

MENSTRÜEL SIKLUSTA TUBA UTERİNADA EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖR RESEPTÖRLERİNİN DAĞILIMLARININ İMMÜNOHİSTOKİMYASAL OLARAK GÖSTERİLMESİ

Aykut GÜREL¹, Celal ILGAZ¹, Deniz ERDOĞAN¹, Gülnur TAKE¹

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada sıçan tuba uterinalarında östrus döngüsünün farklı evrelerinde, EGF reseptörlerinin dağılımının immünohistokimyasal yöntemlerle ışık mikroskopu düzeyinde belirlenmesi amaçlandı.

Yöntem: Çalışmada deneklerden menstruel döngünün uygun evrelerinde alınan doku örnekleri alışımlı ışık mikroskop izlenme yöntemlerinden geçirilerek parafin bloklar oluşturuldu. İmmünohistokimyasal çalışma için EGF-R primer antikoruna ile indirekt immünohistokimyasal yöntem uygulandı. Elde edilen preparatlar Olympus BH2 fotoışık mikroskopta değerlendirildi.

Bulgular: Tuba uterina'da östrus döngüsünün hiçbir evresinde kas katmanı ile damar duvarında EGF-R immünoaktivitesi izlenmezken, diğer yapılardaki tutulumun evrelere göre değişiklik gösterdiği saptandı. Proöstrus evresinde EGF-R tutulumunun epitel hücre sitoplazmasında tekdüze olarak yayıldığı, apikal hücre zarında tutulumun daha yoğun olduğu, seroza katmanında mezotel hücrelerinin üst yüz hücre zarlarında zayıf tutulum, bağ dokuda bazı hücrelerde zayıftan kuvvetliye değişen EGF-R tutulumu belirlendi. Östrus evresinde, mukozal katlantıların üst yüzeyindeki silyalı hücrelerde EGF-R immünoaktivitesi apikal sitoplazmada yoğun iken, bu bölgedeki lamina propriya'da zayıf olarak izlendi. Serozaya ait bağ dokusu içindeki damar duvarına yakın bazı hücrelerde reaktivite belirgin iken, mezotel hücrelerinde immünoaktivite kuvvetliydi. Metaöstrus evresinde mukozal katlantıların epitel hücrelerinin apikal sitoplazma ve hücre zarı ile lamina propriyadaki bazı hücrelerde kuvvetli tutulum gözlemlendi. Bu grupta tunika serozada boyanma izlenmedi. Diöstrus evresinde epitel katmanındaki tutulum apikal sitoplazma ve hücre zarında yoğundu. Tunika serozada tutulum zayıftı.

Sonuç: Sonuç olarak, tuba uterina'da kan östrojen düzeyine bağlı olarak EGF-R ekspresyonunun değişiklik gösterdiği, artan kan östrojen düzeyine koşut sentezin arttığı belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Tuba Uterina, Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü, Menstrüel Siklus, İmmünohistokimya.

IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF THE DISTRIBUTION OF EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTORS IN THE UTERINE TUBES DURING THE MENSTRUAL CYCLE

ABSTRACT

Purpose: To analyze the distribution of EGF receptors (EGF-R) in the uterine tubes of rats at various phases of the estrous cycle immunohistochemically.

Methods: Rat uterine tube tissue samples from certain phases of the menstrual cycle were processed for paraffin embedding. Indirect immunohistochemical and EGF-R primary antibody analyses were performed on the slides. Afterwards, they were examined by Olympus BH2 photo-light microscope.

Results: In uterine tubes, EGF-R expression was not detected in the tuba uterine muscle layer or vessel wall in any estrous phase, but in the other parts its level varied in these phases. At proöstrus, EGF-R was homogeneous in the epithelial cell cytoplasm, denser in the apical cell membrane, low in serosa layer mesothelial cells' external cell surface and ranged from low to denser in connective tissues. At östrus, however, EGF-R expression was higher in the apical cytoplasm of ciliary cells on the upper surface of mucous folding, but low in the lamina propria. Expression was detectable in some cells near the vessel wall within connective tissue of serosa, but was denser in the mesothelia. At metaöstrus, beside higher expression in both the apical cytoplasm and cell membrane of epithelia and some cells in lamina propria, no immunohistochemical staining was observed in serosa. At diöstrus, expression in the epithelia layer and in the cell membrane was denser and low in serosa.

Conclusion: Blood estrogen level dependent EGF-R expression was determined in the tuba uterine, and, in accordance with increased blood estrogen levels, EGF-R expression was stimulated.

Key Words: Tuba Uterina, Epidermal Growth Factor Receptor, Menstrual Cycle, Immunohistochemistry.

GİRİŞ

Memeli tuba uterinası döllenme ve erken embriyonik gelişim için gerekli olan mikro çevrenin oluşmasını sağlayan fizyolojik ve biyokimyasal değişiklikler gösterir. Bu değişiklikler ovaryum streoidleri ve bunlardan da en çok östrojenlerce düzenlenir. Bu mikro çevre tuba uterina lümenindeki protein ve makromoleküller ile salgı hücrelerince salınan salgıyla oluşturulur. Tuba uterina, çeşitli makro molekülleri üreten, salan ve bunların düzeylerindeki değişimi ovaryal ve menstruel döngülerle düzenleyen dinamik ve aktif bir organdır (1,2).

Büyüme faktörleri hücre fizyolojisinin denetiminde tanımlanmış en önemli makro moleküllerdendir. Hücre membranlarında kendine özgü reseptörlere bağlanan büyüme faktörleri, böylece hücrenin bölünmesi ve büyümesini de içeren birçok fizyolojik hücresel etkinliklerin gerçekleşmesiyle sonuçlanan bir seri hücre içi olaylar zincirini başlatırlar. Bu büyüme faktörlerinden biri epidermal büyüme faktörüdür (EGF). Bu faktör hücre yüzeyinde yerleşik olan kendi özgün reseptörlerine (EGF-R) bağlanarak işlev görür (3,4).

EGF-R çoğu doku ve organda tanımlanmış bir transmembran proteinidir. Tirozine özgü protein kinaz aktivitesi gösterir. Memeli embriyosu ve anne, yapısal olarak karmaşık bir ilişki içerisinde. Bu ilişki büyüme faktör sinyalleriyle yürütülür. Embriyon birçok büyüme faktörüne özgü reseptörler içerir. Buna karşın büyüme faktörleri bazen tuba uterina ve uterus'un destek dokularından, bazen de embriyon'un kendisinden kaynaklanır. Bu büyüme faktörleri preimplantasyon evresinde embriyon'un uterus'a gömülmesini denetlerler. Ayrıca embriyonik ve maternal etkileşimi uyumda tutarak embriyonik gelişimi etkilerler (5,6).

