

# Kontrollü Ovaryen Hiperstimülasyon Uygulanmış Sıçanlarda Sildenafil Sitratinin Endometriyum Reseptivitesinde Rol Oynayan IGF-1 ve bFGF Ekspresyonları Üzerine Etkisi

## The Effect of Sildenafil Citrate on IGF-1 and bFGF Expression Acting on Endometrial Receptivity in Controlled Ovarian Hyperstimulated Rats

Dr. Serdar FİLİZ,<sup>a</sup>  
Dr. Pelin COŞTUR BIYIKSIZ,<sup>a</sup>  
Dr. Birol VURAL<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Histoloji ve Embriyoloji AD,  
Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
<sup>b</sup>Acıbadem Hastanesi,  
Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği,  
Kocaeli

Geliş Tarihi/Received: 21.11.2009  
Kabul Tarihi/Accepted: 04.10.2010

*Bu çalışma II. Üreme Tıbbi Derneği Kongresi (1-4 Ekim 2009, Antalya)'nde bildirilerek sunulmuştur.*

Yazışma Adresi/Correspondence:  
Dr. Serdar FİLİZ  
Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Histoloji ve Embriyoloji AD, Kocaeli,  
TÜRKİYE/TURKEY  
serdarfiliz@yahoo.com

**ÖZET Amaç:** Kontrollü ovaryen hiperstimülasyon (KOH) uygulanmış sıçanlarda sildenafil sitratinin (Ss) implantasyon pencere döneminde endometriyum reseptivitesinde rol oynayan faktörlerden insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) ve bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) ekspresyonlarına etkisini araştırmaktır. **Gereç ve Yöntemler:** Çalışmamızda, üç aylık 220-250 gram ağırlığında Wistar albino dişi sıçanlar kullanıldı. Bunlar; Kontrol, KOH, Ss ve KOH + Ss grupları olmak üzere dört gruba ayrıldı. Sıçanlar, gruplarına göre yapılan üç günlük uygulamadan sonra dördüncü gün çiftleşmek üzere erkek sıçanlarla bir gece bir arada bırakıldı. Ertesi gün, vajinal smeaarda spermatozoa görülenler, gebeliğin sıfırıncı gününde kabul edildi. Gebeliğin üç, dört ve beşinci günlerinde bulunan sıçanlar sakrifiye edildi. Uterusları çıkarılıp takipleri yapıldıktan sonra immünohistokimyasal yöntemle boyanarak kesitler değerlendirildi. **Bulgular:** Üçüncü günde glandular epitelde en yoğun IGF-1 immünoaktivitesi, KOH + Ss grubunda, luminal epitel ile stromal hücrelerde, Ss ve KOH + Ss gruplarında saptandı. Dördüncü günde luminal epiteldeki immünoaktivite, belirgin olarak Ss grubunda fazlayken beşinci günde luminal epitel, glandular epitel ve stromal hücrelerde en yoğun IGF-1 immünoaktivitesi, Ss grubundaydı. En yoğun bFGF immünoaktivitesi, üçüncü günde luminal epitelde ve stromal hücrelerde Ss grubunda, glandular epitelde Ss ve KOH gruplarında belirlendi. Dördüncü günde luminal epiteldeki bFGF immünoaktivitesi, belirgin olarak Ss grubunda yoğunken glandular epitel, stromal hücreler, endotel ve miyometriyumda Ss ve KOH gruplarında belirgindi. Beşinci günde ise luminal ve glandular epitelde bFGF immünoaktivitesi, Ss grubunda yoğun olarak saptandı. **Sonuç:** Bulgularımız, sildenafil sitratinin, sıçanlarda implantasyon pencere döneminde IGF-1 ve bFGF ekspresyonlarını etkileyerek hem implantasyon hem de desidualizasyonda rol oynadığını göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Ovulasyon indüksiyonu; endometriyum; insülin benzeri büyüme faktörü I; fibroblast büyüme faktörü 2; sildenafil; embriyo implantasyonu

**ABSTRACT Objective:** To investigate the effect of sildenafil citrate (Sc) on expressions of insulin like growth factor-1 (IGF-1) and basic fibroblast growth factor (bFGF) which are two of the factors taking part in endometrium receptivity in implantation window period in rats which controlled ovarian hyperstimulation (COH) was performed. **Material and Methods:** In our study, three months old, 220-250 gram weighted female Wistar albino rats were used. Those were divided into four groups as control, COH, Sc and COH+Sc groups. Rats were put together with male rats for copulation on the fourth day following administrations, lasting for three days according to their groups. Rats with spermatozoa in their vaginal smear the next day were accepted as on the zeroth day of pregnancy. Rats on the third, fourth and fifth day of pregnancy were sacrificed. Their uteruses were resected, cross-sections were stained with immunohistochemical method and examined. **Results:** On the third day, the most intensive IGF-1 immunoreactivity in glandular epithelium was detected in COH+Sc group, where as it was detected in luminal epithelium and stromal cells in Sc and COH+Sc groups. While immunoreactivity in luminal epithelium was significantly high in Sc group on the fourth day, the most intensive IGF-1 immunoreactivity in luminal epithelium, glandular epithelium and stromal cells was in Sc group on the fifth day. The most intensive bFGF immunoreactivity was detected in Sc group in luminal epithelium and stromal cells and in Sc and COH groups in glandular epithelium on the third day. On the fourth day, while bFGF immunoreactivity in luminal epithelium was significantly intensive in Sc group, it was prominent in glandular epithelium, stromal cells, endothelium and myometrium in Sc and COH groups. On the other hand, bFGF immunoreactivity in luminal and glandular epithelium was detected intensively in Sc group on the fifth day. **Conclusion:** Our results showed that sildenafil citrate took part both in implantation and decidualization by affecting IGF-1 and bFGF expressions in implantation window period in rats.

