

Sıçanlarda implantasyonda endometriyum dokusunun hücreSEL ve sıvısal savunma sistemi hücreleri üzerinde histokimyasal ve histometrik araştırmalar II. Sıvısal savunma sistemi hücreleri

Ahmet Koç Mehmet Kanter

Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Van, TÜRKİYE

Özet: Bu çalışma, implantasyonda sıçan endometriyum dokusunun sıvısal savunma sistemi hücrelerinin dağılımları ve yoğunluklarının histolojik ve histometrik yöntemlerle belirlenmesi amacıyla yapıldı. Çalışmada, 42 adet dişi Wistar Albino sıçan kullanıldı. Sıçanlardan alınan uteruslardan hazırlanan kesitlere, plazma hücrelerini belirlemek için metil green - pironin boyama yöntemi yapıldı. Plazma hücrelerinin, implantasyonun ilk gününde, desidual alan ile birlikte endometriyumda fazla sayıda bulunduğu, implantasyonun ikinci ve üçüncü günlerinde ise azaldığı görüldü. İmplantasyonun dördüncü gününden itibaren son gününe kadar desidual alan içinde plazma hücrelerinin bulunmadığı, endometriyum'da ise bu hücrelerinin sayısının en az seviyede olduğu gözlemlendi. İmplantasyonun beşinci gününden altıncı gününe doğru reepitelizasyonla birlikte endometriyum'un kalınlaştığı ve plazma hücrelerinin sayısında artış olduğu belirlendi. Bu çalışmada, endometriyum dokusunun sıvısal savunma sistemi hücrelerinin implantasyonun farklı günlerine göre değişik dağılımlar ve yoğunluklar gösterdiği tespit edildi. Maternal immun tepkinin baskılanarak fötüs'un canlılığını sürdürmesinde, diğer bazı faktörlerin (genetik ve hormonal) yanı sıra implantasyon sürecinde endometriyum dokusunun savunma sistemi hücrelerinin dağılımlarında meydana gelen değişimlerinde etkili olabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Sıçan, Endometriyum, İmplantasyon, Sıvısal savunma hücreleri.

Investigation of the cellular and humoral immune system cells in the endometrium tissue of the rat with histochemical staining and histometric methods during implantation II. Humoral immune system cells

Abstract: This study was performed to investigate the distribution and density of the humoral immune system cells in the endometrium tissue of the rat with histological and histometric methods during implantation. Forty-two female Wistar albino rats were used. The plasma cells were stained with the methyl green-pyronin method. Many plasma cells were seen both in desidual area and endometrium at first day of implantation. The number of these cells decreased in these areas on the second and third days of implantation. There were no plasma cells in desidual area from the fourth day to the end of implantation. However, endometrium had few plasma cells during the same period. From the fifth through sixth days of implantation endometrium thickened and the number of plasma cells increased with reepithelization. In this study, the distribution and density of the humoral immune system cells in the endometrium tissue during implantation were determined. It was concluded that in the suppression of the maternal immune response to allow fetus survive, the changes in the distribution of immune system cells in endometrium during implantation may be important besides other factors such as genetically and hormonal determinants.

Key Words: Rat, Endometrium, Implantation, Humoral defence cell.

GİRİŞ

İmplantasyonda, endometriyum dokusunun sıvısal savunma sistemi hücrelerinin immunolojik reaksiyonlarının ortaya konulması ile döl veriminin artırılması, infertilite olgularının aydınlatılması,

gebeliğin erken dönemlerinde görülen embriyo kayıplarının önlenmesi ve maternal immun tepkinin baskılanarak fötüs'un canlılığını sürdürmesi gibi konuların aydınlatılmasına katkı sağlayacağı bildirilmektedir (1). Gebeliğin ikinci gününden implantasyonun üçüncü gününe kadar farelerde

endometriyumda plazma hücrelerinin sayısında bir artış olduğu bildirilmiştir (2). Farelerde endometriyum'da, plazma hücrelerinin sayısında implantasyonun birinci ve ikinci günlerinde artış olduğu ve bunların genellikle bezler etrafında yerleştikleri gösterilmiştir (3). İmmunoglobulin'lerle işaretlenmiş plazma hücrelerinin, farelerde implantasyonun ikinci gününde özellikle bezler çevresinde olmak üzere endometriyum'da az, miyometriyum'daki damarlar çevresinde ise fazla sayıda bulunduğu, benzer tablonun implantasyonun üçüncü ve dördüncü günlerinde de gözlemlendiği ve desidual alanda ise bu hücrelere az sayıda rastlandığı tespit edilmiştir (4).