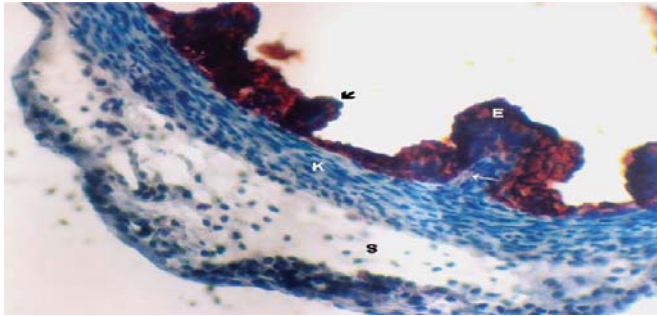
Preimplantasyon evresindeki gelişimde büyüme faktörlerinin embriyonun gelişme erki üzerindeki olumlu etkisinin otokrin, parakrin yada endokrin yolla mı olduğu henüz tam belirlenmemiştir. Preimplantasyon dönemi embriyo gelişiminin tuba uterinalarda olaylanması ve bu sırada tuba uterinalarda oluşan fizyolojik ve biyokimyasal değişikliklerin büyük ölçüde ovaryum steroidlerinin denetiminde olması nedeniyle bu çalışmada menstruel döngünün değişik evrelerinde tuba uterina epitelinde epidermal büyüme faktörü reseptörlerinin dağılımlarının tanımlanmasının önemli olacağı düşünüldü. Bu nedenle çalışmamızda, sıçan tuba uterinalarında, döngünün değişik evrelerinde epidermal büyüme faktörü reseptörlerinin dağılımlarının ışık mikroskopik düzeyde, immünohistokimyasal olarak belirlenmesi amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

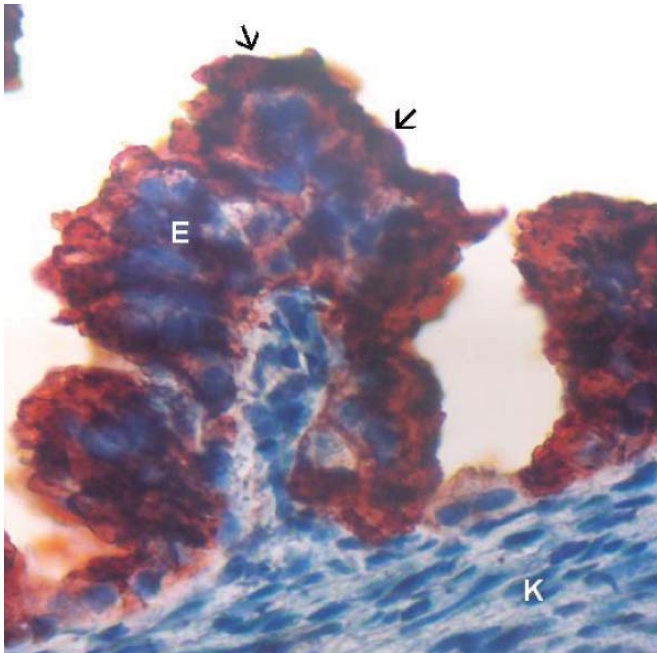
Bu çalışmada Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırma Merkezi'nde sağlanan 200-220 gr ağırlığında Wistar albino cinsi 16 dişi sıçan kullanıldı. Sıçanların döngüsel evreleri, 6-12 saat aralıklarla alınan vajinal smearlere Papanicolaou boyama yöntemi uygulanarak belirlendi ve her gru-

¹ Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji ABD.

ba 4 sıçan olacak şekilde gruplandırıldılar. Döngüsel evreleri belirlenen sıçanlar intraperitoneal ketamin ve xylazine enjeksiyonu ile uyutulularak histerektomi gerçekleştirildi. Tüm doku örnekleri %10'luk nötral formalinde 72 saat süreyle tespit edildi. dokular daha sonra alışılagelmiş ışık mikroskop izleme yönteminden geçirilerek parafin bloklar elde edildi. Hazırlanan parafin bloklardan polilizinli lamlara 4-5gm kalınlığında kesitler alındı. Çalışmada epidermal büyüme faktör reseptörlerini immünohistokimyasal olarak belirleyebilmek için Neo Markers EGF-R anti – rabbit primer antikor (Cat= RB-1465-PO) ve UltraVision Detection System (Anti – rabbit, HRP/AEC, Cat= TR-015-HA, Lot= RHA41110) kullanıldı. Camlar öncelikle deparafinize ve dehidrate edildikten sonra, doku içerisinde antikor bağlanma bölgelerini açığa çıkarmak amacıyla 1M citrate tamponu (Lab Vision, USA) ile mikrodalgada retriever işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra, %3'lük hidrojen peroksit (TA-015-HP, Lab Vision, USA) ile endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. PBS ile yıkanan camlara UltraV block (TA-015-UB, Lab Vision, USA) uygulanarak özgün olmayan bağlanmaların engellenmesi sağlandı. Bu işlem sonrasında, kesitler EGF-R primer antikorunu (poliklonal anti-rabbit Ig), (NeoMarker, USA) ile 60 dakika oda ısısında bekletildi.



Resim 1a: Proöstrus evresinde tuba uterina. E: yüksek boylu tek sıralı epitel örtü, ↑: lamina propriya, ↑: kısa ve küt çıkıntılar, K: sirküler uzanım gösteren kas tabakası, S: seroza. (İmmünperoksidaz – Hematoksilin, X200).