**Key Words:** Ovulation induction; endometrium; insulin-like growth factor I; fibroblast growth factor 2; sildenafil; embryo implantation

Uterusun iç kısmını döşeyen endometriyum, sürekli yenilenme dönemleri yaşayan ve gebelikte çok önemli rol oynayan bir dokudur. Menstrual siklus süresince östrojene bağlı ovulasyon öncesi çoğalma fazı, progesterona bağlı ovulasyon sonrası salgılama fazı ve progesteronun düşmesine bağlı menstrual faz değişiklikleri gösterir.<sup>1</sup> Embriyo implantasyonu, pek çok türün üreme faaliyetleri açısından çok kritik bir basamaktır. Başarılı bir implantasyon için reseptif (alıcı) endometriyum, gelişiminin blastosist evresinde olan normal ve fonksiyonel bir embriyo ile birlikte maternal ve embriyonik dokular arasında eş zamanlı bir etkileşim olmalıdır.<sup>2</sup>

İmplantasyon, uterusun luminal epiteliyle serbest yüzen blastosist evresindeki embriyonun karşı karşıya gelmesiyle başlar (apozisyon), kısa zaman sonra blastosist endometriyuma nazıkçe yapışır (adezyon) ve sonra trofoblastlar luminal epitel boyunca göç edip endometriyumun altına gömülür (invazyon).<sup>3</sup> Blastosistin endometriyuma implantasyonu, sadece düzenli bir menstrual siklusun yirmi ile yirmi dördüncü günleri arasında, kendini sınırlayan bir zaman diliminde gerçekleşir ve bu dönem, implantasyon penceresi olarak adlandırılır.<sup>4,5</sup> İmplantasyon pencere dönemi plazma membran dönüşümü, bazı özel adezyon molekülleri, kemokinler, sitokinler, büyüme faktörleri, hormonlar, homeobox genleri, prostaglandinler, serbest radikaller ve hücre dışı matriksi yıkan enzimler gibi pek çok faktörün rol aldığı endometriyumdaki morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerle karakterizedir.<sup>6-9</sup>

İnsülin benzeri büyüme faktörleri (IGF)'ler, mitojenik etkilerini dokularda otokrin ve parakrin mekanizmalar üzerinden gerçekleştiren büyüme faktörleridir.<sup>10</sup> Hem IGF-I hem de IGF-II, implantasyon öncesi ve plasental gelişim için önemli, düzenleyici faktörlerdir. IGF-1, oosit olgunlaşması ve dölleme, erken embriyo gelişimi, implantasyon ve fetal-plasental büyümeyi de içeren gebelikte ilgili pek çok işlevde rol oynar.<sup>11-14</sup> Aynı zamanda, insan endometriyumunda hücre bölünmesi ve farklılaşması, endometriyum-trofoblast etkileşimi ve erken gebeliğin korunmasında da önemli rol onar.<sup>15</sup> Bir-

çok türün uterus ve plasentasında IGF sisteminin çeşitli üyelerinin yerel üretimi, birçok çalışmada rapor edilmiştir.<sup>16,17</sup> İmplantasyon öncesi evrenin, kültüre edilen blastosistlerde gelişimi uyarması ve fetal gelişim için önemli olduğu gösterilmiştir.<sup>18,19</sup> IGF-I ve IGF-II, pek çok hücre ve doku tipinin büyüme, çoğalma, farklılaşma ve metabolizması üzerinde oldukça etkili bir faktörlerdir. Fetal ve embriyonik büyümede IGF-I anahtar role sahiptir.<sup>20</sup>

Bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF), heparin-bağlayan büyüme faktörü ailesi üyelerinden biri olup yetişkin dönemde birçok dokuda ekspresyon olur.<sup>21</sup> bFGF'nin hücre çoğalması, farklılaşması ve embriyonik gelişimin kontrolünde önemli rolü olduğu saptanmıştır.<sup>22</sup> bFGF, bir mitojen olarak fibroblast, endotel hücreleri ve düz kas hücrelerinin çoğalmasını doğrudan etkiler.<sup>21</sup> Ovaryen seks hormonlarına bağlı olarak uterusun yeniden damarlanmasında, dolayısıyla anjiogeneziste sorumluluğu vardır ve kemiriciler, tavşanlar ve insan gibi pek çok türün endometriyumunda ekspresyonu (ifadesi) saptanmıştır.<sup>23</sup>

Sildenafil sitrat (Ss), bir tip 5- spesifik fosfodiesteraz inhibitörüdür ve cGMP'nin yıkılımını önleyerek nitrik oksidin (NO) etkisini artırır.<sup>24</sup> Sildenafil sitratın hayvanlarda düşük dozlarda kardiyovasküler parametreleri etkilemediği gösterilmiştir.<sup>25</sup> Yıllardan beri erkek erektil disfonksiyon tedavisinde kullanılmasına rağmen kadınlardaki etkileri henüz tam olarak belirlenmemiştir. Yapılan az sayıdaki çalışmada sildenafil sitratın uterus kan akımını artırarak endometriyal gelişimi uyardığı, vaginal yolla kullanımı sonrası gebelik oranları düşük kadınlarda yüksek implantasyon oranları elde edildiği ve son olarak endometriyal kalınlığı artırarak gebelik şansını yükselttiği gösterilmiştir.<sup>24,26,27</sup> Ancak, endometriyum reseptivitesindeki rolü bilinmemektedir.

Biz bu çalışmamızda, kontrollü ovaryen hiperstimülasyon (KOH) uygulanmış sıçanlarda sildenafil sitratın implantasyon pencere döneminde endometriyum reseptivitesinde (alırlık) rol oynayan faktörlerden IGF-1 ve bFGF ekspresyonlarına etkisini araştırdık.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

### DENEY HAYVANLARI VE GRUPLAR

Çalışmamızda, daha önce çiftleşmemiş ve hiç bir deneye alınmamış, üç aylık, 220-250 gr ağırlığında ve en az iki düzenli beş günlük östrus siklusu geçiren toplam altmış adet Wistar albino dişi sıçan kullanıldı. Hayvanların korunması ve kullanılması, NIH rehberleri ve Enstitü Hayvan Koruma ve Kullanma Komitesi kararları esasına göre yapıldı. Deneysel protokol için Kocaeli Üniversitesi Hayvan Araştırmaları Etik Kurulunun onayı alındı.

