

## بررسی فراوانی و پراکنش ماکروفاژهای رحمی در روزهای چهارونیم و هفتم بارداری موش NMRI

سمیرا قلی‌زاده<sup>۱</sup> (M.Sc.)، مژده صالح‌نیا<sup>۲</sup> (Ph.D.)، سید محمد موذنی<sup>۱\*</sup> (Ph.D.)  
۱- گروه ایمنولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران  
۲- گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

### چکیده

سابقه و هدف: ماکروفاژها نقش مهمی در لانه‌گزینی مناسب رویان و حفظ بارداری ایفا می‌کنند. این مطالعه به منظور بررسی فراوانی و پراکنش ماکروفاژهای رحمی (تغییرات موضعی) و ماکروفاژهای طحالی (تغییرات سیستمیک) در روزهای چهار و نیم و هفت بارداری موش که متقارن با شروع لانه‌گزینی جنین و استقرار کامل جنین در رحم موش می‌باشد، انجام شد.

مواد و روش‌ها: تعیین روز بارداری از طریق تشخیص پلاک واژینال صورت گرفت. از موش‌های باردار در روزهای چهارونیم و هفتم بارداری خون‌گیری شد و غلظت هورمون‌های ۱۷-بتا-استرادیول و پروژسترون سرم با الیزاسنجش شد. هم‌چنین با استفاده از روش ایمنووهیستوشیمی و آنتی‌بادی ضد شاخص F4/80، فراوانی و چگونگی پراکنش ماکروفاژهای رحم و طحال در روزهای مذکور بررسی شد.

یافته‌ها: این مطالعه نشان داد که فراوانی ماکروفاژها در روز هفتم بارداری در مقایسه با روز چهارونیم کاهش معناداری یافته است. در روز چهارونیم بارداری ماکروفاژها در تمامی نواحی بافت رحم از جمله میومتر، اطراف غدد رحمی و اطراف لومن گسترش داشتند در حالی که در روز هفتم پراکنش آن‌ها به میومتر و استرومای زیر عضلات حلقوی محدود بود. فراوانی ماکروفاژهای طحالی به‌عنوان نماینده‌ای از تغییرات سیستمیک این سلول‌ها در روزهای مورد بررسی تغییر معناداری نداشت. غلظت سرمی ۱۷-بتا-استرادیول و پروژسترون در روز هفتم بارداری نسبت به روز چهارونیم افزایش معناداری داشت.

نتیجه‌گیری: با توجه به تغییرات غلظت هورمون‌های ۱۷-بتا-استرادیول و پروژسترون در طول بارداری و تاثیرات غیر مستقیم آن‌ها بر فراخوانی و پراکنش ماکروفاژها از طریق تنظیم سنتز M-CSF و GM-CSF توسط سلول‌های استرومائی رحم، تغییرات فراوانی و جایگیری این سلول‌ها در رحم طی مراحل مختلف بارداری قابل توجه است. در حالی که عوامل جذب و لانه‌گزینی و منابع تولیدی جاذب‌های شیمیایی ماکروفاژها در طحال با رحم متفاوت است و تحت تاثیر تغییرات غلظت هورمون‌های تخمدانی قرار نمی‌گیرد. با توجه به نقش اساسی ماکروفاژها در لانه‌گزینی رویان و کنترل پاسخ‌های ایمنی مادر، تغییرات این سلول‌ها در موضع بارداری می‌تواند برای پیشبرد بارداری موفق تاثیرگذار باشد.

واژه‌های کلیدی: ماکروفاژها، رحم، کاشت رویان، استرادیول، پروژسترون

(Semi allograft) تلقی می‌شود که باید در طول بارداری توسط سیستم دفاعی مادر تحمل شود. از این رو مکانیسم‌های دقیق تحمل ایمنی به جنین در طول تکامل به وجود آمده‌اند

### مقدمه

بارداری یکی از پیچیده‌ترین پدیده‌های بیولوژیک است [۱]. جنین از لحاظ ایمنولوژیکی یک پیوند نیمه بیگانه

[۴،۳،۲].

تعادل مناسب سایتوکاین‌های Th1/Th2 در بستر جفتی مشارکت دارند [۱۴].

در این تحقیق فراوانی و پراکنش ماکروفاژها را در رحم موش‌های بارداری در روزهای چهارونیم و هفتم بارداری بررسی نمودیم. هم‌چنین برای این‌که مشخص گردد که آیا تغییرات در پراکنش و فراوانی ماکروفاژها به صورت سیستمیک می‌باشد و یا آن‌که به صورت موضعی در رحم اتفاق می‌افتد، تغییرات این سلول‌ها را در طحال نیز به‌عنوان یک عضو لنفاوی سیستمیک بررسی کردیم. این مقایسه در روز چهار و نیم که مقارن با روز لانه‌گزینی بلاستوسیت می‌باشد و روز هفتم بارداری که مراحل اولیه رشد رویان است، صورت گرفت. با توجه به این امر که لانه‌گزینی رویان مرحله اساسی شروع و پیشبرد بارداری است و رحم محل اصلی شکل‌گیری پاسخ ایمنی مادر علیه جنین می‌باشد، لذا بررسی چگونگی تغییرات ماکروفاژها در اوایل بارداری می‌تواند به فهم مکانیزم‌های وقوع و ادامه بارداری کمک نموده و در طراحی روش‌های درمانی موارد پاتولوژیک هم‌چون سقط جنین کمک‌کننده باشد. تا کنون بررسی تغییرات ماکروفاژها در رحم در روزهای مذکور و ارتباط آن با تغییرات هورمون‌های تخمدانی و مقایسه مستقیم آن‌ها صورت نگرفته است.

## مواد و روش‌ها

گروه‌های مورد مطالعه، نمونه‌گیری و تهیه برش بافتی

موش‌های نر و ماده ۸-۶ هفته‌ای از نژاد NMRI از انیستیتویپاستور ایران خریداری شدند و در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و در دمای مناسب ۲۵-۱۸ درجه سانتی‌گراد در حیوان‌خانه دانشگاه تربیت مدرس نگهداری گردیدند. موش‌های ماده جهت هم‌سیکل شدن در قفس‌های جداگانه و دور از موش‌های نر نگهداری می‌شدند. سپس موش‌های ماده به قفس موش‌های نر برای جفت‌گیری و وقوع بارداری انتقال داده شدند.

برای تعیین سن بارداری از تکنیک تشخیص پلاک واژینال استفاده شد. روز مشاهده پلاک واژینال به عنوان روز نیم

لانه‌گزینی (Implantation) مناسب جنین اولیه در رحم برای شروع و ادامه بارداری موفق ضروری است. رحم در مرحله خاصی از سیکل ماهیانه آمادگی پذیرش جنین را پیدا می‌کند [۵]. خاصیت جنین‌پذیری اندومتر وابسته به تغییرات هورمون‌های استروئیدی می‌باشد [۶]. با وجود این‌که لانه‌گزینی توسط هورمون‌های استروئیدی تنظیم می‌شود، سلول‌های ایمنی، سایتوکاین‌ها و فاکتورهای رشد نیز اتصال و لانه‌گزینی بلاستوسیت را میانجی‌گری می‌کنند [۷]. در طول بارداری، هورمون‌ها بر عمل‌کردهای سیستم ایمنی تاثیرگذار هستند [۸] و عمل‌کرد سیستم اندوکرین مادر و محیط ایمنی اطراف رویان تغییر می‌کند [۹]. در واقع هورمون‌های جنسی ۱۷-بتا-استرادیول و پروژسترون نقش مهمی در تعدیل سیستم ایمنی به منظور حفاظت جنین ایفا می‌کنند [۱۰]. پژوهش‌های انجام گرفته نشان می‌دهند که ارتشاح لکوسیت‌ها هم قبل از لانه‌گزینی در آمادگی رحم برای پذیرفتن جنین نقش مهمی دارد [۱۱]. انواع سلول‌های ایمنی در موضع لانه‌گزینی با ترشح مدیاتورها و سایتوکاین‌ها باعث شکل‌گیری دسیدوا می‌شوند [۱۲].