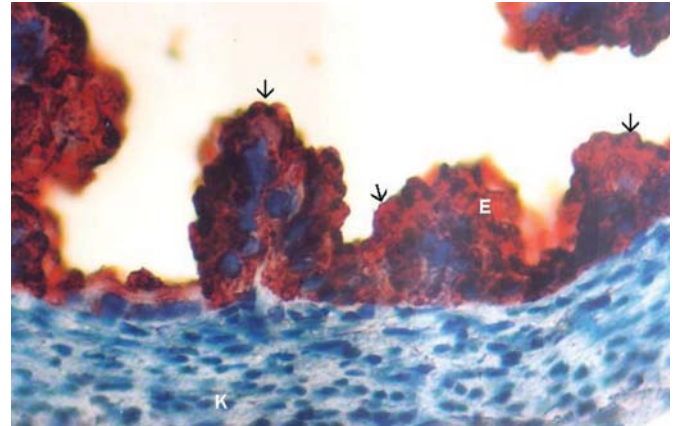


Resim 1c: Proöstrus evresinde tuba uterina. E: uniform sitoplazmik EGF-R tutulumu gözlenen epitel hücreleri, ↑: apikal hücre zarındaki kuvvetli immünoaktivite. K: negatif tutulumu gösteren kas tabakası. (İmmünperoksidaz – Hematoksilin, X400).

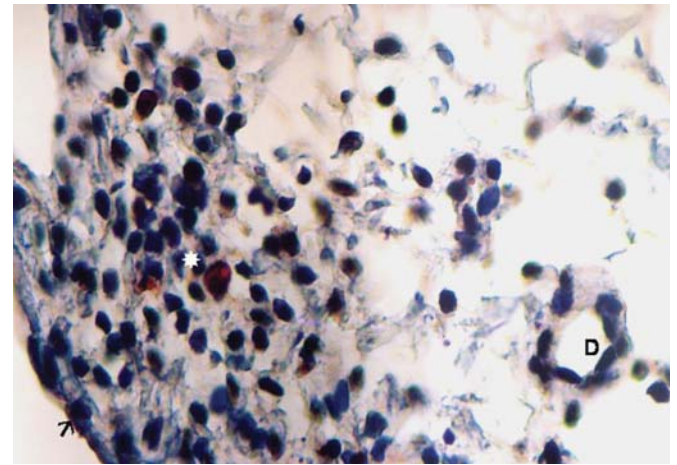
Süre sonunda PBS ile yıkanan camlara biyotinli sekonder antikor (TR-015-BN, Lab Vision, USA) uygulandı. PBS ile yıkanan camlar streptavidin peroksidaz enzim kompleksine (TS-015-HR, Lab Vision, USA) etkin bırakıldı. Son olarak ortama kromojen AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) (TA-015-HAS, TA-015-HAC, Lab Vision, USA) eklenerek bekletildi ve gözle görülebilir ürünün ortaya çıkması sağlandı. Zemin boyası olarak Mayer'in hematoksilin'i (0B524092, Merck) kullanıldı. Negatif boyama primer antikor aşamasında yapıldı. Bu şekilde boyanan camlar ultramount ile kapatılıp, bilgisayar donanımlı fotoışık mikroskopta (DCM 4000, Leica, Germany) değerlendirildi.

BULGULAR

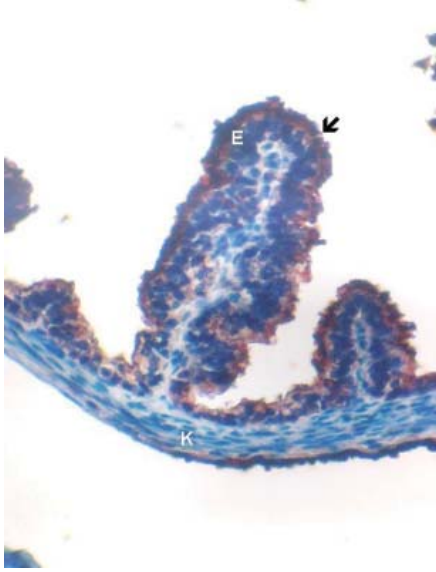
Menstrüel döngünün proöstrus evresinde tuba uterina dokusu ışık mikroskobu düzeyinde incelendiğinde epitelin tek sıralı prizmatik olduğu, epitel boyunun oldukça yüksek olduğu gözlenirken, lamina propriyanın epitel altında ince bir katman halinde olduğu ve yer yer lümeneye doğru epitel ile birlikte çıkıntı yaptığı dikkat çekiciydi. Çıkıntılar küt ve kısaydı.



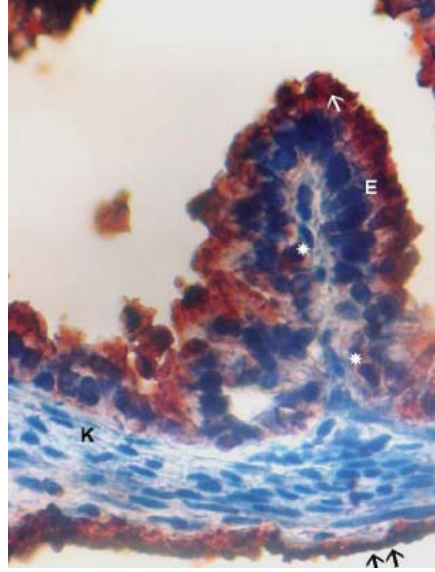
Resim 1b: Proöstrus evresinde tuba uterina. E: uniform sitoplazmik EGF-R tutulumu gözlenen epitel, ↑: apikal hücre zarındaki kuvvetli immünoaktivite. K: negatif tutulumu gösteren kas tabakası. (İmmünperoksidaz – Hematoksilin, X400).



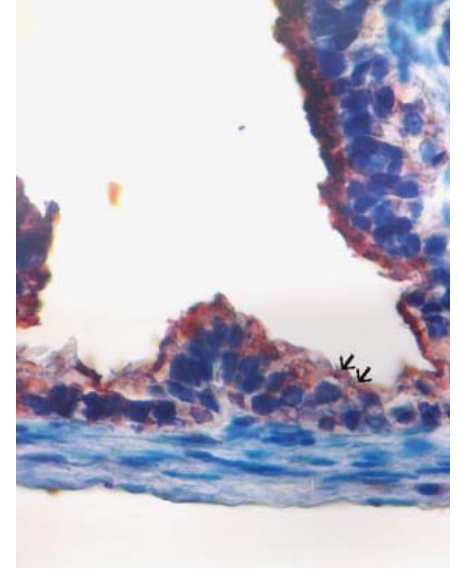
Resim 1d: Proöstrus evresinde tuba uterina seroza katmanı. ↑: apikal hücre zarında EGF-R tutulumu gözlenen mezotel hücreleri, *: bağ dokusu hücrelerindeki zayıf kuvvetliye değişen tutulum, D: negatif boyanma gösteren damar duvarı. (İmmünperoksidaz – Hematoksilin, X400).