Sıçanlardan her gün aynı saatte vajinal smear alınarak östrus siklus takibi yapıldı. Araştırmada kullanılacak dişi sıçanlar dört gruba ayrıldı:

Kontrol (K) grubu (n= 15): Dişi sıçanlara deney gruplarında belirtilen gün ve saatlerde aynı miktarda subkutan (sk) serum fizyolojik verildi.

Sildenafil sitrat (Ss) grubu (n= 15): Dişi sıçanlara metöstrus (birinci gün) ve diöstrus evrelerinde (ikinci ve üçüncü gün) saat 10.00 ve saat 16.00 da günde iki kez 60 mg/kg/gün (oral gavaj) sildenafil sitrat (Viagra®) verildi.

Kontrollü ovaryen hiperstimülasyon (KOH) grubu (n= 15): Metöstrusdan itibaren üç gün boyunca saat 10.00 da: (GnRH antagonist (Cetrotide) 30 µg/100 gr ağırlık (sk) ve saat 10.00 ile 16.00'da rFSH (Puregon) 5Ü (sk) uygulandı. Dördüncü gün saat 16.00'da: hCG (Pregnyl) 5Ü (sk) uygulandı.

KOH + Ss grubu (n= 15): Metöstrusdan itibaren üç gün boyunca saat 10.00'da: (GnRH antagonist (Cetrotide) 30 µg/100 gr ağırlık (sk) ve sildenafil sitrat 60 mg/kg/gün (oral gavaj); saat 10.00 ile 16.00'da rFSH (Puregon) 5Ü (sk) ve sildenafil sitrat 60 mg/kg/gün (oral gavaj) uygulandı. Dördüncü gün saat 16.00'da: hCG (Pregnyl) 5Ü (sk) uygulandı.

Tüm gruplardaki sıçanlar dördüncü gün saat 16.00 da dişi/erkek oranı 2/1 olacak şekilde bir gece kafeste bırakıldılar. Ertesi sabah vajinal smearda spermium belirlenen dişi sıçanlar, gebeliğin sıfırncı gününde kabul edildiler.

Her gruptan gebeliğin üçüncü gününde (n= 5), dördüncü gününde (n= 5) ve beşinci gününde (n=

5) hayvanlar eter anestezisi altında uyutulup sakrifiye edilerek uterusları çıkartıldı ve %4 paraformaldehit içerisinde fikse edildi. Dokular, normal doku takibi protokolü uygulandıktan sonra parafinle bloklandı. Beş µm kalınlığında alınan kesitlere IGF-1 ve bFGF antikorlarının varlığı ve dağılımını göstermek için immünohistokimya tekniği uygulandı.

Kesitler fotoğraf ataçmanlı Olympus BX50F ışık mikroskopuyla incelendi ve gruplar arasındaki protein ekspresyonu farklılıkları belirlendi.

### İMMÜNOHİSTOKİMYASAL PROTOKOL

Lamlara alınan doku kesitleri, 55°C'de bir gece, 65°C'de bir saat bekletildi, deparafinizasyon ve dehidratasyon işlemlerinden sonra distile suda ve fosfat tuzu tamponunda (PBS, pH: 7.2-7.4) yıkandı. Antijenik maskelenmenin giderilmesi için kesitler 300 ml sodyum sitrat tamponu (0.01M, pH: 6.0, 978 ml dH<sub>2</sub>O içinde 2.94 gr tri-sodyum sitrat ve 22 ml HCl) içinde mikrodalga fırında iki kez üçer dakika 750W'da işlem gördü. Fırın dışına alınan kesitler, PBS'den geçirildi ve hidrojen peroksit (Biogenex HK 111-5K, %3) ile muamele edildi. PBS'de yıkanan kesitler IGF-1 (NHP) ve bFGF (F3393, Sigma) primer antikorlarıyla oda ısısında ve nemli ortamda bir gece inkübe edildi. PBS'den geçirilen kesitlere sırasıyla 30'ar dakika biyotinli sekonder antikor (Histostain-Plus Kit, 85-9943, Zymed) ve streptavidin-peroksidaz kompleksi (Histostain-Plus Kit, 85-9943, Zymed) uygulandı. PBS'den geçirilen kesitler, 3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB-Kit, 00-2020, Zymed) ile 2-5 dakika işlem gördü. Distile suyla yıkanan kesitlerin takipleri yapılarak kapatma solüsyonuyla kapatıldı. İmmünohistokimyasal kontrol kesitlerine primer antikor uygulanmayıp süre boyunca sadece PBS'de bekletildi.

### İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Kesitlerde immünoreaktivite (İR) gösteren bölgelerin değerlendirilmesi birbirinden bağımsız iki histolog tarafından körlemesine yapıldı. Olympus marka mikroskopta x 400 büyütmede her kesit için beş alanda immünoreaktivite yoğunluğu incelendi. Boyanmanın olmaması (-), zayıf boyanma (+), ılımlı

lı boyanma (++), yoğun boyanma (+++) olarak değerlendirildi.

İmmünoreaktivitenin istatistik değerlendirilmesi paket istatistik programında Wilcox Rank Sum testi uygulanarak yapıldı. İstatistiksel önemlilik  $P < 0.05$  olarak alındı.

## BULGULAR

### IGF-1 İMMÜNBOYAMA BULGULARI (TABLO 1)

Kontrol grubunda, üçüncü gün (Resim 1a) ve dördüncü günde luminal epitelde (LE) İR gözlenmezken stromal hücrelerde, endotelde ve miyometriyum uzunlamasına tabakasında zayıf İR gözlemlendi. Glandular epitelde (GE) üçüncü günde genelde İR saptanamadı, sadece çok az bezin bazal yüzeyinde çok zayıf İR gözlenirken dördüncü günde zayıf sitoplazmik İR saptandı. Beşinci günde LE'de apikal yüzeyde ve sitoplazmada ılımlı İR belirlenirken GE'de sitoplazmada ılımlı İR saptandı. Stromal hücrelerde ve miyometriyumun uzunlamasına tabakasında zayıf İR gözlenirken endoteldeki İR ılımlıydı (Resim 1b).