Farelerde yapılan bir araştırmada, plazma hücrelerinin implantasyonun ikinci gününde endometriyumda özellikle bezler çevresinde yerleşmiş oldukları saptanmıştır (5). İnsanlar üzerinde yapılan çalışmada, gebe olmayan endometriyum'da az olarak bulunan plazma hücrelerinin ilk trimesterde arteriyoller ve bezler çevresinde oldukça fazla sayıda bulunduğu belirtilmiştir (1). Fare (6) ve sıçanlarda (7), endometriyuma B-lenfositlerin göçünden östrojenin sorumlu olduğu, progesteronun ise bu göçü önlediği bildirilmiştir.

Bu çalışmada, implantasyonda endometriyum dokusunda görülen sıvısal savunma sistemi hücrelerinin dağılımı ve yoğunluklarının histolojik ve histometrik yöntemlerle belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada, ağırlıkları 200-250 gr arasında değişen 3 aylık 42 adet Wistar Albino dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar, her grupta 7 adet olmak üzere 6 farklı gruba ayrıldı. Mallenby ve ark. (8) 'nın kullandıkları metoda göre vaginal smear'le östrus döneminde oldukları belirlenen dişi sıçanlar, erkek sıçanlarla aynı kafese bırakıldı. Ertesi gün erkek sıçanların yanından alınan dişilerden tekrar vaginal smear örnekleri alındı. Smear'de yaygın şekilde spermatozoon görülen hayvanlar gebeliğin birinci gününde kabul edildi (9, 10).

Gebe kalan hayvanlar, implantasyonun 1., 2., 3., 4., 5. ve 6. günlerinde yüksek doz eter ile uyutularak dekapite edildi. Bu hayvanların uterusları, abdominal diseksiyon ile alınarak formol-alkol de 24 saat süreyle tespit edildi. Tespit sıvısındaki doku örneklerine bilinen histolojik doku takibi işlemleri uygulandı. Genel doku takibinden sonra dokular paraplast'ta bloklandı. Hazırlanan bloklardan rotary mikrotom (Leica RM 2135, Germany) ile alınan 6 µ kalınlığındaki kesitlere, plazma hücrelerini belirlemek için metil-green pironin boyama yöntemi uygulandı (11).

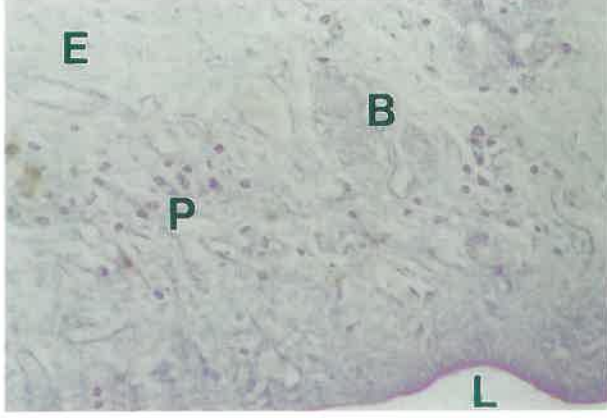
Metil green-pironin boyama yöntemi ile hazırlanan uterus doku kesitlerinde, plazma hücrelerinin sayısal dağılımını saptamak için yapılan hücre sayımlarında 100 kare oküler mikrometre (eyepiece graticule) kullanıldı. Endometriyumdan rastgele seçilen 8 bölgede 40'lık objektif büyütmesinde 100 kare içerisine düşen birim alandaki hücrelerin sayımları yapıldı. Bu şekilde seri kesitlerin sayılması ile elde edilen rakamların aritmetik ortalaması alındı. Böylece 100 kare oküler mikrometrenin kapsadığı alandaki ortalama plazma hücresi sayısı saptandı. Mikrometrik lam yardımıyla 40'lık objektif büyütmesi için 100 kare oküler mikrometrenin alanı saptandı (12). Daha sonra tüm sayısal veriler, 1mm²'lik birim alandaki plazma hücresi sayısına dönüştürüldü.