Resim 2a: Östrus evresinde tuba uterina. E: epitel hücreleri, K: kas tabakası, ↑: uzamış mukozal katlantılar. (İmmünperoksidaz – Hematoksilen, X200)



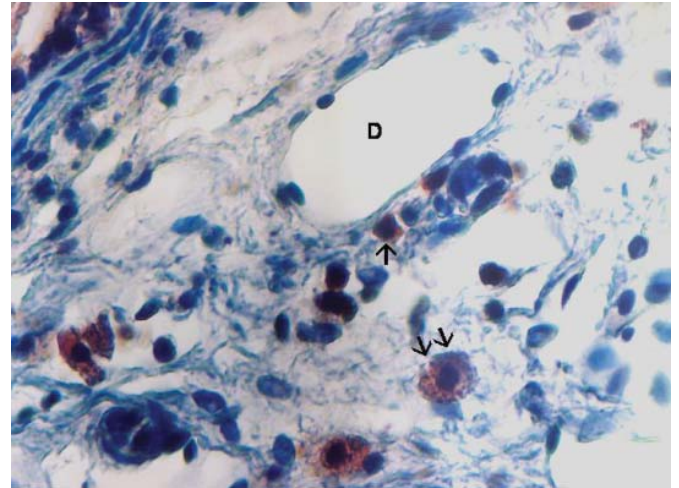
Resim 2b: Östrus evresinde tuba uterina. E: epitel hücreleri, ↑: özellikle mukozal katlantıların üst yüzüne yerleşik kinosilyalı hücrelerde kuvvetli apikal sitoplazmik boyanma, *: lamina propriada tutulum gösteren hücreler, K: negatif reaktivite izlenen kas tabakası, ↑↑: mezotel hücrelerindeki yoğun tutulum. (İmmünperoksidaz – Hematoksilen, X400)



Resim 2c: Östrus evresinde tuba uterina. E: epitel hücreleri, K: Kas tabakası, ↑↑: mukozal katlantıların yan bölgesindeki salgı epitel hücrelerinde orta dereceli tutulum. (İmmünperoksidaz – Hematoksilen, X400)

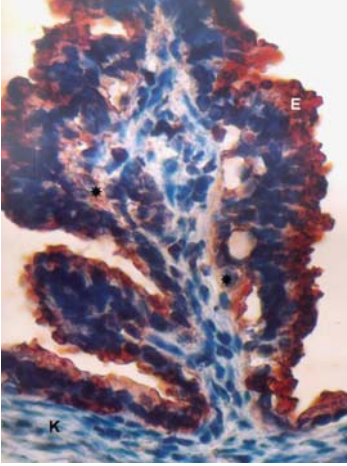
Epitelde çekirdekler hücre şekline uyumlu ve genelde bazalde yerleşik oval şekilli idi. Kas katmanı genelde sirküler uzanım gösteriyordu. Seroza gelişkindi (Resim 1a). EGF-R tutulumunun genelde epitel hücre sitoplazmasında uniform olarak yayıldığı ancak apikal hücre zarında biraz daha yoğun olduğu dikkat çekiciydi. Kas tabakasında tutulum saptanmadı (Resim 1b-1c). Bu görünümü ile tuba uterina yapısındaki değişimler literatür verilerindeki proöstrus ve insanda buna koşut olan foliküler evre başlangıcı ile uyumlu bulundu. Seroza katmanında mezotel hücrelerinin üst yüz hücre zarlarında zayıf dereceli EGF-R tutulumunun olduğu ve alttaki bağ dokuda da bazı hücrelerde zayıftan kuvvetliye değişen EGF-R tutulumu dikkat çekiciydi. Damarlarda ise belirgin reaktivite izlenmiyordu (Resim 1d).

Östrus evresinde tuba uterina'nın ışık mikroskopik değerlendirilmesinde mukozal katlantıların proöstrus evresine karşın belirgin olarak uzadığı ve dallanmalar gösterdiği dikkat çekiciydi (Resim 2a). Epitelde EGF-R tutulumunun daha çok apikal sitoplazmada yoğunlaştığı belirgindi. Mukozal katlantıların üst yüzüne yerleşik silyalı hücrelerde EGF-R tutulumunun apikal sitoplazmada daha fazla olduğu, villus yan bölümlerinde ise salgı hücrelerinde tutulumun orta dereceli olduğu ilgi çekiciydi. Serozaya ait mezotel hücrelerinde ise yer yer belirgin EGF-R ekspresyonu olduğu dikkat çekiciydi. Villus içi lamina propriada bazı hücrelerde zayıf EGF-R tutulumu saptandı (Resim 2b). Kas katmanında tutulum izlenmedi (Resim 2c). EGF-R tutulumunun belirgin olduğu mezotel katmanı altında, bağ dokusu içinde bir grup hücrenin negatif olarak boyandığı, ancak damar duvarına yakın bazı hücrelerde belirgin EGF-R tutulumu olduğu saptandı. Bu hücrelerden bir kaçının ise adeta stromal hücreleri taklit edencesine irileştiği belirlendi. Damar duvarında hiç tutulum gözlenmedi (Resim 2d).

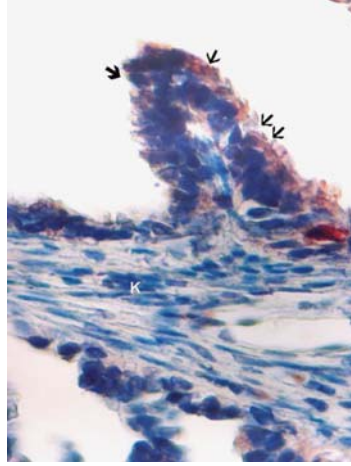


Resim 2d: Östrus evresinde seroza tabakası. ↑: damar duvarına yakın kuvvetli boyanan bağ dokusu hücreleri, ↑↑: stromal hücrelere benzeyen EGF-R pozitif hücreler, D: negatif immünreaksiyon gösteren damar duvarı. (İmmünperoksidaz – Hematoksilen, X400)