Sildenafil sitrat grubunda, üçüncü gün (Resim 1c) ve dördüncü günde LE'de apikal yüzeyde ılımlı, sitoplazmada zayıf İR saptandı. GE'de ve miyometriyumun uzunlamasına tabakasında üçüncü günde zayıf olan İR'nin dördüncü günde arttığı belirlendi. Stromada özellikle miyometriyuma yakın stromal hücrelerde ve endotelde üçüncü ve dör-

düncü günlerde ılımlı İR saptandı. Beşinci günde (Resim 1d) LE ve GE'de yoğun sitoplazmik İR belirlendi. Stromada bazaldan yüzeye kadar tüm stromal hücrelerde yoğun İR saptanırken, endotelde ve miyometriyumda uzunlamasına tabakada ılımlı İR saptandı.

KOH grubunda, üçüncü günde (Resim 1e) LE'de boyanma gözlenmezken, dördüncü ve beşinci günlerde (Resim 1f) apikal yüzeyde ve sitoplazmada zayıf İR gözlemlendi. GE'de sitoplazmada ve stromal hücrelerde üçüncü günde zayıf olan İR, dördüncü ve beşinci günlerde GE'de daha ılımlıyken stromal hücrelerde dördüncü günde ılımlı, beşinci günde zayıf olarak belirlendi. Endoteldeki İR, tüm günlerde zayıf olarak gözlemlendi. Miyometriyum uzunlamasına tabakasında üçüncü günde İR gözlenmezken dördüncü günde zayıf, beşinci günde ılımlı İR belirlendi.

KOH + Ss grubunda, LE'de üçüncü gün (Resim 1g) ve beşinci günde (Resim 1h) apikal yüzeyde ve sitoplazmada ılımlı İR gözlenirken dördüncü günde zayıf İR gözlemlendi. GE'de sitoplazmada tüm günlerde ılımlı, endotelde zayıf İR belirlendi. Stromal hücrelerde ve miyometriyumun uzunlamasına tabakasında üçüncü günde zayıf olarak saptanan İR, dördüncü ve beşinci günlerde ılımlı olarak saptandı.

IGF-1 için primer antikor uygulanmayan immünohistokimyasal kontrol kesitlerinde immünboyanma gözlenmedi (Resim 1j).

**TABLO 1:** IGF-1 ve bFGF için immün boyama yoğunluğu.

		3. gün					4. gün					5. gün				
		LE	GE	STR	END	MIYO	LE	GE	STR	END	MIYO	LE	GE	STR	END	MIYO
IGF	Kontrol	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	++	++	+	++	+
	Ss	++	+	++	+	+	++	++	++	+	++	+++	+++	+++	++	++
	KOH	-	+	+	+	-	+	++	++	+	+	+	++	+	+	++
	KOH + Ss	++	++	++	+	+	+	++	++	+	++	++	++	++	+	++
bFGF	Kontrol	++	+	+	+	-	++	+	+	+	-	++	++	++	++	++
	Ss	+++	++	++	+	+	+++	++	++	++	++	+++	++	++	++	++
	KOH	++	++	+	+	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+
	KOH + Ss	+	+	+	+	++	++	+	+	+	+	++	+	++	++	++

IGF: İnsülin benzeri büyüme faktörü; bFGF: Bazik fibroblast büyüme faktörü; LE: Luminal epitel; GE: Glandular epitel; STR: Stroma; END: Endotel; MYO: Miyometriyum; Ss: Sildenafil sitrat; KOH: Kontrollü ovaryen hiperstimulasyon.

## BFGF İMMÜNBOYAMA BULGULARI (TABLO 1)

Kontrol grubunda, üçüncü günde (Resim 2a) LE'de yer yer apikal yüzey ve bazal membranda ılımlı İR gözlenirken GE'de İR daha zayıftı. Stromada özellikle bazal bölgede fazla olmak üzere stromal hücrelerde zayıf İR saptandı. Damar endotelinde zayıf İR gözlenirken miyometriyumda İR gözlenmedi. Dördüncü ve beşinci günlerde (Resim 2b) LE membranında ılımlı İR devam ederken, GE'de dördüncü günde zayıf olarak saptanan İR, beşinci günde ılımlı olarak saptandı. Dördüncü günde stromal hücre ve endoteldeki zayıf İR benzerlik gösterirken beşinci günde stromal hücreler, endotel ve miyometriyumun uzunlamasına tabakasında ılımlı İR gözlemedi.

Sildenafil sitrat grubunda, üçüncü günde (Resim 2c) LE'de yaygın şekilde yoğun apikal yüzey ve bazal membran İR gözlemedi. GE'de ise, İR daha ılımlıydı. Stromada bazale yakın kısımda daha fazla olmak üzere, stromal hücrelerde ılımlı İR mevcuttu. Damar endotelinde ve miyometriyumun uzunlamasına tabakasında zayıf İR gözlemedi. Dördüncü ve beşinci günlerde (Resim 2d) LE'deki yaygın ve yoğun boyanma devam ederken GE'de ılımlı İR gözlemedi. Stromal hücrelerin yanı sıra damar endotel ve duvarıyla miyometriyumda immünboyanma ılımlı olarak izlendi.

KOH grubunda, üçüncü günde (Resim 2e) LE'de ılımlı apikal yüzey ve bazal membran boyanması belirlenirken GE'de sadece bazal membranda ılımlı İR gözlemedi. Stromada bazal bölgede az sayıda stromal hücrede ve damarların endotelinde zayıf İR gözlenirken, miyometriyumun uzunlamasına tabakasında ılımlı İR gözlemedi. Dördüncü günde LE ve GE'deki İR üçüncü gün ile benzerlik gösterirken, stromal hücrelerde, endotelde ve miyometriyumun uzunlamasına tabakasında İR, artmış olarak izlendi. Beşinci günde (Resim 2f) LE'deki İR'nin bazal membranda devam ederken apikal yüzeyde kaybolduğu, GE'de bazal membrandaki İR'nin azaldığı gözlemedi. Stromal hücrelerde, endotelde ve miyometriyumun uzunlamasına tabakasında yer yer zayıf İR belirlendi.