ماکروفاژها از فراوان‌ترین سلول‌های ایمنی رحم‌اند [۴]. این سلول‌ها از طریق بیان رسپتور-لیگاندهای متنوع به ناحیه تروفوبلاست فراخوانده می‌شوند [۱۳] و به عنوان سلول‌های پشتیبان از راه تسهیل نفوذ تروفوبلاست به لانه‌گزینی کمک می‌کنند [۱۴، ۱۵]. ماکروفاژها در تنظیم پاسخ‌های ایمنی در سطح تماس مادر-جنین نیز نقش دارند و در تحمل ایمنی مادر نسبت به رویان سهیم‌اند [۱۶]. از جمله عمل‌کردهای ماکروفاژها می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: ماکروفاژهای دسیدوا فنوتایپ ویژه‌ای دارند که هموستاز، رشد جفت و تولرانس جنین را باعث می‌شود [۴]. ماکروفاژها با عمل عرضه آنتی‌ژن و توانایی تعدیل ایمنی، به عنوان عناصر کلیدی برای هموستاز سیستم ایمنی مادر در طول بارداری عمل می‌کنند [۱۷]. سلول‌های ایمنی مخصوصاً ماکروفاژها منبع اصلی سایتوکاین‌ها و فاکتورهای رشد هستند و برای حفظ

فسفات (Phosphate buffered saline: PBS) و هر بار به مدت دو دقیقه شسته شدند. محلول بلاک‌کننده پروتئین Protein block serum - free (Dako, Denmark) به مدت ۱۵ دقیقه بر روی بافت‌ها اضافه شد. بافر بلاک‌کننده رسیپتور FC (سرم بز) با غلظت ۲٪ به مدت ۴۵ دقیقه بر روی بافت‌ها اضافه شد. پراکسیداز اندوزن، با اضافه کردن محلول  $H_2O_2$  ۳٪ به مدت ۱۰ دقیقه خنثی شد. البته با اضافه نمودن آنزیم متصل به استریتو اویدین و متعاقب آن اضافه نمودن سوبسترا، بافت رحم و طحال از نظر حضور بیوتین اندوزن نیز بررسی شد که مشخص شد فاقد بیوتین اندوزن است و نیازی به بلاک کردن آن نیست. آنتی-بی-آدی (Rat anti mouse F4/80 - ebioscience, USA) با غلظت ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر در بافر رقیق‌کننده آنتی‌بادی (antibody diluent) (BD Bioscience, USA) مخلوط شده و بر روی برش‌های بافتی اضافه گردید. اسلایدها به مدت ۹۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق و در اتاقک مرطوب انکوبه شدند. آنتی‌بادی ضد IgG رت کونژوگه با بیوتین (Biotinylated goat anti-rat IgG) (BD Bioscience, USA) با رقت ۱:۵۰ در بافر رقیق‌کننده آنتی‌بادی رقیق گردیده و به اسلایدها اضافه شده و به مدت ۴۵ دقیقه انکوبه گردید. پس از پایان مدت انکوباسیون، استریتو اویدین کونژوگه با آنزیم پراکسیداز (HRP conjugated strepto-avidine) (BD Bioscience, USA) به روی اسلایدها اضافه و به مدت ۴۰ دقیقه انکوبه شدند. سپس سوبسترای ۳,۳'-DAB (BD Bioscience, USA) Diaminobenzidine اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه باقی ماند. ظهور رنگ قهوه‌ای زیر میکروسکوپ بررسی گردید و سوبسترای اضافی از روی لام شسته شد. به منظور رنگ‌آمیزی بافت‌ها با رنگ زمینه، اسلایدها به مدت ۳۰ ثانیه در رنگ هماتوکسیلین هاریس (Merck, Germany) قرار داده شده و با آب جاری شسته شدند. لازم به ذکر است در فواصل هر کدام از مراحل به جز مرحله استفاده از محلول سرم بلوک‌کننده پروتئین، سه مرتبه شست و شو با PBS و هر بار به مدت دو دقیقه انجام شد. پس

بارداری در نظر گرفته شد. پس از گذشت چهارونیم و هفت روز از زمان مشاهده پلاک واژینال، موش‌های باردار هر دو گروه با تزریق کنامین (۱۰۰ mg/kg) و زایلین (۱۰ mg/kg) به صورت داخل صفاقی بی‌هوش شدند. پس از خون‌گیری از قلب به منظور تهیه سرم، موش‌ها به روش قطع نخاع کشته شدند. رحم و طحال موش خارج شده و در زیر میکروسکوپ لوپ بررسی شد. در روز چهارونیم وضعیت بافتی لوله رحمی مورد بررسی قرار گرفت و در روز هفتم نقاط کاشت جنین تعیین شدند و بافت رحمی به منظور تهیه برش بافتی مورد استفاده قرار گرفت.

قطعات بافتی رحم و طحال در قالب‌های حاوی چسب (Optimal cutting tissue: OCT) (Bio optica, Italy) با جهت مناسب قرار داده شده و در فلاسک ازت فرو برده شدند. پس از یخ زدن چسب فروزن، قالب‌ها خارج و تا زمان تهیه برش در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. نهایتاً با استفاده از دستگاه Cryostat (Leica) برش‌های انجمادی به ضخامت ۷ میکرومتر تهیه شده و پس از فیکس نمودن در استون ۲۰- درجه سانتی‌گراد، برای مطالعه ایمونوهیستوشیمی مورد استفاده قرار گرفتند. در هر دو گروه موش باردار مربوط به روزهای چهارونیم و هفتم بارداری از ۷ سر موش باردار استفاده شد.

#### بررسی غلظت ۱۷-بتا-استرادیول و پروژسترون:

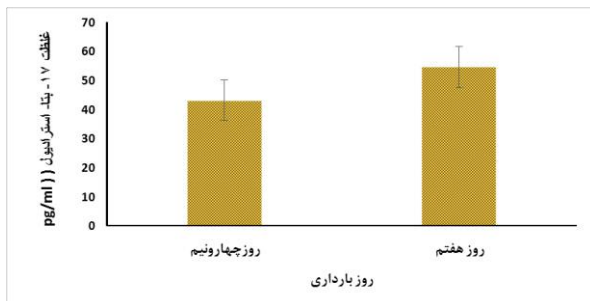
برای تعیین غلظت هورمون‌های استروئیدی ۱۷-بتا-استرادیول و پروژسترون از سرم موش‌های باردار استفاده شد، بدین ترتیب که در روزهای چهارونیم و هفتم بارداری از قلب موش‌ها خون‌گیری به عمل آمد و سرم جدا گردید. در نهایت میزان هورمون‌های مذکور در سرم با روش الایزا اندازه‌گیری شد.

رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی بافت رحم و طحال با آنتی‌بادی ضد F4/80. اسلایدها از فریزر خارج و به مدت سی دقیقه در حرارت آزمایشگاه خشک شدند. اطراف برش‌های بافتی با Dako pen (Dako, Denmark) علامت‌گذاری شد. برش‌های بافتی سه بار با بافر نمکی

نمودارها، مقادیر P کم‌تر از ۰/۰۵، ۰/۰۱، ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۰۱ به ترتیب با یک ستاره (\*)، دو ستاره (\*\*)، سه ستاره (\*\*\*) و چهار ستاره (\*\*\*\*) نشان داده شدند.

## نتایج

سنجش هورمون‌های ۱۷-بتا-استرادیول و پروژسترون سرم. مقایسه میزان هورمون‌های ۱۷-بتا-استرادیول و پروژسترون در روزهای چهارونیم و هفتم بارداری نشان داد که غلظت این هورمون‌ها در روز هفتم در مقایسه با روز چهارونیم به طور معناداری بیش‌تر است. در روزهای چهارونیم و هفتم بارداری میانگین میزان ۱۷-بتا-استرادیول سرم برحسب پیکوگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب  $43/21 \pm 7/01$  و  $54/61 \pm 6/88$  برآورد گردید ( $P=0/009$ ) و میانگین میزان پروژسترون سرم برحسب نانوگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب  $16/98 \pm 5/12$  و  $26/68 \pm 5/03$  تعیین شد ( $P=0/008$ ) (شکل ۲و۱).



شکل ۱. غلظت ۱۷بتا استرادیول بر حسب pg/ml در روزهای چهارونیم و هفتم بارداری. افزایش معنادار در غلظت ۱۷-بتا-استرادیول سرم در روز هفتم بارداری ( $P < 0/01$ ) در مقایسه با روز چهارونیم بارداری مشاهده شد. نتایج به صورت  $Mean \pm SD$  هفت آزمایش مستقل نشان داده شده است.

پراکنندگی ماکروفاژهای رحمی در روزهای چهارونیم و هفتم بارداری. رنگ‌آمیزی بافت رحم با آنتی‌بادی ضد F4/80 نشان داد که در روز چهارونیم بارداری ماکروفاژها در سر تا سر بافت رحم پراکنده هستند (شکل ۳). این سلول‌ها در اطراف میومتر و در بخش‌های مختلف دسیدوا از جمله اطراف غدد رحمی و اطراف لومن حضور دارند (شکل ۴). در روز هفتم بارداری پراکنش ماکروفاژها در مقایسه با روز چهارونیم

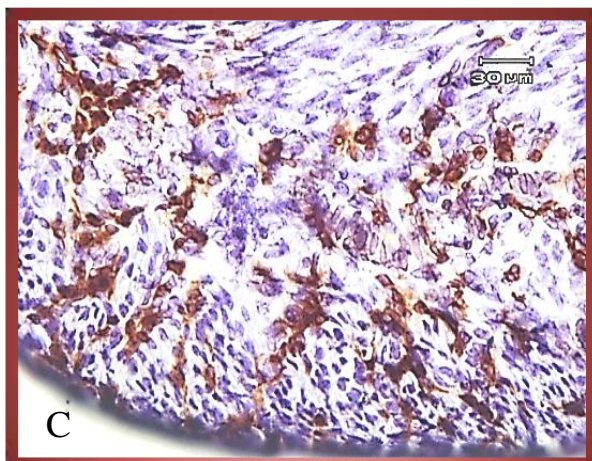
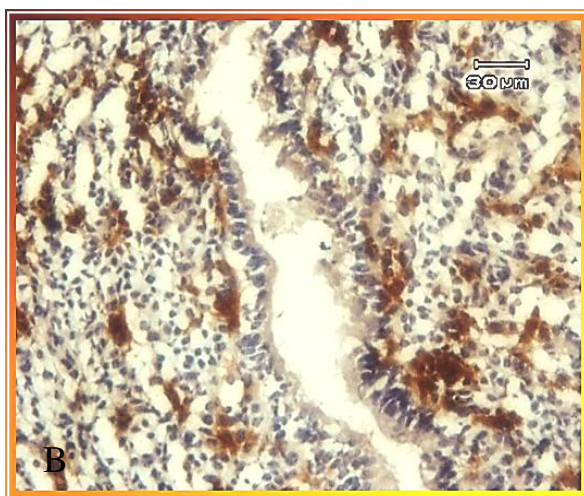
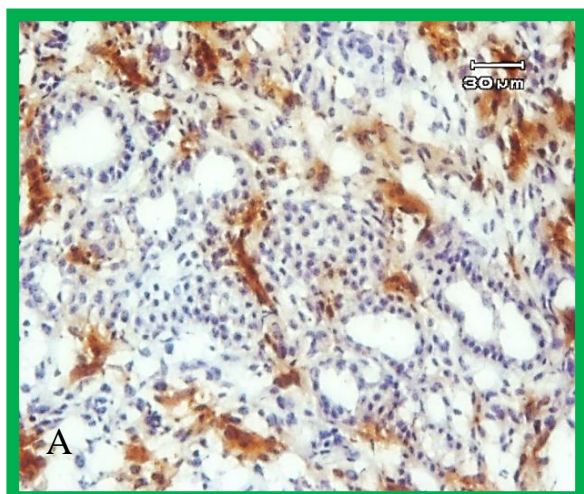
از انجام مراحل آگیری با درجات فزاینده اتانول هر کدام به مدت ۳۰ ثانیه، اسلایدها توسط زایللول (Merck, Germany) شفاف شده و سپس با چسب مانت ان تلان (Merck, Germany) مانته شدند [۱۸].

پس از اتمام رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی دو سلول متفاوت از نظر رنگ در زیر میکروسکوپ مشاهده گردید، سلول‌های با هسته آبی که از نظر شاخص F4/80 منفی بوده و رنگ زمینه همتوکسیلین را به خود گرفته‌اند و سلول‌هایی که از نظر شاخص F4/80 مثبت بوده و سیتوپلاسم آن‌ها تحت تأثیر آنزیم پراکسیداز و سوبسترا رنگ قهوه‌ای به خود گرفته‌اند.

روش شمارش سلولی. شمارش سلول‌ها با استفاده از نرم‌افزار Image J صورت گرفت. برای تعیین درصد ماکروفاژها در بافت رحم، از سه منطقه بافت رحم شامل میومتر و دو بخش دسیدوا (اطراف لومن و غدد رحمی) از هر کدام به تفکیک پنج فیلد با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ انتخاب و تعداد کل سلول‌های F4/80<sup>+</sup> (سلول‌های قهوه‌ای) و کل سلول‌های هسته‌دار (سلول‌های آبی و قهوه‌ای) شمارش شدند. سپس تعداد سلول‌های قهوه‌ای به مجموع سلول‌های آبی و قهوه‌ای در همان سطح تقسیم شد و درصد سلول‌های مورد نظر تعیین گردید.