İmplantasyonun 1., 2., 3., 4., 5. ve 6. günlerinde, plazma hücresi sayılarının genel istatistiksel değerlendirilmesi ve bu günler arası varyans analizleri (ANOVA) SPSS (IBM-PC) paket programında gerçekleştirildi (13, 14).

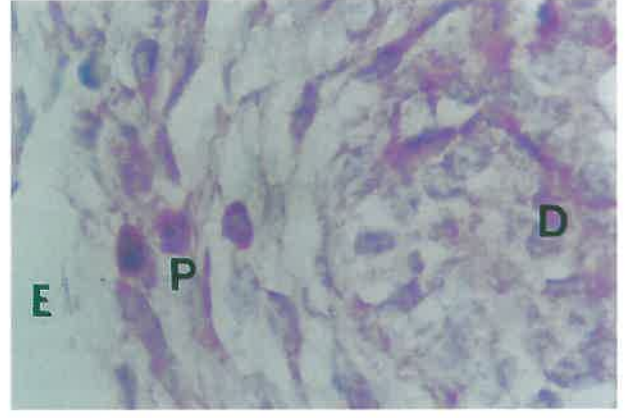
BULGULAR

Sıvısal savunmada görevli plazma hücrelerinin implantasyonun farklı günlerinde endometriyumdaki dağılımlarını saptamak amacıyla yapılan hücre sayımları sonucu elde edilen ortalama değerler ve istatistiksel sonuçlar Tablo 1 ve Grafik 1'de gösterilmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucu plazma hücrelerinin implantasyonun farklı günlerindeki sayısal dağılımları arasında bulunan ilişkinin anlamlı olduğu bulundu (p<0.05).

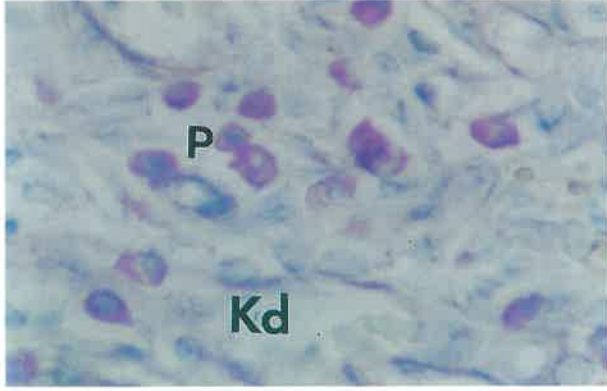
İmplantasyonun ilk gününde, plazma hücrelerinin desidual alan ile birlikte endometriyumun geri kalan kısımlarında özellikle bezler ve damarlar çevresinde oldukça fazla sayıda bulunduğu gözlemlendi (Resim 1, 2). Bu hücrelerin sayısının implantasyonun ikinci ve üçüncü günlerinde yukarıda adı geçen alanlarda giderek azaldığı görüldü. İmplantasyonun dördüncü gününde ise, antimezometriyal bölgede desidual alanın miyometriyum'a doğru genişleyerek endometriyum'dan belirgin bir şekilde ayrıldığı saptandı. İmplantasyonun bu dördüncü gününden itibaren son gününe kadar desidual alan içinde plazma hücrelerinin bulunmadığı, ancak bu alan dışında kalan endometriyumun oldukça daraldığı ve buradaki plazma hücrelerinin sayısının en az seviyeye düştüğü gözlemlendi (Resim 3, 4). İmplantasyonun beşinci gününden başlayarak altıncı gününe doğru reepitelizasyonla birlikte endometriyumun kalınlaştığı ve plazma hücrelerinin sayısında artış olduğu belirlendi (Resim 5, 6).



