andrologia*, 24: 231-235.
2. Amselgruber W, Sinowatz F, Erhard M, 1994. Differential distribution of immunoreactive S-100 protein in mammalian testis. *Histochemistry*, 102: 241-245.
3. Bock E, 1978. Nervous system specific proteins. *J Neurochem*, 30(1): 7-14.
4. Cruzana BC, Hondo E, Kitamura N, Matsuzaki S, Nakagawa M, Yamada J, 2000. Differential localization of immunoreactive  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits of S-100 protein in feline testis. *Anat Histol Embryol*, 29(2): 83-86.
5. Cruzana BC, Budipitojo T, De Ocampo G, Sasaki M, Kitamura N, Yamada J, 2003. Immunohistochemical distribution of S-100 protein and subunits (S100- $\alpha$  and S100- $\beta$ ) in the swamp-type water buffalo (*Bubalus bubalis*) testis. *Andrologia*, 35(3): 142-145.
6. 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.
7. Czykier E, Sawicki B, Zabel M, 2000. S-100 protein immunoreactivity in mammalian testis and epididymis. *Folia Histochem Cytobiol*, 38 (4): 163-166.
8. Donato R, 1999. Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *BBA*, 1450(3): 191-231.
9. 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.

10. Donato R, 2003. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech*, 60 (6): 540-551.
11. 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.
12. Griswold MD, 1998. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Sem Cell Dev Biol*, 9(4): 411-416.
13. Haimato H, Hosoda S, Kato K, 1987. Differential distribution of immunoreactive S100- $\alpha$  and S100- $\beta$  proteins in normal nonnervous human tissues. *Lab Invest*, 57(5): 489-498.
14. 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.
15. Heizmann CW, Fritz G, Schafer BW, 2002. S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front Biosci*, 1(7): 1356-1368.
16. Hsu S, Raine L, Fanger H, 1981. Use of Avidin-Biotin Peroxidase Complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*, 29(4): 577-580.
17. 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.
18. Kagi U, Chafoulleas 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.
19. Marenholz I, Lovering RC, Heizmann CW, 2006. An update of the S100 nomenclature. *BBA*, 1763(11): 1282-1283.
20. 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.
21. McNutt NS, 1998. S100 family of multipurpose calcium-binding proteins. *J Cutan Pathol*, 25 (10): 521-529.
22. Moore B, 1965. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun*, 19(6): 739-744.
23. 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(5): 309-315.
24. 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.
25. Santamaria-Kisiel L, Rintala-Dempsey AC, Shaw GS, 2006. Calcium dependent and – independent interactions of the S100 protein family. *Biochem J*, 396: 201-214.
26. Sugimura M, Miura M, Suzuki Y, Atoji Y, 1989. S-100 immunoreactive cells in non-nervous duck tissues. *Avian Pathol*, 18(3): 503-510.
27. Zimmer DB, Cornwall EH, Landar A, Song W, 1995. The S100 protein family: history, function and expression. *Brain Res Bull*, 37(4): 417-429.
28. Zimmer DB, Sadosky PW, Weber DJ, 2003. Molecular mechanism of S100-target protein interactions. *Microsc Res Tech*, 60(6): 552-559.

**Yazışma Adresi:**

Yrd. Doç. Dr. Feyzullah BEYAZ  
 Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi  
 Histoloji Embriyoloji ABD.  
 Barış Manço Cad. No.1 38090  
 Kocasinan KAYSERİ  
 E-mail: fbeyaz@erciyes.edu.tr