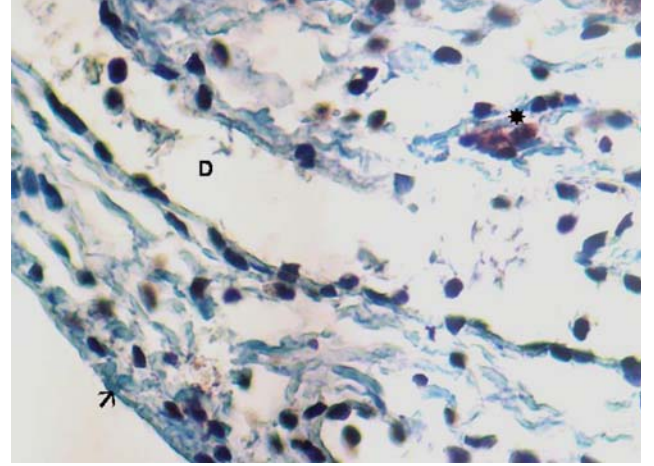
Döngünün metaöstrus evresine uyumlu tuba uterina kesitlerinde mukoza katlantılarının halen östrus evresindeki eşdeğer yapıda olduğu izlendi. Mukoza katlantılarının üst yüzünde silli epitel hücreleri ile uyumlu olan hücrelerde tutulum apikal sitoplazma ve hücre zarında belirgindi. Mukoza katlantılarının iç yüzündeki lamina propriada bazı hücrelerin yoğun EGF-R tutulumu gösterdiği dikkat çekiciydi (Resim 3a). Kıvrıntıların nispeten düz olduğu bölgelerde ise EGF-R tutulumunun daha zayıf ve orta dereceli olduğu bölgeler yan yana görüldü. Bu hücrelerin olasılıkla salgı yapan hücrelerle uyumlu olduğu düşünüldü. Kas katmanında immünreaksiyon izlenmedi (Resim 3b). Tunika seroza katmanında proöstrus ve östrus evresiyle karşılaştırıldığında EGF-R tutulumu mezotel katmanında hiç



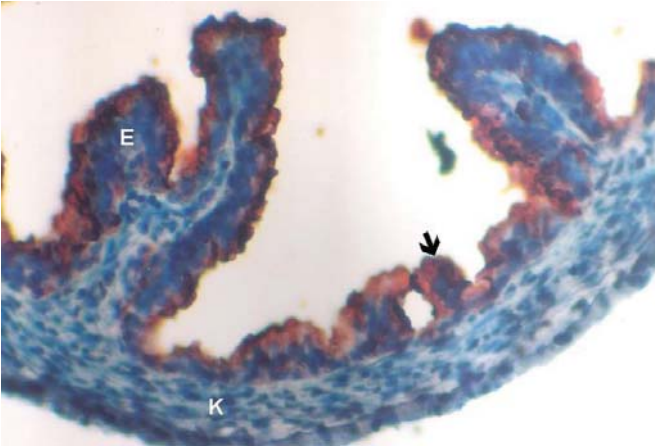
Resim 3a: Metaöstrus evresinde tuba uterina. E: epitel hücreleri, ↑: apikal hücre zarı ve sitoplazmadaki kuvvetli reaktivite, *: lamina propriyada zayıf tutulum gösteren bağ dokusu hücreleri, K: negatif immünoreaktivite gösteren kas dokusu. (İmmünperoksidad – Hematoksilin, X400)



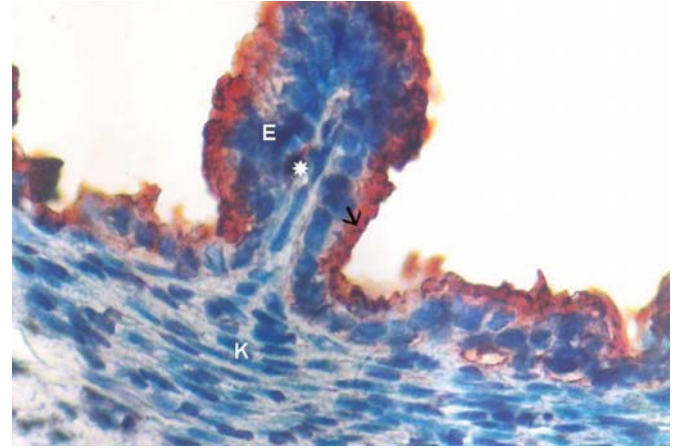
Resim 3b: Metaöstrus evresinde tuba uterina. ↑: nispeten kısa olan mukoza katlantıları, ↑: orta dereceli tutulum gösteren epitel hücreleri, K: negatif boyanma gösteren kas hücreleri. (İmmünperoksidad – Hematoksilin, X400)



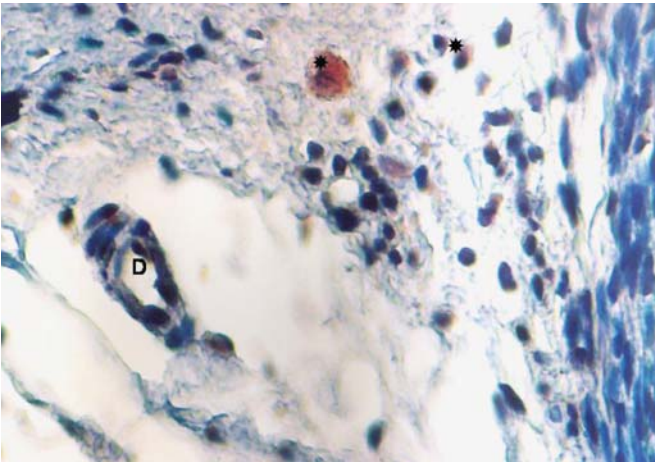
Resim 3c: Metaöstrus evresinde tunika seroza. ↑: negatif tutulum gösteren mezotel hücreleri, *: EGF-R immünoreaktivitesi izlenen bağ dokusu hücreleri, D: negatif tutulum gözlenen damar duvarı. (İmmünperoksidad – Hematoksilin, X400)



Resim 4a: Diöstrus evresinde tuba uterina. E: epitel hücreleri, K: kas tabakası, ↑: kısa ve küt mukoza katlantıları. (İmmünperoksidad – Hematoksilin, X200)



Resim 4b: Diöstrus evresinde tuba uterina. E: epitel hücreleri, ↑: apikal hücre zarı ve sitoplazmada EGF-R immünoreaktivitesi, *: mukoza katlantılarının bağ dokusunda tutulum gösteren hücreler, K: negatif tutulum izlenen kas tabakası. (İmmünperoksidad – Hematoksilin, X400)



Resim 4c: Diöstrus evresinde tunika seroza. D: negatif tutulum gösteren damar duvarı, *: zayıf tutulum gösteren bağ dokusu hücreleri. (İmmünperoksidad – Hematoksilin, X400)

izlenmedi, buna karşın bağ dokusu hücrelerinde tutulumun sürdüğü belirlendi. Damar duvarında tutulum yoktu (Resim 3c).