KOH + Ss grubunda, üçüncü günde (Resim 2g) LE ve GE'de zayıf İR izlendi. Dördüncü ve beşinci

günlerde (Resim 2h) LE'de ılımlı apikal yüzey boyanması gözlenirken; GE'de zayıf bazal membran boyanması gözlemedi. Üçüncü ve dördüncü günlerde stromal hücrelerde ve endotelde zayıf İR izlenirken, beşinci günde İR daha ılımlıydı. Miyometriyumun uzunlamasına tabakasında üçüncü ve beşinci günlerde ılımlı İR gözlenirken, dördüncü günde İR zayıftı.

bFGF için primer antikor uygulanmayan immünohistokimyasal kontrol kesitlerinde immünboyanma gözlenmedi (Resim 2j).

## İSTATİSTİK BULGULARI

### IGF-1

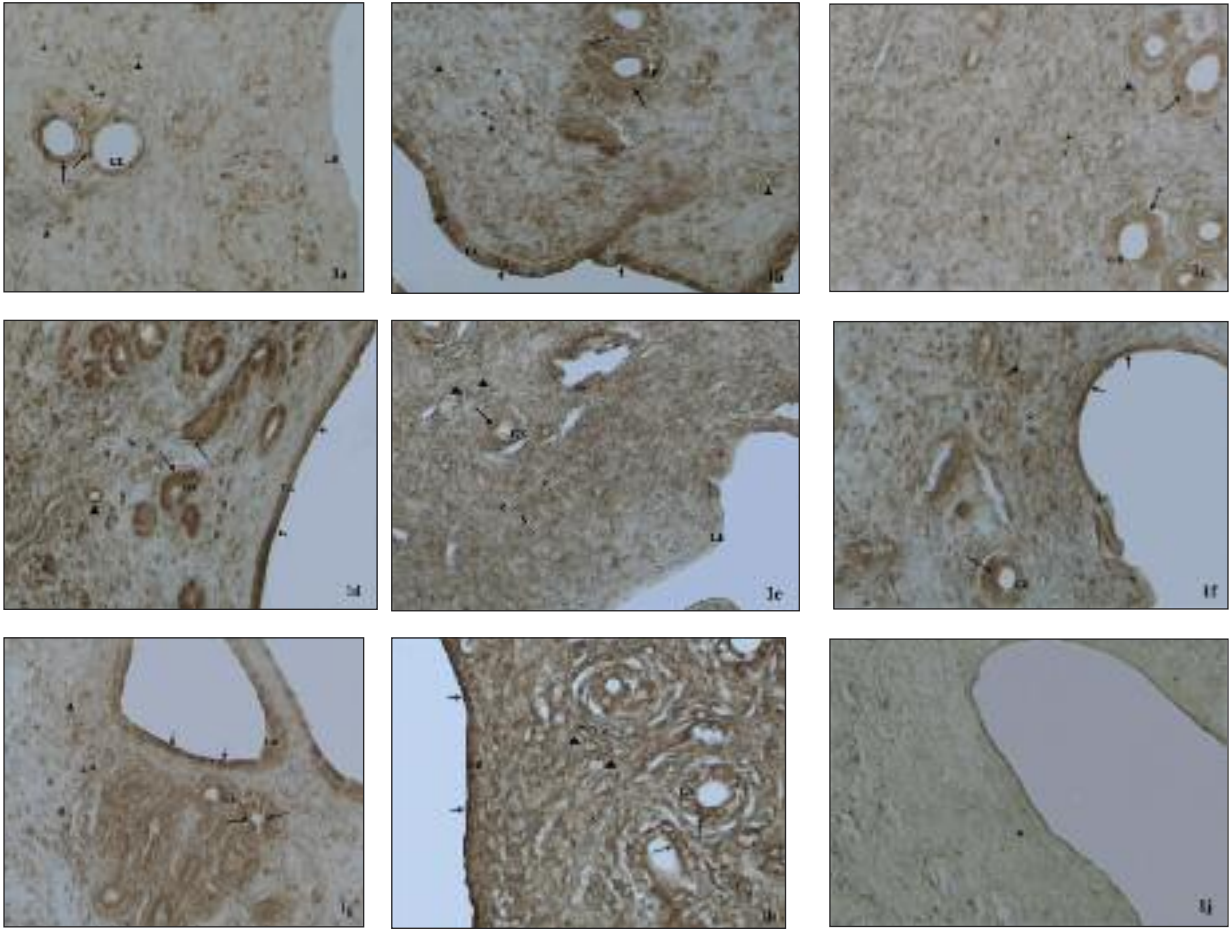
Üçüncü gün LE ile stromal hücrelerde en yoğun immünoreaktivite Ss ve KOH + Ss gruplarındayken ( $p < 0.001$ ), GE'de KOH + Ss grubunda görüldü ( $p < 0.001$ ). Endotelde IGF-1 İR, gruplar arasında farklılık göstermedi ( $p > 0.05$ ). Dördüncü gün LE'deki İR belirgin olarak Ss grubunda yoğunken, GE ve stromal hücrelerde en zayıf İR kontrol grubunda saptandı ( $p < 0.001$ ). Endotelde IGF-1 İR gruplar arasında farklılık göstermedi ( $p > 0.05$ ). Beşinci gün LE, GE ve stromal hücrelerde en yoğun immünoreaktivite Ss grubundayken, endotelde kontrol ve Ss grubundaydı ( $p < 0.001$ ). Miyometriyumdaki IGF-1 İR, en az kontrol grubundaydı ( $p < 0.001$ ).

### bFGF

Üçüncü gün LE ve stromal hücrelerde en yoğun İR Ss grubundaydı ( $p < 0.001$ ). GE'de Ss ve KOH gruplarında, miyometriyumda ise KOH ve KOH + Ss gruplarında en yoğun İR saptandı ( $p < 0.001$ ). Endotelde bFGF İR, gruplar arasında farklılık göstermemekteydi ( $p > 0.05$ ). Dördüncü gün LE'deki İR belirgin olarak Ss grubunda fazlayken ( $p < 0.001$ ), GE, stromal hücreler, endotel ve miyometriyumda Ss ve KOH gruplarında İR yoğundu. Beşinci gün LE'deki en yoğun İR Ss grubundayken, GE'de kontrol ve Ss gruplarındaydı ( $p < 0.001$ ). KOH grubunda stromal hücreler, endotel ve miyometriyumda anlamlı olarak zayıf ekspresyon saptandı ( $p < 0.001$ ).