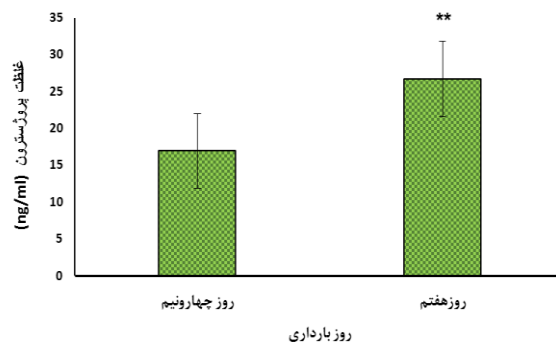
در مورد سلول‌های طحالی نیز از هر طحال پنج فیلد میکروسکوپی به صورت تصادفی انتخاب و با روش مذکور مورد بررسی قرار گرفتند.

تجزیه و تحلیل آماری. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS 16 و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام شد. جهت مقایسه بین گروه‌ها بر حسب نوع مقایسه و تعداد داده‌ها از آزمون آماری independent sample T test و در مقایسات درون گروه‌ها از آزمون‌های آماری pair T test و repeated measure استفاده شد. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار (SD)  $mean \pm (SD)$  نمایش داده شده‌اند. حدود اطمینان در تمامی آزمایشات ۹۵٪ در نظر گرفته شد و P کم‌تر از ۰/۰۵ معنی‌دار محسوب گردید. در

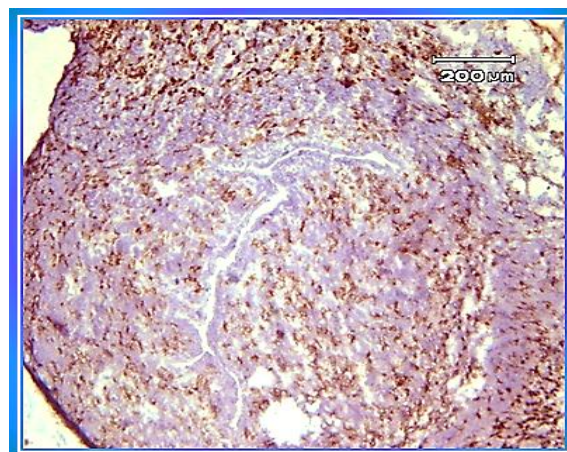


شکل ۴. رنگ آمیزی برش‌های بافتی نواحی مختلف بافت رحم در روز چهارونیم بارداری با آنتی‌بادی ضد F4/80. (استرومای اطراف غدد رحمی: A، اطراف لومن: B و میومتر: C). سلول‌های F4/80+ با رنگ قهوه ای مشخص شده اند و سلول‌های آبی شاخص F4/80 را بیان نکرده و رنگ زمینه (آبی) را به خود گرفته‌اند.

بارداری تفاوت داشت. در روز هفتم بارداری ماکروفاژها در ناحیه میومتر و استرومای زیر عضلات حلقوی بافت رحم تجمع داشتند و ناحیه دسیدوآبی اطراف لومن حاوی تعداد بسیار کمی از ماکروفاژها بود (شکل ۵).

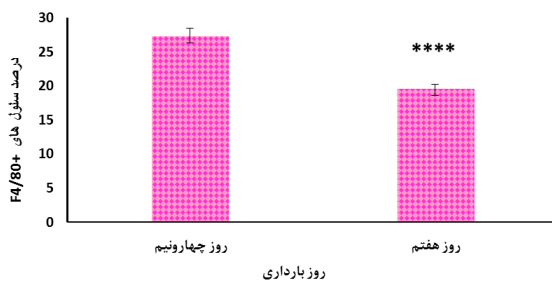


شکل ۲. غلظت پروژسترون بر حسب ng/ml در روزهای چهارونیم و هفتم بارداری. افزایش معنادار در غلظت پروژسترون سرم در روز هفتم بارداری ( $P < 0.01$ ) در مقایسه با روز چهارونیم بارداری مشاهده شد. نتایج به صورت  $Mean \pm SD$  هفت آزمایش مستقل نشان داده شده است



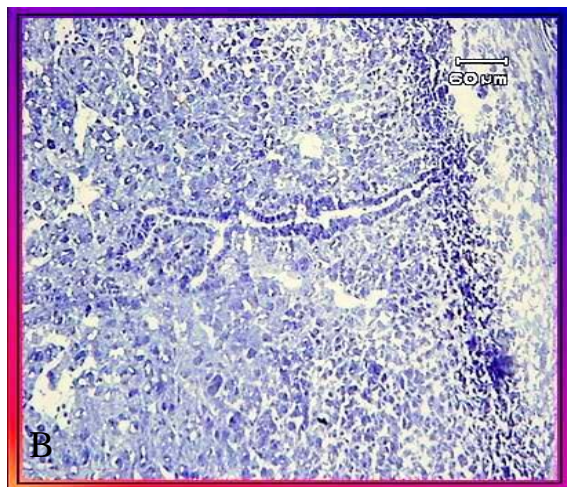
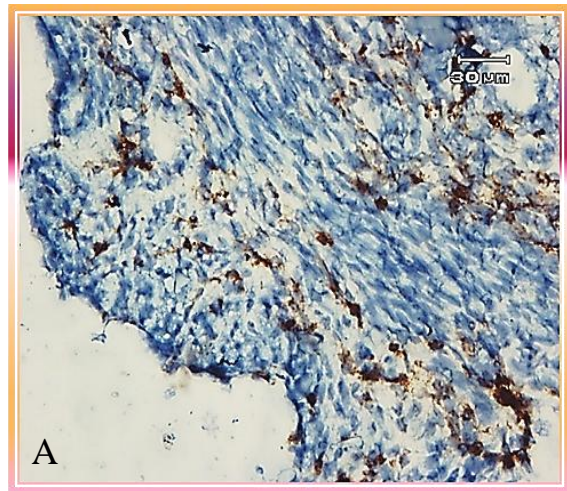
شکل ۳. رنگ آمیزی بافت رحم موش باردار در روز چهارونیم بارداری با آنتی‌بادی ضد F4/80. سلول‌های قهوه ای سلول‌های F4/80+ (ماکروفاژها) هستند، سلول‌های آبی شاخص F4/80 را بیان نکرده و رنگ زمینه (آبی) را به خود گرفته‌اند. پراکنش ماکروفاژها در تمامی نواحی رحم قابل مشاهده است.

چهارونیم بارداری در سه ناحیه اطراف لومن، استرومای مجاور غدد رحمی و میومتر از نظر آماری تفاوت معنی‌داری داشت ( $P < 0.001$ ). درصد سلول‌های  $F4/80^+$  در سه ناحیه اطراف لومن استرومای مجاور غدد رحمی و میومتر به ترتیب  $20.11 \pm 1.66$ ،  $23.19 \pm 1.39$  و  $38.64 \pm 2.27$  برآورد گردید. مقایسه فراوانی ماکروفاژها در دو محل میومتر و اطراف لومن نشان می‌دهد که پراکنش ماکروفاژها در این دو ناحیه نیز از نظر آماری به طور معنی‌داری متفاوت است ( $P < 0.001$ ). هم‌چنین فراوانی ماکروفاژها در دو ناحیه اطراف لومن و استروما نیز به طور معناداری متفاوت است ( $P < 0.001$ ). در نهایت مقایسه درصد این سلول‌ها در دو ناحیه استرومای رحم و میومتر نیز نشان داد پراکنندگی ماکروفاژها در این دو ناحیه هم از نظر آماری معنادار است ( $P < 0.001$ ) (شکل ۷).