Diöstrus evresinde tuba uterina'nın ışık mikroskopik incelemelerinde histolojik görünümün proöstrus evresine benzer olduğu izlendi; mukoza katlantılarının boyları kısa ve küt bir görünüm sergiliyordu (Resim 4a). EGF-R tutulumunun epitel katmanının özellikle apikal bölgesinde yoğunlaştığı ilgiyi çekti. Tutulumun apikal hücre zarında kuvvetli, apikal sitoplazmada ise orta dereceli olduğu gözlemlendi. Mukoza katlantılarındaki bağ dokusu hücrelerinde seyrek olarak orta dereceli tutulum gösteren hücreler izlendi. Kas tabakasında tutulum yoktu (Resim 4b). Tunika seroza katmanına ait bağ dokusunda diğer gruplara göre tutulum zayıftı. Damar duvarında EGF-R immünreaksiyonu gözlenmedi (Resim 4c).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Tuba uterinaller biyolojik olarak aktif olan, içlerinde büyüme faktörleri de bulunan birçok makromolekül ve proteini üreten ve bu makromoleküllerin düzeyindeki değişimi östrus ve menstruel döngülerle düzenleyen bir dokudur. Tuba uterinallerin bu biyosentetik erki östrojen'in progesteron'a baskın olduğu döngü evrelerinde daha fazladır (7). Buna göre domuz, koyun ve inekte östrus döngüsünde, insanda da menstruel döngünün ortasında diğer günlere göre biyosentetik erkin fazla olduğu gösterilmiştir. Bu farklılık tuba uterinaller'in farklı anatomik bölgelerinin biyosentetik yetisinde de görülür. Domuzlarda, östrus'ta infundibulum ve ampulla bölgelerinin büyüme faktörleri ve diğer makromolekülleri sentez erklerinin döngünün diğer günlerine oranla arttığı gösterilmiştir; ancak isthmusda günlere ve evreye özgü bir değişim gözlenmemiştir. Ovariektomi yapılmış ve hormon uygulanmış deneklerde yapılan çalışmalarda tüm tuba uterinallerin farklı anatomik bölgelerinde yapılan protein sentezi ve salgının östrojen tarafından yeniden düzenlendiği bildirilmiştir (8).

Adachi ve arkadaşları 1995 yılında EGF, EGF-R ve TGF- α 'nın insan tuba uterinallerin'da in vivo ve in vitro olarak östrojene bağımlı ekspresyonunu araştırmışlardır. Östrojen tedavisi yapılan ve yapılmayan menopoz sonrası kadınlarda tuba uterina epitel hücrelerinin mRNA düzeyleri PCR'da değerlendirilmiştir. Sonuçta östrojen tedavisi alan kadınlarda EGF, EGF-R ve TGF- α gen tutulum miktarları östrojen almayan gruptakilere karşı oldukça fazla bulunmuştur. Tubal hücrelerin in vitro kültüründen alınan mRNA düzeyleri üzerinde yapılan çalışmalar da östrojenin bu etkisini desteklemektedir. Araştırmacılar aynı zamanda EGF, EGF-R ve TGF- α 'anti antikoları kullanarak östrojene bağlı hücre büyümesinde EGF, EGF-R ve TGF- α 'nın etkilerini de araştırmışlardır. Anti EGF ve EGF-R antikoları östrojene bağlı timidin alınımını önemli ölçüde azaltırken TGF- α anti antikoru aynı etkiyi gösteremiştir (9).

Adachi ve arkadaşları yapmış oldukları bir diğer çalışmada EGF reseptörü ve onun ligandlarının (EGF ve TGF- α) östrojen ile doğrudan etkilenip etkilenmediğini araştırmışlardır. Menopoz sonrası östrojen replasman tedavisi alan kadınlarda tuba uterina epitelinin immünohistokimyasal yöntemlerle boyanması sonucunda EGF ve ligandlarını belirlemişler, ancak östrojen replasman tedavisi almayan grupta bunu saptayamamışlardır (10).

Morishige ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada, insan tuba uterina dokusunda menstruel döngünün erken foliküler, geç foliküler ve luteal evrelerinde EGF ve TGF- α 'yı incelemişler ve bu büyüme faktörlerinin üretiminin serum estradiolündeki artış ve azalışla yakından ilgili iken progesteron düzeyindeki değişimle ilişkili olmadığını bildirmişlerdir (11).

Tüm bu çalışmalar östrojenin tuba uterinallerde EGF, EGF-R ve TGF- α ' ekspresyonunu arttırdığını göstermektedir. Östrojen kendi reseptörleri ile EGF sistemlerini parakrin ve otokrin yolla aktive ederek tuba uterina dokusunun çoğalma ve farklılaşmasında anahtar rol oynuyor olabilir.

Wollenhaupt ve arkadaşları domuzlarda östrus döngü-

sünün tuba uterinallerdeki EGF-R ekspresyonu ve aktivitesi üzerine etkisini incelemişler. Çalışmada I125 ile işaretlenmiş EGF kullanılarak EGF-R'nin tuba uterinallerde dağılımı araştırılmıştır. Sayısal analizlerin sonuçları siklusun 1. günü 22,4 fmolmg-1 protein 6. gün 11,0 fmolmg-1 12. gün 16,0 fmolmg-1 protein olarak verilmiştir. İmmünohistokimyasal boyamalarda da EGF-R'nin tuba uterina epitelinde, silyalı hücrelerde, salgı hücrelerine göre daha kuvvetli tutulum olduğu bildirilmiştir (12).

Wollenhaupt'un domuzlar üzerinde yaptığı araştırmaya koşut olarak, bizim sıçanlar üzerinde yaptığımız çalışmada da EGF-R tutulumunun östrus döngüsünün tüm evrelerinde, silyalı hücrelerde daha kuvvetli olduğu belirlendi. Bu bulgu, tüm memelilerde tuba uterinallerin taşıma işlevinde silyalı hücrelerin önemine koşut, bu hücrelerin proliferasyonunun daha fazla olduğunun bir göstergesi olarak benimsendi.