## TARTIŞMA

Üreme tıbbında implantasyon başarısızlıkları hâlen çözülememiş en önemli problemlerden biridir.



**RESİM 1:** Uterusta implantasyon pencere döneminde IGF-1 immünboyanması. Kontrol grubu üçüncü günde LE'de İR gözlenmezken GE'nin bazal yüzeyinde İR görülmektedir. Stromal hücrelerde ve endotelde İR zayıf olarak izlenmektedir (1a). Beşinci günde LE ve GE'de ılımlı İR gözlenirken stromal hücrelerde zayıf, endotelde ılımlı İR gözlenmektedir (1b). Sildenafil sitrat grubunda üçüncü günde LE'de apikal yüzeyde ılımlı olarak saptanan İR, GE'de zayıfken stromal hücrelerde ve endotelde ılımlıydı (1c). Beşinci gündeysa LE ve GE'de yoğun sitoplazmik İR saptanırken stromal hücrelerde yoğun, endotelde ılımlı İR görülmektedir (1d). KOH grubunda üçüncü günde LE'de İR saptanamadı. GE'de, stromal hücrelerde ve endotelde zayıf İR izlenmektedir (1e). Beşinci günde LE'de ve endotelde zayıf olarak izlenen İR, GE ve stromal hücrelerde ılımlı olarak izlenmektedir (1f). KOH + Ss grubunda üçüncü günde (1g) ve beşinci günde (1h) LE ve GE'de ılımlı İR gözlenirken endotelde her iki günde de İR zayıftı. Stromal hücrelerde üçüncü günde zayıf olarak saptanan İR, beşinci günde ılımlı olarak saptanmıştır. Primer antikor uygulanmayan immünohistokimyasal kontrol kesitlerinde immünboyanma gözlenmemektedir (1i).

LE: luminal epitel; GE: glandular epitel; İR: immünoreaktivite; IGF: İnsülin benzeri büyüme faktörü; KOH: Kontrollü ovaryen hiperstimulasyon; Ss: Sildenafil sitrat.

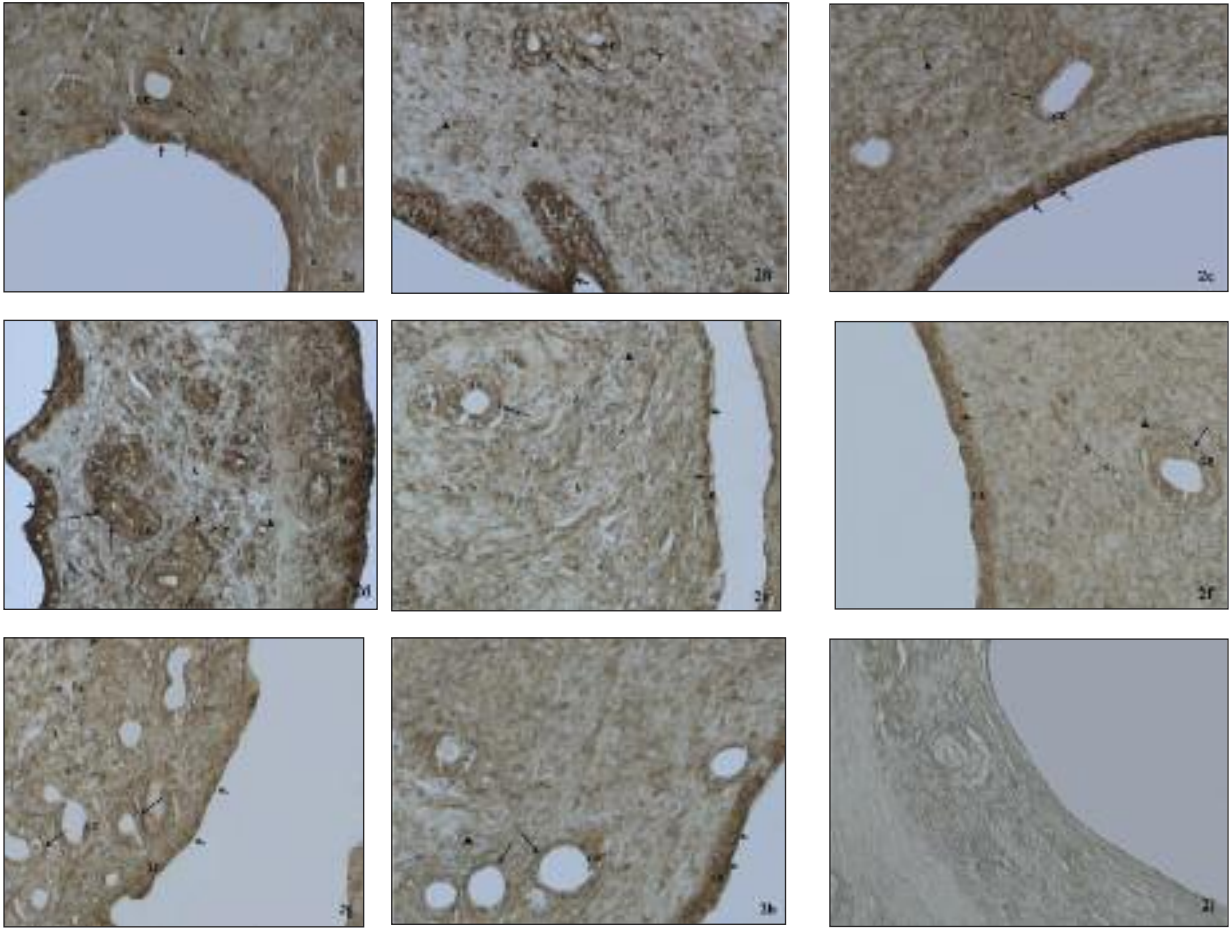
→ : LE boyanması; → : GE boyanması; ^ : Stromal hücre boyanması; ▲ : Endotel boyanması.