شکل ۶. درصد ماکروفاژهای بافت رحم در روزهای چهارونیم و هفتم بارداری. کاهش معنادار در فراوانی ماکروفاژها در روز هفتم بارداری در مقایسه با روز چهارونیم بارداری ( $P < 0.0001$ ) مشاهده شد. نتایج به صورت  $Mean \pm SD$  هفت آزمون مستقل نشان داده شده است.

مقایسه فراوانی ماکروفاژها در نواحی استرومای مجاور عضلات حلقوی و میومتر بافت رحم در روز هفتم بارداری. درصد ماکروفاژهای  $F4/80^+$  در روز هفتم بارداری در دو ناحیه استرومای مجاور عضلات حلقوی و میومتر از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نداشت ( $P = 0.312$ ). درصد سلول‌های  $F4/80^+$  در دو ناحیه استروما و میومتر به ترتیب  $20.71 \pm 3.24$  و  $17.99 \pm 2.13$  برآورد گردید.



شکل ۵. رنگ آمیزی بافت رحم در روز هفتم بارداری با آنتی‌بادی ضد  $F4/80$  (میومتر: A و اطراف لومن: B). سلول‌های قهوه‌ای سلول‌های  $F4/80^+$  (ماکروفاژها) هستند و سلول‌های آبی شاخص  $F4/80$  را بیان نکرده و رنگ زمینه (آبی) را به خود گرفته‌اند.

مقایسه فراوانی ماکروفاژهای بافت رحم در روزهای چهارونیم و هفتم بارداری. مقایسه درصد ماکروفاژها در دو روز مورد مطالعه نشان داد که درصد سلول‌های مذکور در روز چهارونیم بارداری به طور معنی‌داری در مقایسه با روز هفتم بارداری بیشتر است ( $P < 0.0001$ ). درصد سلول‌های  $F4/80^+$  در روز چهارونیم بارداری  $27.31 \pm 1.18$  برآورد گردید. اما درصد این سلول‌ها در روز هفتم بارداری  $19.63 \pm 0.66$  تعیین شد (شکل ۶).

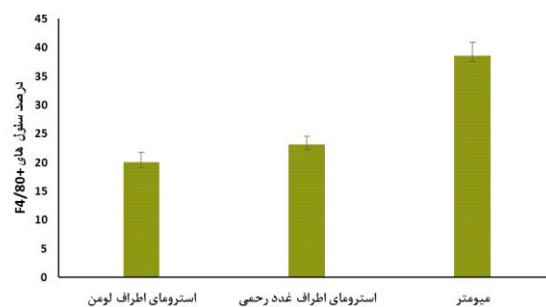
مقایسه فراوانی ماکروفاژها در سه ناحیه اطراف لومن، استرومای مجاور غدد رحمی و میومتر بافت رحم در روز چهارونیم بارداری. درصد سلول‌های  $F4/80^+$  در روز

مقایسه فراوانی ماکروفازهای بافت طحال در روزهای چهارونیم و هفتم بارداری. به منظور بررسی اثر تغییرات هورمون‌های جنسی بر فراوانی و جایگیری ماکروفازها در ارگان‌های لنفاوی (تغییرات سیستمیک)، طحال موش‌ها در روزهای چهارونیم و هفتم بارداری به عنوان نمونه‌ای از بافت‌های لنفاوی مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت. نتایج حاصله نشان داد که اولاً این سلول‌ها غالباً در ناحیه پولپ قرمز و اطراف فولیکول‌های لنفاوی پراکنده‌اند و از طرفی فراوانی ماکروفازهای پولپ قرمز بافت طحال در روزهای چهارونیم و هفتم بارداری تفاوت معنی‌داری ندارد ( $P=0/459$ ). درصد این سلول‌ها در روز چهارونیم بارداری  $53/70 \pm 5/43$  و در روز هفتم بارداری  $54/40 \pm 1/76$  سلول‌های هسته‌دار، تعیین شد (شکل ۸).

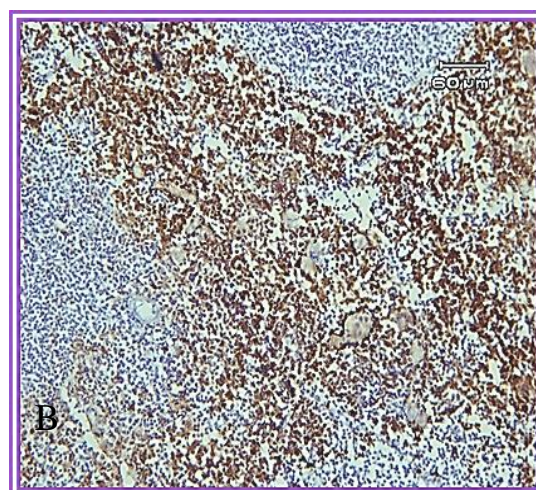
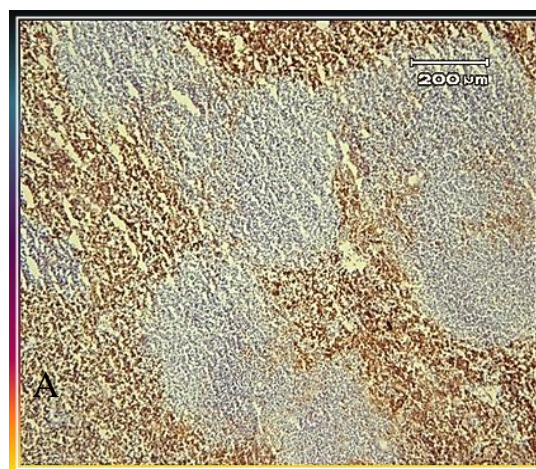
### بحث و نتیجه‌گیری

در این پژوهش فراوانی و جایگیری ماکروفازها در طحال و رحم موش‌های باردار در روزهای چهارونیم و هفتم بارداری با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی بررسی شد. هم‌چنین غلظت هورمون‌های ۱۷-بتا-استرادیول و پروژسترون در دو گروه با روش الایزا سنجش شد. نتایج ما نشان‌دهنده فراوانی بسیار زیاد ماکروفازها در بافت رحمی در روز چهارونیم حاملگی که متقارن با لانه‌گزینی جنین است، می‌باشد. به‌طوری‌که ماکروفازها در این روز  $27/31 \pm 1/18$  درصد کل سلول‌های هسته‌دار اندومتر رحم را تشکیل می‌دادند و در همه لایه‌های اندومتر پراکنده بودند. در روز هفتم بارداری فراوانی ماکروفازها نسبت به روز چهار و نیم بارداری کاهش پیدا کرده اگرچه هنوز این سلول‌ها  $19/63 \pm 0/66$  کل سلول‌های اندومتر را تشکیل می‌دادند. در ضمن در روز هفتم بارداری ماکروفازها بیش‌تر در ناحیه میومتر و استرومای زیر عضلات حلقوی بافت رحم تجمع داشتند.

مطالعات قبلی در سایر نژادهای موشی و در انسان نیز گزارش نموده‌اند که در زمان لانه‌گزینی رویان تعداد



شکل ۷. درصد ماکروفازها در نواحی مختلف بافت رحم در روز چهارونیم بارداری. تفاوت معنادار در فراوانی ماکروفازها در نواحی مختلف بافت رحم در روز چهارونیم بارداری ( $P < 0/0001$ ) مشاهده شد. نتایج به صورت  $Mean \pm SD$  هفت آزمون مستقل نشان داده شده است.