1995 yılında Swanchara ve arkadaşları domuz tuba uterinasında EGF ve EGF-R'nin dağılımını immünohistokimyasal olarak incelemişlerdir. Döngüsel ve erken hamilelik dönemleri olmak üzere iki grupta incelenen domuzlardan döngüsel evre örneklerinin EGF boyanması sonucunda ampulla ve isthmus dokularının farklı boyanma özelliği gösterdiklerini, özellikle silyalı ve salgı epitel hücrelerinin boyandığını, tutulumun apikal hücre zarında kuvvetli olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca isthmus bölgesinde lamina propriyanın, ampulla bölgesinden daha yoğun boyandığını gözlemlemişlerdir. Erken hamilelik döneminde ise apikal epitel hücre zarında kuvvetli boyanma görülmesine karşı tutulum diğer gruba karşı daha zayıf olarak değerlendirilmiştir. Lamina propriya genelinde görülen boyanma da döngüsel döneme göre düşük bulunmuştur. Aynı zamanda RIA analizi ile incelenen süpernatantlardan alınan sonuçlar da döngüsel dönemde daha belirgin EGF yoğunluğu olduğunu desteklemiştir. Yapılan EGF-R boyanması sonucu, tutulum lamina propriyada en düşük düzeyde saptanmıştır. Epitel hücrelerinin apikal hücre zarları daha yoğun olmakla birlikte, apikal ile bazal sitoplazma arasında da tutulum gözlenmiştir. Hücrelerin çekirdek çevresindeki yoğun boyanmaya da dikkati çeken araştırmacılar bunun nedenini EGF'ye bağlanmış EGF-R'nin hücre içine alınıp çekirdeğe yönelmesi olarak yorumlamışlardır (13).

Bizim çalışmamızda, özellikle villuslara ait lamina propriyada özellikle metaöstrus evresinde kuvvetli tutulum gösteren hücrelere rastlanmıştır. Bu hücrelerin özellikle epitele komşu olması, parakrin yol ile epitel hücrelerini etkiliyor olabileceği sonucunu doğurmuştur. Çalışmamızda ayrıca metaöstrus evresinde, serozaya ait bağ dokusu hücrelerinin kan damarlarına yakın bir grubunda EGF-R tutulumunun gözlenmesi, EGF-R'nin parakrin mekanizmalar ile epitel hücrelerini etkiliyor olabileceği fikrini desteklemektedir.

Adachi ve arkadaşlarının insan tuba uterinasında menstruel döngünün erken foliküler, geç foliküler ve luteal evrelerine özgü EGF dağılımını immünohistokimyasal olarak inceledikleri çalışmalarında evrelere özgü boyanmaların yüzey epitel hücreleri ve damar endotel hücrelerinde olduğunu bildirmişlerdir. Epitel hücre boyanmasının geç foliküler ve luteal dö-

nemlerde kuvvetli, erken foliküler dönemde ise zayıf olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca epitel hücre zarlarının EGF reseptör proteini içerdiğini ve evrelere göre dağılımının EGF ile aynı olduğunu bildirmişlerdir (10).

Sıçan tuba uterinasında östrus döngüsünde EGF-R tutulumunun değerlendirildiği bu çalışmada, epitel hücrelerinde proöstrus evresinde apikal hücre zarı ve sitoplazmada daha belirgin olmak üzere tüm sitoplazmada tutulumun olduğu, östrus, metaöstrus evrelerinde tutulumun apikal bölgeye doğru yoğunlaşmaya başladığı, özellikle diöstrus evresinde ise tutulumun çok belirgin olarak epitel hücrelerinin apikal hücre zarı ve sitoplazmasında sınırlandırıldığı belirlendi. Bu bulgu östrus döngüsünün sonlarına doğru EGF-R'nin tuba uterina işlevi için otokrin ve parakrin gereksiniminin azalmasına koşut olarak değerlendirildi.

Wollenhaupt ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir diğer çalışmada domuzlarda östrus döngüsünün 1.,6.,12. ve 20. günlerinde tuba uterina ve endometriyum dokularında I125 ile işaretli EGF-R kullanarak EGF-R'nin dağılımını araştırmışlar ve epitel hücrelerinin apikal bölgelerinde yoğun boyanmalar gözlemlenmişlerdir. Ayrıca sayısal olarak EGF-R konsantrasyonunun döngü ortası döneme oranla (12. gün), preovulatar evrede (siklusun 20. günü) anlamlı biçimde arttığını bildirmişlerdir (14).

Steffl ve arkadaşları epidermal büyüme faktör reseptör alanlarının domuz tuba uterinasında östrus döngüsüne özgü dağılımlarını araştırmışlar ve bunun için biri hücre dışı EGF-R, diğeri sitoplazmik EGF-R olarak iki değişik monoklonal antikor kullanarak immün boyama yapmışlardır. Metaöstrus evresinde epitel hücrelerinin çoğunun her iki antikora karşı tutulum gösterdiği bildirilmiştir. Proöstrus ve diöstrus evrelerinde ise sitoplazmik EGF-R zayıf boyanma gösterirken, hiçbir alanda hücre dışı EGF-R boyanmasına rastlanmamıştır. Östrus döngüsü sırasında, kas dokusu ve kan damarlarında sitoplazmik EGF-R boyanma yoğunluğu zayıf yada negatif olmasına karşın, hücre dışı EGF-R'nin, tüm düz kas hücrelerinde yoğun immün boyanma gösterdiği bildirilmiştir (15).

Bu çalışmada da tuba uterina sitoplazmik EGF-R tutulumu değerlendirilmiş ve Steffl'in bulgularına koşut, epitel dokuda immünreaksiyon izlenmiştir. Ancak araştırmacının bulgularından ayrıcalık bizim çalışmamızda proöstrus evresinde epitel dokuda diöstrusa göre tutulumun daha yoğun olduğu saptanmıştır. Proöstrus evresinde gözlenen bu tutulumun ovulasyona hazırlık olarak tuba epitel proliferasyonunun sinyalini oluşturmaya yönelik olarak artmış olduğu kanısına varılmıştır. Ayrıca kas tabakası ve kan damarlarında EGF-R tutulumu hiç gözlenmemiştir.

Literatürde yapılmış olan çalışmalardan bir bölümü de tuba uterinalarda EGF/EGF-R dağılımının yanı sıra bu büyüme faktörü ve reseptörlerinin erken embriyonik gelişimindeki rolleri ve bu büyüme faktörleri ile gelişmekte olan embriyo arasındaki ilişkiyi içeren yayınlardan oluşmaktadır.