İmplantasyon başarısızlıklarının yaklaşık 2/3'ünden yetersiz uterin reseptivitinin, 1/3'ünden de embriyonun sorumlu olduğu düşünülmektedir.<sup>28,29</sup>

Fare ve sıçanlarda uterus hücrelerinin çoğalma ve farklılaşmasını düzenleyen progesteron ve östrojenin eşgüdümlü etkileri implantasyon pencesini oluşturur. Gebeliğin birinci gününde ovulasyon öncesi östrojen salgısı etkisiyle uterus epitel hücreleri çoğalmaya başlar. Yeni oluşmuş korpus luteumdan salgılanan progesteron düzeyinin yükselmesi, üçüncü günden itibaren stromal hücre ço-

ğalmasını başlatır. Stromal hücrelerin çoğalması dördüncü gebelik gününde ovaryumdan salgılanan az miktarda östrojenle daha da uyarılır. Progesteron ve östrojenin bu eşgüdümlü etkileri uterus epitel hücre çoğalmasının durmasına ve farklılaşmasının başlamasına yol açar.<sup>30</sup>

Normal gebelik sırasında fare uterusunda aktif blastosist varlığı, implantasyon için uyarıcıdır. Tutunma işlemi dördüncü günün sonunda başlar, ardından implantasyon aşamasındaki blastosisti çevreleyen stromal hücreler yaygın şekilde çoğalıp



**RESİM 2:** Uterusta implantasyon pencere döneminde bFGF immünboyanması. Kontrol grubunda üçüncü günde LE'de ılımlı İR gözlenirken GE'de stromal hücrelerde ve endotelde zayıf İR gözlenmektedir (2a). Beşinci günde LE, GE, stromal hücreler ve endotelde ılımlı İR saptanmıştır (2b). Sildenafil sitrat grubunda üçüncü günde LE'de yoğun İR görülürken GE'de ve stromal hücrelerde immünboyanma daha ılımlı, endoteldeyse zayıftır (2c). Beşinci günde LE'de yaygın ve yoğun İR gözlenirken GE, stromal hücreler ve endotel ile damar duvarında ılımlı İR gözlenmektedir (2d). KOH grubunda üçüncü günde LE ve GE'de ılımlı İR izlenirken stromal hücrelerde ve endoteldeki İR zayıftır (2e). Beşinci günde LE, GE, stromal hücreler ve endotelde zayıf İR görülmektedir (2f). KOH + Ss grubunda üçüncü günde LE, GE, stromal hücreler ve endotelde zayıf İR saptanmıştır (2g). Beşinci günde LE, stromal hücreler ve endotelde ılımlı İR, GE'de ise zayıf İR gözlenmektedir (2h). Primer antikor uygulanmayan immünohistokimyasal kontrol kesitlerinde immünboyanma gözlenmemektedir (2i).

LE: luminal epitel; GE: glandular epitel; İR: immünoreaktivite, bFGF: Basik fibroblast büyüme faktörü; KOH: Kontrollü ovaryen hiperstimulasyon; Ss: Sildenafil sitrat.

→ : LE boyanması; → : GE boyanması; ^ : Stromal hücre boyanması; ▲ : Endotel boyanması.

desidua hücrelerine dönüşürler.<sup>31,32</sup> Farelerde uterus gebeliğin dördüncü gününde tam olarak reseptifken, birinci ve üçüncü günler arasında preresptif olarak değerlendirilir. Kanıtlar, uterusun en fazla dördüncü günde reseptif olduğunu ve implantasyon etkinliğinin zamanla azaldığını göstermiştir. Gebeliğin altıncı gününde uterus, blastosist implantasyonuna tamamen duyarsızdır.<sup>33,34</sup> Ovaryen hormonlara cevaben memeli uterusunda luminal ve glandular epitel hücreleri çoğalırken stromal hücreler desiduayı oluşturacak şekilde çoğalıp farklılaşırlar. Kontrollü ovaryen hiperstimu-

lasyon yapılan endometriyumda progesteron uyarısının artmış olması, erken sekretuar değişimleri yol açmaktadır. Yüksek östrojen düzeyleri de daha çok artmış glandular uyumsuzluğa yol açmaktadır. Oosit eldesi için yapılan hCG ile endometriyal luteal faz morfolojisinde kesinti daha da uzatılmaktadır.<sup>35-37</sup>

Biz çalışmamızda, kontrol grubunda üçüncü günde luminal ve glandular epitelde, dördüncü gündeysede luminal epitelde IGF-1 ekspresyonu saptayamadık. Bununla birlikte, üçüncü günde epitelde en yoğun ekspresyonu Ss ve KOH + Ss

grubunda, dördüncü ve beşinci günlerde epitel ve stromada en yoğun IGF-1 ekspresyonunu yine Ss grubunda gözledik.

Sıçanlarla yapılan bir çalışmada, gebeliğin ilk üç gününde uterus luminal ve glandular epitelinde IGF-1 immünoaktivitesi yoğunken, miyometriyum ve kapiller endotelinde İR ılımlı bulunmuştur.<sup>38</sup> Ghahary ve ark., IGF-1 mRNA'nın endometriyal epitel ve stromal hücrelerde az miktarda saptanmakla birlikte, miyometriyumda ve stromanın miyometriyuma yakın dış kısmında yoğun olduğunu göstermiştir.<sup>39</sup> Kapur ve ark. CD-1 farelerde IGF-1 gen ekspresyonunun gebeliğin ilk iki gününde epitelyal yerleşimden gebeliğin üçüncü ve dördüncü günlerinde stromal yerleşime değiştiğini göstermiştir.<sup>40</sup> Bu çalışmada, östrojenin esas olarak epitel hücrelerinde progesteronun da stromada IGF-1 gen ekspresyonunu uyardığı belirlenmiştir. Henemyre ve Markoff, Balb/c farelerde gebeliğin ikinci gününde uterusda IGF-1 mRNA saptanmadığını belirtmişlerdir.<sup>14</sup> Aynı çalışmada, üçüncü günde stromal hücrelerde IGF-1 mRNA'nın çok düşük seviyede olduğu, dördüncü günde ise stromal hücreler ve miyometriyumda yoğun olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada, gebeliğin iki ile yedinci günler arasında luminal epitel hücrelerinde IGF-1 mRNA saptanamamıştır. Bizim bulgularımız, IGF-1'in ekspresyonu açısından bu çalışmayı destekler niteliktedir. Bir başka çalışmada, IGF-1'in embriyo implantasyonu sırasında desidualize olmamış stromada aktif olarak ekspresyonunun IGF-1'in parakrin fonksiyonunun olduğunu gösterdiği, ayrıca hem IGF-1 hem de IGF-1 reseptörü mRNA'sının östrojene bağlı olarak artmasının IGF-1'in östrojenin otokrin/parakrin aracısı olduğunu gösterdiği ifade edilmiştir.<sup>41</sup> Bununla birlikte, bir hücre kültürü çalışmasında kadınlardan alınan endometriyal stromal hücreler östradiol, progesteron ve hCG ile inkübe edildiğinde, desidualizasyon sırasında ilk üç günde IGF-1 seviyesinin önemli oranda artıp altı ile dokuzuncu günlerde azaldığı belirlenmiş ve hCG'nin doza bağımlı olarak IGF-1 ekspresyonunu belirgin şekilde azalttığı ifade edilmiştir.<sup>42</sup>