شکل ۸: رنگ آمیزی ماکروفازهای بافت طحال (A x100) و (Bx200) با آنتی‌بادی ضد F4/80 در موش‌های باردار نژاد NMRI. برش‌های بافتی از طحال تهیه شده و با آنتی‌بادی ضد F4/80 رنگ آمیزی شد. سلول‌های قهوه‌ای ماکروفازها هستند و سلول‌های آبی سلول‌هایی هستند که از نظر شاخص F4/80 منفی بوده و رنگ زمینه (آبی) را به خود گرفته‌اند. پراکنش ماکروفازها در هر دو روز مورد مطالعه در پولپ قرمز و اطراف پولپ سفید مشخص است.

ماکروفاژهای رحمی به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد. این ماکروفاژها با اپی‌تلیوم غده‌ای و لومن در ارتباط هستند [۱۹،۲۰]. علت افزایش فراوانی ماکروفاژهای رحمی در اوایل بارداری می‌تواند به دلیل ارتشاح مونوسیت‌های خونی قبل از لانه‌گزینی رویان به موضع رحم باشد [۱۱].

از جمله عواملی که باعث ازدیاد ماکروفاژهای رحمی در ابتدای بارداری می‌شود، می‌توان موارد ذیل را مطرح نمود:

۱. واکنش‌های التهابی که به دنبال جفت‌گیری و ورود اسپرم و مایع سمن به مجرای واژن و نفوذ بلاستوسیست به اپی‌تلیوم رحم رخ می‌دهد.

۲. میزان بالای هورمون‌های استروئیدی زنانه

۳. غلظت‌های افزایش یافته پلی‌پتیدهایی از قبیل CSF-1، GM-CSF، TNF- $\alpha$  [۲۲،۲۱].

فاکتور محرک کلونی CSF-1، Colony stimulating factor: محرک ویژه تکثیر و بلوغ پیش‌سازهای ماکروفاژهاست. ۱۷-بتا-استرادیول و پروژسترون سلول‌های اپی‌تلیالی رحمی را تحریک می‌کنند تا CSF-1 تولید کنند. افزایش غلظت CSF-1 با افزایش تعداد ماکروفاژها و تجمع آن‌ها در نواحی اپی‌تلیالی در دوره پیش از لانه‌گزینی همراه است [۲۳]. هورمون‌های تخمدانی در تنظیم سنتز فاکتور محرک کلونی مونوسیت-گرانولوسیت (GM-CSF) Granulocyte monocyte - colony stimulating factor: از سلول‌های اپی‌تلیالی نیز نقش اساسی دارند [۲۴،۲۵]. یکی دیگر از جاذب‌های شیمیایی مونوسیت‌ها، پروتئین جاذب مونوسیت (MCP-1) Monocyte chemoattractant protein: است. این سایتوکاین توسط سلول‌های استرومای اندومتر ترشح می‌شود [۲۶].

با توجه به نقش مهم ماکروفاژها در زمان لانه‌گزینی، فراوانی این سلول‌ها در روز چهارونیم بارداری قابل توجهی است. در روز چهارونیم بارداری ماکروفاژها در تمامی نواحی رحم حضور داشتند. فراوانی این سلول‌ها در اطراف اپی‌تلیوم لومن نقش اساسی این سلول‌ها را در جایگیری بلاستوسیست دلالت می‌کند. در حالی‌که در روز هفتم بارداری ماکروفاژها

عمدتاً در ناحیه میومتر و اندومتر مجاور عضلات تجمع داشتند و ناحیه دسیدوایی شده اطراف لومن تقریباً خالی از ماکروفاژ بود. در ضمن فراوانی ماکروفاژهای رحمی در روز هفتم بارداری نسبت به روز چهارونیم کاهش قابل ملاحظه‌ای نشان داد. Miller و Hunt نیز گزارش نموده‌اند که پس از لانه‌گزینی در موش، ماکروفاژهای رحم از دسیدوآی قاعده‌ای به سمت غدد رحمی و میومتر حرکت می‌کنند [۲۷]. هم‌راه با پروسه دسیدوایی شدن و لانه‌گزینی بلاستوسیست، سلول‌های اپی‌تلیالی رحم که منبع اصلی تولید CSF-1 می‌باشند تخریب می‌شوند لذا تولید و ترشح CSF-1 کاهش یافته و این امر عدم حضور ماکروفاژها را در دسیدوآی پس از لانه‌گزینی توضیح می‌دهد [۱۹،۲۳].

به‌طور کلی تنظیم فراوانی و جایگیری ماکروفاژها در اندومتر به سنتز سایتوکاین‌ها و کموکاین‌هایی بستگی دارد که از طریق ۱۷-بتا-استرادیول و پروژسترون تنظیم می‌شوند [۲۸]. نشان داده شده است که فراوانی ماکروفاژها در رحم به شدت تحت تاثیر محرک‌های اندوکراین تغییر می‌کند [۲۹]. شرایط التهابی و میزان بالای ۱۷-بتا-استرادیول، مراحل اولیه و انتهایی بارداری را مشخص می‌کنند در حالی که پروژسترون در میانه بارداری غالب می‌شود. نوسان هورمون‌های استروئیدی، تولید سایتوکاین‌های رحمی را رهبری می‌کنند [۲۱]. این دو هورمون در مواردی اثر آنتاگونیست داشته به‌صورتی‌که در مطالعه‌ای نشان داده شد که تلقیح ۱۷-بتا-استرادیول به رت به تنهایی سبب مهاجرت شدید سلول‌های OX-41<sup>+</sup> (سلول‌های دندریتیک، ماکروفاژها، گرانولوسیت‌ها) به رحم می‌شود ولی در تلقیح پروژسترون به هم‌راه ۱۷-بتا-استرادیول تجمع سلول‌های OX-41<sup>+</sup> کم‌تر از زمانی است که ۱۷-بتا-استرادیول به تنهایی تلقیح شود [۳۰]. ۱۷-بتا-استرادیول موجب تولید و یا رهاسازی GM-CSF توسط سلول‌های اپی‌تلیالی رحم می‌گردد، در حالی که پروژسترون مانع این عمل می‌شود [۳۱].

علاوه بر این نحوه تاثیر این دو هورمون به صورت وابسته به دز بوده به‌صورتی‌که تیمار سلول‌های استرومایی اندومتر با



در فراخوانی و لانه‌گزینی فاگوسیت‌های تک هسته‌ای دخالت دارند [۳۴].

یکسان بودن فراوانی و پراکنش ماکروفاژها در هر دو روز چهارونیم و هفتم بارداری، در طحال نشان می‌دهد که تغییرات هورمون‌های تخمدانی در بارداری اثری بر فراوانی و چگونگی پراکنش ماکروفاژها در طحال نداشته است. با توجه به عدم تاثیرپذیری ماکروفاژهای طحالی از عواملی هم چون CSF-1 که در پاسخ به هورمون‌های تخمدانی ترشح می‌شوند و تولید انواع سایتوکاین‌ها در این بافت ایمنی غلبه پروفایل سایتوکاینی بر اثرات هورمون‌ها در این بافت محتمل است. در مجموع به نظر می‌رسد که تغییرات در فراوانی ماکروفاژها در پاسخ به تغییرات هورمونی به صورت موضعی به وقوع می‌پیوندد و ماکروفاژهای سیستمیک کم‌تر متأثر از تغییرات هورمونی هستند.