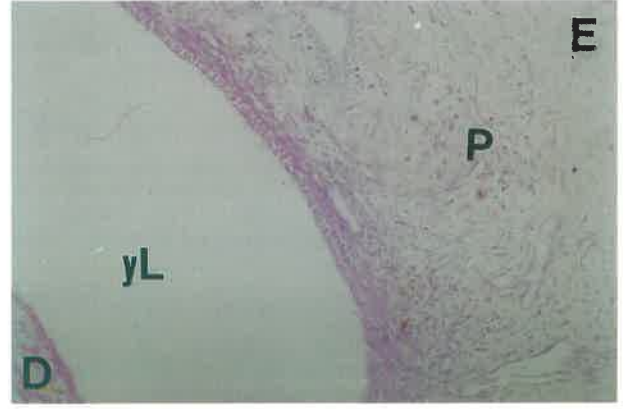
Resim 1. İmplantasyonun birinci gününde endometriyum (E) ve desidual alanda (Da) bulunan plazma hücrelerinin (P) görünümü. L: Lumen, B: Bez. Metil green-pironin, X 180.



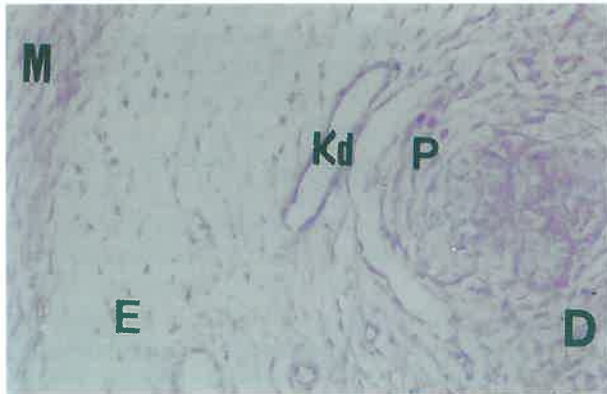
Resim 4. Resim 3'ün daha büyük büyütmedeki görünümü. P: Plazma hücreleri, E: Endometriyum, Kd: Kan damarı. Metil green-pironin, X 720 .



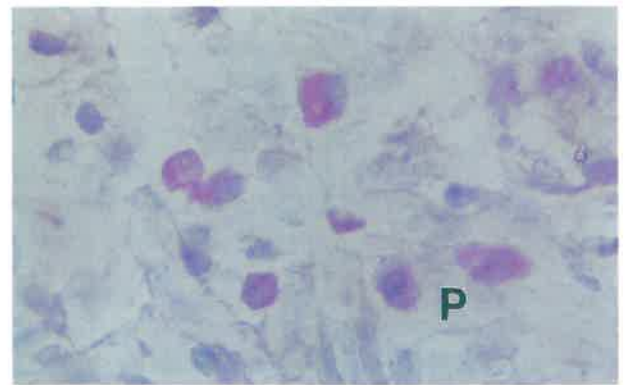
Resim 2. Resim 1'in daha büyük büyütmedeki görünümü. P: Plazma hücreleri, Kd: Kan damarı. Metil green-pironin, X720 .



Resim 5. İmplantasyonun altıncı gününde genişleyen endometriyumda (E) bulunan plazma hücrelerinin (P) görünümü. yL: Yeniden oluşan lumen, D: Desidua, B: Bez. Metil green-pironin, X 90.



Resim 3. İmplantasyonun dördüncü gününde desidual alanın (Da) dışında kalan endometriyumda (E) bulunan plazma hücrelerinin (P) görünümü. Kd: Kan damarı, M: Miyometriyum. Metil green-pironin, X 180.

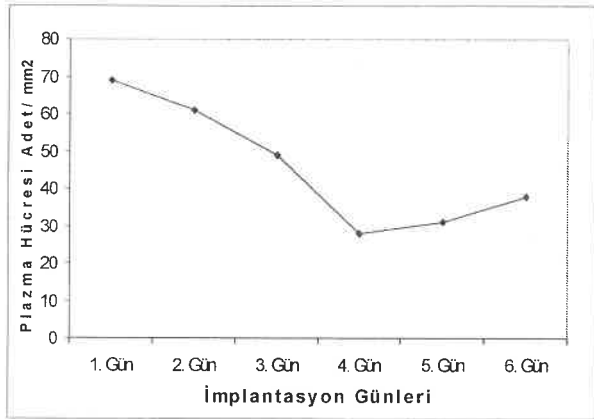


Resim 6. Resim 5'in daha büyük büyütmedeki görünümü. P: Plazma hücreleri. Metil green-pironin, X 720.