Danasouri ve arkadaşları EGF-R ve TGF- α dağılımını insan tuba uterinalarında inceledikleri çalışmalarında, EGF-R'nin genellikle yüzey hücrelerinin bazal bölgelerinde oldu-

ğunu, kas katmanı ve seroza da zayıf EGF-R bulunduğunu göstermişlerdir (16).

Smotrich ve arkadaşları, insan tuba uterinalarında büyüme faktörü ve reseptörlerinin varlığını araştırmışlardır. Çalışmada hücre dışı EGF-R antikoru, tubal epitel hücrelerinin apikal bölgelerinde kuvvetli, çevre zarlarında zayıf tutulum göstermiştir. Tüm örneklerde lamina propria ve iç kas tabakasında da yoğun boyanma izlenmiştir. Sitoplazmik EGF-R'nin ise tubal epitel hücrelerinde, iç kas tabakasında ve damar düz kaslarında boyanmadığını, damar endotel hücrelerinde ise zayıf tutulum olduğunu bildirmişlerdir (17).

Sıçanlarda östrus döngüsünde EGF-R tutulumunun immünohistokimyasal olarak belirlendiği bu çalışmada, kan östrojen düzeyine bağlı olarak ekspresyonun değişiklik gösterdiği; artan östrojen düzeyine koşut evrelerde sentezin arttığı belirlenmiştir. Sonuç olarak, tuba uterinaların östrus döngüsünden çok belirgin olarak etkilendiği, kan östrojen düzeyinin tuba uterinaları ovulasyona hazırlamak adına otokrin mekanizma için epitel hücrelerinde, parakrin mekanizma için ise bağ dokusu hücrelerinde EGF-R sinyal sistemini aktive ederek hücre proliferasyonunu sağlıyor olabileceği kanısına varılmıştır.

Yazışma Adresi

Gülnur TAKE

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji ABD

06500 Beşevler, ANKARA

Tel: 0 312 2024614

Fax: 0 312 2124647

e-mail: gtake@gazi.edu.tr

KAYNAKLAR

- Hirata Y., Orth D.N.; Epidermal Growth Factor (Urogastone) in Human Tissues, J.Clin.Endocr.Metab., 48: 667-672.
- Hollis D.E., Frith P.A., Vaughan J.D., Chapman R.E., Nancarrow C.D.; Ultrastructural Changes in The Oviductal Epithelium of Merino Ewes During The Estrous Cycle, Am. J. Anat., 171: 441-456.
- Kaye P.L., Harvey M.B.; The Role of Growth Factors in Preimplantation Development, Prog. Growth Factor Res., 6: 1-24.
- Konishi I.; Development of Ciliated Cells in The Human Fetal Oviduct: An Ultrastructural Study, The Anatomical Record., 219: 60-68.
- Savage C.R., Ingani T., Cohen, S.; The Primary Structure of EGF, J Biol Chem, 274: 7612-7621.
- Savage A.P., Chatterjee V.K., Gregory L.L.; Epidermal Growth Factor in Blood, Regulatory Peptides,16: 199-200.
- İnan V.S., Vatanserver H.S., Özbilgin M.K., Yurtseven M., Tuncel M.; İnsan Tuba Uterina Epitelinin Morfometrik Ve Ultrastrüktürel Olarak Değerlendirilmesi, Türkiye Klinikleri J Med Sci, 20(6): 347-355.
- Wollenhaupt K., Ketler A., Brüssow Kp., Schneider F., Kanitz W., Einspanier R., Regulation of the Expression and Bioactivation of the Epidermal Growth Factor Receptor System by Estradiol in Pig Oviduct and Endometrium, Reprod Fertil Dev,13(2-3): 167-176.
- Adachi K., Kurachi H., Adachi H., Imai T., Sakata M., Homma H., Higashiguchi O., Yamamoto T., Miyake A.; Menstrual Cycle Specific Expression of Epidermal Growth Factor Receptors in Human Fallopian Tube Epithelium.j.Endocrinol,147(3): 553-563.
- Adachi K., Kurachi H., Homma H., Adachi H., Imai T., Saka T., Higashiguchi O., Yamaguchi M., Morishige K., Sakoyama Y., Miyake A.; Estrogen Induces Epidermal Growth Factor (EGF) Receptor and Its Ligands in Human Fallopian Tube: Involvement of EGF but

- not Transforming Growth Factor-alpha in Estrogen-Induced Tubal Growth in Vitro, *Endocrinology*, 136 (5): 2110-2119.
11. Morishige K.I., Kurachi H., Amemiya K., Adachi H., Adachi K., Sakoyama Y., Miyake A., Tanizawa O.; Menstrual Stage Specific Expression of Epidermal Growth Factor and Transforming Growth Factor-Alpha in Human Oviduct Epithelium and Their Role in Early Embryogenesis, *Endocrinology*, 133: 199-207.
 12. Wollenhaupt K., Tiemann U., Eispazier R., Schneider F., Kanits W., Brussow Kp.; Characterization of the Epidermal Growth Factor Receptor in Pig Oviduct and Endometrium, *J. Reprod. Fertil*, 111(2): 173-181.
 13. Swanchara K.W., Henricks D.M., Birrenkott A.B., Bodine A.B., Richardson M.E.; Expression of Epidermal Growth Factor (EGF) and the Receptor in the Porcine Oviduct, *Biol of Rep*, 53: 911-922.
 14. Wollenhaupt K., Eispazier R., Gabler C., Schneider F., Kanitz W., Brussow K.P.; Identification of the EGF/EGF-R System in the Oviduct and Endometrium of Pigs in Early Stages of Pregnancy and Early Conceptus, *Exp.Clin.Endocrinol.Diabetes*, 107(8): 530-538.
 15. Steffl M., Schweiger M., Amselgruber W.M.; Estrous Cycle Specific Immunolocalization of Different Domains of the Epidermal Growth Factor Receptor in the Porcine Oviduct, *Endocrine*, 27(3): 289-294.
 16. Danasouri I., Frances A., Westphal L.M.; Immunocytochemical localization of Transforming Growth Factor -Alpha and Epidermal Growth Factor Receptor in Human Fallopian Tubes and Cumulus Cells, *Am. J. Reprod. Immunol*, 30(2-3): 82-87.
 17. Smotrich D.B., Stillman R.J., Widra E.A., Gindoff P.R., Kaplan P., Graubert M., Johnson K.E.; Immunocytochemical Localization of Growth Factors and Their Receptors in Human Pre-Embryos and Fallopian Tubes, *Hum. Reprod*, 11(1): 184-190.