در زمان لانه‌گزینی ماکروفاژها در مکان لانه‌گزینی حضور دارند و به نفوذ تروفوبلاست به اندومتر کمک می‌کنند. این سلول‌ها در نزدیکی سلول‌های آپوپتوتیک استقرار یافته‌اند و یکی از انواع مهم سلول‌های واحد رحمی - جفتی (Utero placental unit) هستند. عمل فاگوسیتوز سلول‌های آپوپتوتیک، آزادسازی مدیاتورهای پیش‌التهابی از ماکروفاژها را سرکوب می‌کند و محیط التهابی لانه‌گزینی را به حد متعادل می‌رساند. ارتشاح زیاد ماکروفاژها در شروع بارداری در سطح تماس مادر- جنین نشان می‌دهد که این سلول‌ها در عمل‌کردهای مرتبط با بارداری دخالت دارند. Hunt و همکارانش نشان دادند که ماکروفاژهای مادری که به تغییر وضعیت بافتی کمک می‌کنند، برای گسترش بافت‌های جنینی ضروری هستند [۶]. پس از لانه‌گزینی، با توجه به اتمام پدیده نفوذ تروفوبلاست و کامل شدن ارتباط مادر و جنین، میزان آپوپتوز کاهش یافته و نیاز به حضور ماکروفاژها به منظور حذف سلول‌های آپوپتوتیک کم‌تر می‌شود. کاهش جمعیت ماکروفاژها در روز هفتم بارداری با این نیاز طبیعی کاملاً هماهنگ است و به صورت مستقیم و غیرمستقیم توسط عوامل اندوکرین کنترل می‌گردد.

۱۷-بتا-استرادیول (با دز بالا) بیان mRNA و یا پروتئین MCP-1 را به میزان قابل ملاحظه‌ای مهار می‌کند. پروژستین‌ها نیز تولید پروتئین MCP-1 را مهار می‌کنند [۲۶].

۱۷-بتا-استرادیول باعث افزایش Fas-L بر سطح سلول‌های مونوسیت و القاء آپوپتوز در این سلول‌ها نیز می‌گردد [۳۲]. کاهش تعداد ماکروفاژها در مراحل پیشرفته‌تر بارداری می‌تواند به علت افزایش بیان مولکول‌هایی از قبیل Fas-L که مهاجرت ماکروفاژها را محدود می‌کند و ارتباط این مولکول‌ها با اثرات هورمون‌ها [۳۳] نیز رخ دهد.

با در نظر گرفتن مطالب بیان شده در مورد تاثیر هورمون‌های جنسی بر فراخوانی مونوسیت‌ها به رحم (نقش القایی ۱۷-بتا-استرادیول و اثر منفی پروژسترون در این امر) و همچنین ارتباط بین هورمون‌های تخمدانی و فاکتورهای رشد مخصوصاً GM-CSF (نقش پروژسترون در کاهش تولید این سایتوکاین و افزایش قابل ملاحظه غلظت پروژسترون در روز هفتم بارداری) و در نهایت اثرات تعدیل‌گر پروژسترون بر عمل‌کرد ۱۷-بتا-استرادیول، کاهش ماکروفاژها در روز هفتم دور از انتظار نیست. نتایج ما در ارتباط با بررسی فراوانی ماکروفاژهای طحالی در روزهای ۴/۵ و ۷ بارداری به‌عنوان نماینده تغییرات سیستمیک ماکروفاژها نشان داد که سلول‌های  $F4/80^+$  به میزان بسیار زیادی در پولپ قرمز و ناحیه مارژینال طحال تجمع یافته‌اند. در ضمن فراوانی ماکروفاژهای طحالی در دو روز مورد بررسی تغییر معنی‌داری نداشت.

در مقایسه با موش‌های طبیعی، بسیاری از بافت‌های موش‌های دچار جهش در ژن CSF-1، از جمله رحم و تخمدان تقریباً خالی از ماکروفاژ می‌باشند در حالی که تراکم ماکروفاژها در بافت‌هایی که با سیستم ایمنی در ارتباط هستند از جمله گره لنفاوی و طحال تحت تاثیر این جهش قرار نمی‌گیرند که پیشنهاد می‌کند برخلاف اندام‌های تولید مثلی که یکی از عوامل اصلی فراخوانی ماکروفاژها در آن‌ها تاثیر هورمون‌ها بر سلول‌های اپی‌تلیال و آزاد شدن CSF-1 می‌باشد، در اعضای مثل طحال عوامل دیگری به جز CSF-1

- [9] Yoshinaga K. editor Review of factors essential for blastocyst implantation for their modulating effects on the maternal immune system. *Seminars in cell & developmental biology*; 2008: Elsevier.
- [10] Poole JA, Claman HN. Immunology of pregnancy. *Clin Rev Allergy Immunol* 2004; 26: 161-170.
- [11] Dekel N, Gnainsky Y, Granot I, Mor G. Review article: inflammation and implantation. *Am J Reprod Immunol* 2010; 63: 17-21.
- [12] Zarnani AH, Moazzeni SM, Shokri F, Salehnia M, Jeddi Tehrani M. Analysis of endometrial myeloid and lymphoid dendritic cells during mouse estrous cycle. *J Reprod Immunol* 2006; 71: 28-40.
- [13] Li M, Huang SJ. Innate immunity, coagulation and placenta-related adverse pregnancy outcomes. *Thromb Res* 2009; 124: 656-662.
- [14] Mor G, Abrahams VM. Potential role of macrophages as immunoregulators of pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1: 119.
- [15] Nagamatsu T, Schust DJ. Review: the immunomodulatory roles of macrophages at the maternal—fetal interface. *Reprod Sci* 2010; 17: 209-218.
- [16] Wang WJ, Hao CF, Lin QD. Dysregulation of macrophage activation by decidual regulatory T cells in unexplained recurrent miscarriage patients. *J Reprod Immunol* 2011; 92: 97-102.
- [17] Luppi P. How immune mechanisms are affected by pregnancy. *Vaccine* 2003; 21: 3352-3357.
- [18] Zarnani AH, Moazzeni SM, Shokri F, Salehnia M, Jeddi-Tehrani M. Kinetics of murine decidual dendritic cells. *Reproduction* 2007; 133: 275-283.
- [19] De M, Choudhuri R, Wood G. Determination of the number and distribution of macrophages, lymphocytes, and granulocytes in the mouse uterus from mating through implantation. *J Leukoc Biol* 1991; 50: 252-262.
- [20] Nagamatsu T, Schust DJ. Review article: the contribution of macrophages to normal and pathological pregnancies. *Am J Reprod Immunol* 2010; 63: 460-471.
- [21] Hunt JS, Robertson SA. Uterine macrophages and environmental programming for pregnancy success. *J Reprod Immunol* 1996; 32: 1-25.
- [22] Robertson SA, O'Connell AC, Hudson SN, Seamark RF. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) targets myeloid leukocytes in the uterus during the post-mating inflammatory response in mice. *J Reprod Immunol* 2000; 46: 131-154.
- [23] De M, Sanford T, Wood GW. Relationship between macrophage colony-stimulating factor production by uterine epithelial cells and accumulation and distribution of macrophages in the uterus of pregnant mice. *J Leukoc Biol* 1993; 53: 240-248.
- [24] Robertson SA, Mayrhofer G, Seamark RF. Ovarian steroid hormones regulate granulocyte-macrophage colony-stimulating factor synthesis by uterine epithelial cells in the mouse. *Biol Reprod* 1996; 54: 183-196.
- [25] Robertson SA. GM-CSF regulation of embryo development and pregnancy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2007; 18: 287-298.
- [26] Arici A, Senturk LM, Seli E, Bahtiyar MO, Kim G. Regulation of monocyte chemotactic protein-1 expression in human endometrial stromal cells by estrogen and progesterone. *Biol Reprod* 1999; 61: 85-90.
- [27] Miller L, Hunt JS. Sex steroid hormones and macrophage function. *Life Sci* 1996; 59: 1-14.
- [28] Hudson SN, Seamark RF, Robertson SA. The effect of restricted nutrition on uterine macrophage populations in mice. *J Reprod Immunol* 1999; 45: 31-48.