Tablo 1. İmplantasyonun değişik günlerinde endometriyumdaki plazma hücrelerinin dağılımı.

İmplantasyon Günleri	n	Plazma Hücresi Adet/mm ² Aritmetik Ortalama (X ± SH)
Birinci Gün	7	69.00 ± 3.39 ^a
İkinci Gün	7	61.14 ± 2.04 ^b
Üçüncü Gün	7	49.42 ± 2.13 ^c
Dördüncü Gün	7	28.21 ± 2.26 ^d
Beşinci Gün	7	31.27 ± 1.93 ^e
Altıncı Gün	7	38.16 ± 1.41 ^f

Plazma sayıları sütunundaki farklı implantasyon günlerinde farklı harf taşıyan grup ortalamaları istatistiksel olarak önemli farklılığa sahiptir (p<0.05).

**Grafik 1.** Plazma hücrelerinin implantasyonun günlerine göre dağılımı

TARTIŞMA VE SONUÇ

Rachman ve ark. (2), gebeliğin ikinci gününden implantasyonun üçüncü gününe kadar farelerde endometriyumda plazma hücrelerinin sayısında bir artış olduğunu bildirmişlerdir. Parr ve Parr (3), farelerde plazma hücrelerinin implantasyonun birinci ve ikinci günlerinde endometriyumdaki sayılarında artış olduğunu ve bunların genellikle bezler etrafında yerleştiklerini göstermişlerdir. Tachi ve Tachi (4), yaptıkları araştırmada, immunoglobulin'lerle işaretlenmiş plazma hücrelerinin, farelerde implantasyonun ikinci gününde özellikle bezler çevresinde olmak üzere endometriyum'da az, miyometriyum'daki damarlar çevresinde ise fazla sayıda bulunduğunu, benzer tablonun implantasyonun üçüncü ve dördüncü günlerinde de gözlemlendiğini ve desidual alanda ise bu hücrelere az sayıda rastlandığını bildirmektedirler. Bernard ve ark. (5), farelerde yaptıkları bir çalışmada, plazma hücrelerinin implantasyonun ikinci gününde endometriyumda

özellikle bezler çevresinde yerleşmiş olduklarını belirtmişlerdir.

Bu çalışmada, implantasyonun ilk gününde, plazma hücrelerinin desidual alan ile birlikte endometriyumun geri kalan kısımlarında özellikle bezler ve damarlar çevresinde oldukça fazla sayıda bulunduğu gözlemlendi. Bu hücrelerin sayısının implantasyonun ikinci ve üçüncü günlerinde yukarıda adı geçen alanlarda giderek azaldığı görüldü. İmplantasyonun dördüncü gününde ise, antimezometriyal bölgede desidual alanın miyometriyuma doğru genişlediği son gününe kadar desidual alan içinde plazma hücrelerinin bulunmadığı, ancak bu alan dışında kalan endometriyumun oldukça daraldığı ve buradaki plazma hücrelerinin sayısının en az seviyeye düştüğü gözlemlendi. İmplantasyonun beşinci gününden başlayarak altıncı gününe doğru reepitelizasyonla birlikte endometriyumun kalınlaştığı ve plazma hücrelerinin sayısında artış olduğu belirlendi.

Bu çalışmada, implantasyonun birinci gününden dördüncü gününe kadar endometriyumdaki plazma hücrelerinin azalması bulguları Tachi ve Tachi (4)'nin bulgularıyla paralellik, Parr ve Parr (3) ile Rachman ve ark. (2)'nin çalışmalarında belirttikleri plazma hücrelerindeki artışın sırasıyla implantasyonun ikinci ve üçüncü gününe kadar devam etmesi bulgularıyla da değişiklik göstermektedir.

Ayrıca bu çalışmada, implantasyonun ilk üç gününde endometriyum'da olduğu gibi desidual alanda da plazma hücrelerinin azalması ve dördüncü günden itibaren ise kaybolması bulguları Tachi ve Tachi (4)'nin desidual alanda bu hücrelerin az sayıda bulunması bulgularıyla farklılık göstermektedir.

Sonuç olarak yapılan çalışmada, endometriyum dokusunun sıvısal savunma sistemi hücrelerinin implantasyonun farklı günlerine göre değişik dağılımlar ve yoğunluklar gösterdiği tespit edildi.