با توجه به نقش مهم ماکروفاژها در لانه‌گزینی و نحوه خاص استقرار این سلول‌ها در مناطق مختلف رحم، هر گونه تغییر در نحوه پراکنش ماکروفاژها ممکن است نفوذ رویان و پدیده لانه‌گزینی بلاستوسیست به رحم را متاثر سازد. لذا بررسی تغییرات ماکروفاژهای رحمی در موارد حاملگی غیر طبیعی مانند سندرم پری‌اکلامپسی و یا سقط مکرر خودبه خودی و یا در موارد ناباروری به علت عدم لانه‌گزینی و یا لانه‌گزینی ناقص جنین به‌عنوان یکی از دلایل احتمالی مشکلات بارداری پیشنهاد می‌گردد که نیاز به مطالعه و بررسی پیش‌تری دارد.

## تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از پایان‌نامه مصوب دانشگاه تربیت مدرس می‌باشد. بدین وسیله از حمایت‌های مالی این دانشگاه تقدیر و تشکر می‌شود. در ضمن نویسندگان مقاله از سرکار خانم شیما سادات شفاپی به دلیل کمک در انجام آزمایشات الایزا تشکر می‌نمایند.

## منابع

- [1] Girardi G, Prohászka Z, Bulla R, Tedesco F, Scherjon S. Complement activation in animal and human pregnancies as a model for immunological recognition. *Mol Immunol* 2011; 48: 1621-130.
- [2] Thellin O, Heinen E. Pregnancy and the immune system: between tolerance and rejection. *Toxicology* 2003; 185: 179-184.
- [3] Shojaeian J, Moazzeni SM, Nikoo S, Bozorgmehr M, Nikougoftar M, Zarnani AH. Immunosuppressive effect of pregnant mouse serum on allostimulatory activity of dendritic cells. *J Reprod Immunol* 2007; 75: 23-31.
- [4] Shakhawat A, Shaikly V, Elzatma E, Mavrakos E, Jabeen A, Fernández N. Interaction between HLA-G and monocyte/macrophages in human pregnancy. *J Reprod Immunol* 2010; 85: 40-46.
- [5] Tsampalas M, Grیدهlet V, Berndt S, Foidart J-M, Geenen V, d'Hauterive SP. Human chorionic gonadotropin: a hormone with immunological and angiogenic properties. *J Reprod Immunol* 2010; 85: 93-98.
- [6] Lee KY, DeMayo FJ. Animal models of implantation. *Reproduction* 2004; 128: 679-695.
- [7] Maybin JA, Critchley HO, Jabbour HN. Inflammatory pathways in endometrial disorders. *Mol Cell Endocrinol* 2011; 335: 42-51.
- [8] Robinson DP, Klein SL. Pregnancy and pregnancy-associated hormones alter immune responses and disease pathogenesis. *Horm Behav* 2012; 62: 263-271.

keratinocyte growth, and enhanced wound healing. *J Exp Med* 1992;175(6):1717-28.

[32] Kovats S, Carreras E. Regulation of dendritic cell differentiation and function by estrogen receptor ligands. *Cell Immunol* 2008;252(1):81-90.

[33] Hunt JS, Miller L, Platt JS. Hormonal regulation of uterine macrophages. *Clin Develop Immunol* 1998; 6: 105-110.

[34] Pollard JW, Lin EY, Zhu L. Complexity in uterine macrophage responses to cytokines in mice. *Biol Reprod* 1998; 58: 1469-1475.

[29] Cohen PE, Nishimura K, Zhu L, Pollard JW. Macrophages: important accessory cells for reproductive function. *J Leukoc Biol* 1999; 66: 765-772.

[30] Wira CR, Kaushic C, Richardson J. Role of sex hormones and cytokines in regulating the mucosal immune system in the female reproductive tract. *Mucosal Immunol Acad Press* 1999: 1449-1461.

[31] Kaplan G, Walsh G, Guido L, Meyn P, Burkhardt R, Abalos R, et al. Novel responses of human skin to intradermal recombinant granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor: Langerhans cell recruitment,

# Frequency and distribution of uterine macrophages on days 4.5 and 7 of pregnancy in NMRI mice

Samira Gholizadeh (M.Sc)<sup>1</sup>, Mojdeh Salehnia (Ph.D)<sup>2</sup> and Seyed Mohammad Moazzeni (Ph.D)<sup>\*1</sup>

1 - Dept. of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2 - Dept. of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

(Received: 16 Jul 2014; Accepted: 17 Mar 2015)

**Introduction:** Macrophages play a crucial role in appropriate embryo implantation and maintenance of pregnancy. This study was done to evaluate the frequency and distribution of uterine (local changes) and spleen (systemic changes) macrophages on days 4.5 and 7 of NMRI mouse pregnancy which are simultaneous with beginning of implantation and complete establishment of embryo in the uterus.

**Materials and methods:** The precise day of pregnancy was determined through vaginal plug detection. Blood was collected from pregnant mice on days 4.5 and 7 of gestation and serum 17- $\beta$  estradiol and progesterone concentrations were measured using the ELISA method. The frequency and localization of macrophages in different regions of uterus and spleen were also investigated by immunohistochemistry staining using anti F4/80 antibody.

**Results:** The results of this study showed that frequency of uterine macrophages has decreased on day 7 in comparison to day 4.5 of gestation. Macrophages are distributed throughout the whole uterus on day 4.5 while their distribution was restricted to myometrium and stroma beneath the circular muscles on day 7 of pregnancy. The frequency of spleen macrophages as a representative of their systemic changes was not different in studied groups. Serum 17- $\beta$  estradiol and progesterone concentrations increased significantly on day 7 compared to day 4.5 of pregnancy.

**Conclusion:** Considering the changes in 17- $\beta$  estradiol and progesterone concentrations and their indirect effects on macrophages recruitment through regulation of M-CSF and GM-CSF secretion by uterine stromal cells, the differences in frequency and distribution of macrophages in different stages of pregnancy could be explained. While the macrophages chemotactic factors and homing receptors and their sources in spleen are different from uterus and don't response to ovarian hormones variations. Regarding the role of macrophages in embryo implantation and regulation of feto-maternal immune responses, it seems that the changes in their frequency and localization can be helpful for a successful pregnancy.

**Key words:** Macrophage, Uterus, Embryo implantation, Estradiol, Progesterone

\* Corresponding author. Tel: +98 21 82883846

moazzeni@modares.ac.ir