Bu çalışmada, implantasyonda endometriyum dokusunun immunolojik reaksiyonlarının ortaya konması ile hayvan yetiştiriciliğinde önemli konulardan birisi olan döl veriminin artırılmasında, infertilite olgularının aydınlatılmasında, gebeliğin erken dönemlerinde görülen embriyo kayıplarının önlenmesinde, Veteriner Hekimlikte özellikle kedi ve köpek gibi evcil hayvanların gebeliklerinin engellenmesi için cerrahi yöntemlerin yerine bu immunolojik reaksiyonların kullanılmasında ve implantasyonun bilinmeyen mekanizmalarının açıklanması gibi konularda katkı sağlayacağı kanaatine varıldı. Ayrıca maternal immun tepkinin baskılanarak fötüs'un canlılığını sürdürmesinde, diğer bazı faktörlerin (genetik ve hormonal) yanı sıra implantasyon sürecinde endometriyum dokusunun savunma sistemi hücrelerinin dağılımlarında meydana gelen değişimlerinde etkili olabileceği sonucuna varıldı.

Böylece, endometriyum'daki sıvısal savunma sistemi hücrelerinin sayı ve dağılımlarındaki değişimler ile yukarıda bahsedilen konular arasındaki ilişkinin aydınlatılması için daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Bulmer JN, Hagin SV, Browne CM, Bilington WD: Localization of Immunoglobulin-Containing Cells in Human Endometrium in the First Trimester of Pregnancy and Throughout the Menstrual Cycle, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 23: 31-44, (1986).
2. Rachman F, Casimiri V, Psyhyos A, Bernand O: Influence of the Embryo on the Distribution of Maternal Immunoglobulins in the Mouse Uterus, *J. Reprod. Fert.* 77: 257-264, (1986).
3. Parr MB, Parr EL: Immunohistochemical Localization of Immunoglobulins A, G and M in the Mouse Female Genital Tract, *J. Reprod. Fert.* 74: 361-370, (1985).
4. Tachi C, Tachi S: Macrophages and Implantation, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 476: 152-182, (1986).
5. Bernard O, Ripoche MA, Bennett D: Distribution of Maternal Immunoglobulins in the Mouse Uterus and Embryo in the Days After Implantation, *J. Exper. Medicine* 145: 58-75, (1977).
6. Canning MB, Billington WD: Hormonal Regulation of Immunoglobulins and Plasma Cells in the Mouse Uterus, *J. Endocr.* 97: 419-424, (1983).
7. Wira RC, Sullivan DA: Effect of Estradiol and Progesterone on the secretory Immune System in the Female Genital, *Adv. Exp. Med. Biol.* 138: 99-111, (1982).
8. Mellanby J, Dwyer J, Hawkins C, Hitchen C: Effect of Experimental limbic on the Estrus Cycle and Reproductive Success in Rats, *Epilepsia* 34(2): 220 – 227, (1991).
9. Welsh OA, Enders AC: Occlusion and Reformation of the Rat Uterine Lumen During Pregnancy, *Ame. J. Anat.* 167: 463-477, (1983).
10. Kanter M, Öztaş E, Dalçık C: Sıçan, Fare ve Kobaylarda Gebeliğin İlk Gününü Tayin Etmede Vajinal Smear Yönteminin Kullanılması, *Van Tıp Derg.* 3(2): 112 – 116, (1996).
11. Bancroft JD, Cook HC: *Manual of Histological Techniques*, Churchill Livingstone, New York, (1984).
12. Böck P: *Romeis Mikroskopische Technik*, 17. Aufl., Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore 325 – 332, (1989).
13. Akgül A: *Tıbbi Araştırmalarda İstatistiksel Analiz Teknikleri*, SPSS Uygulamaları, YÖK Matbaası, Ankara, (1997).
14. SPSS for Windows, Release 6.1 Standart Version, 1994, USA.

Yazışma Adresi:

Mehmet Kanter
Yüzüncü Yıl Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
VAN-TÜRKİYE

Not: Bu araştırma Y.Y.Ü Araştırma Fonu tarafından 97-VF-002 numaralı proje olarak desteklenmiş ve aynı adlı doktora tezinden özetlenmiştir.