Bizim bulgularımız, sildenafil sitratın IGF-1 ekspresyonunu üçüncü günde gonadotropin uyar-

masıyla birlikte, sonraki dönemdeyse tek başına kuvvetli şekilde uyardığını göstermektedir. Bununla birlikte, epitel ve stromada IGF-1 ekspresyonunun özellikle sildenafil sitrat verilen gruplardaki sıçanlarda artması, sildenafil sitratın implantasyon ve desidualizasyonda rol oynayabileceğini göstermektedir. Ayrıca, günler ve gruplar arasında endoteldeki IGF-1 immünoaktivitesi açısından belirgin bir farklılık görülmemesi, endotel üzerinde başka faktörlerin de etkisi olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda bFGF ekspresyonunu, üçüncü günde LE ve stromal hücrelerde en fazla Ss grubunda, GE'de Ss ve KOH gruplarında, miyometriyumdaysa KOH ve KOH + Ss gruplarında gözledik. Dördüncü günde LE'deki ekspresyon belirgin olarak Ss grubunda fazlayken GE, stromal hücreler, endotel ve miyometriyumda Ss ve KOH gruplarında fazlaydı. Beşinci günde LE'deki en fazla bFGF ekspresyonu Ss grubundayken, GE'de Ss ve kontrol gruplarındaydı.

bFGF bir mitojen olarak fibroblastlar, düz kas hücreleri ve endotel hücrelerini de kapsayan birçok hücre tipinde çoğalmayı uyarmaktadır.<sup>21</sup> Ayrıca, bFGF'nin, embriyo implantasyonuna hazırlık amacıyla uterusun yeniden şekillenmesi için hücresel değişiklikleri kontrol ettiği düşünülmektedir.<sup>43</sup> İnsanlarda yapılan bir çalışmada, menstrual döngü sırasında bFGF ekspresyonu luminal epitel ve bazal membranında en yoğun olarak çoğalma evresinde, glandular epiteldeki ekspresyonsa en yoğun geç çoğalma evresi ve salgılama evresinde saptanmıştır.<sup>44</sup> Aynı çalışmada, menstrual ve çoğalma evresinde, endotel hücreleri ve stromada bFGF ekspresyonu zayıf olarak saptanmıştır. Farelere, ovaryum çıkarıldıktan sonra hormon tedavisi uygulanan bir çalışmada, luminal epitelle glandular epitelin bazal membranlarında, endotel hücrelerinin bazal laminalarında ve miyometriyumda bFGF ekspresyonu gözlenmiştir.<sup>45</sup> Bu ekspresyonun östrus döngüsüyle pek değişim göstermediği, dolayısıyla bFGF aktivitesinin normal fizyolojik koşullarla yüksek oranda düzenlendiği ileri sürülmüştür. Sıçanlarda yapılan ve vajinal sperm görülmesinin gebeliğin birinci günü kabul edildiği bir çalışmada, bFGF ekspresyonu ikinci ve üçüncü günlerde en-



dometriyal epitel, stroma ve miyometriyumda saptanmıştır.<sup>46</sup> Bu çalışmada, üçüncü günde bFGF'nin luminal ve glandular epitelin sitoplazmasında bulunduğu, dördüncü günde ise bFGF yerleşiminin her iki epitelin özellikle apikal yüzeyinde yoğunlaştığı gözlenmiştir. Aynı zamanda, embriyo varlığında bFGF tüm endometriyum boyunca eksprese olurken, embriyo yokluğunda luminal epitelde saptanamamış ve stromal hücrelerde çok azaldığı belirlenmiştir.

bFGF'nin angiogeneze de etkili olduğu ve bFGF immnoreaktivitesinin en yoğun olduğu yerin dallanan kapillerler olduğu belirlenmiştir.<sup>47</sup> Ayrıca, menstrual döngü evreleriyle endotel hücre çoğalma dizini arasında bir ilişkinin olmaması, angiogenezin sadece ovaryen steroidlerle değil aynı zamanda anjiogenik büyüme faktörleri tarafından da düzenlendiğini göstermektedir.<sup>48</sup> Primatlarda yapılan bir çalışmada, bFGF mRNA'nın varlığının uterin epitel hücreleriyle sınırlıyken immünoreaktivitenin epitel bazal laminasında gözlenmesinin, peptidin epitel hücrelerinde üretilip bazal lamina da depolandığı, miyometriyumda hem immünoreaktivite hem de mRNA'nın miyofibrillerde bol miktarda gözlenmesiye bFGF'nin miyometriyumda otokrin ya da parakrin yolla düzenlendiği şeklinde yorumlanmıştır.<sup>49</sup> Ayrıca, stromal hücrelerin kollajeni indirgeyip fagosite ettiği ve kendi bazal membranını oluşturduğu belirlenmiş; bFGF'nin matriks metalloproteinaz (MMP) üretimini artırarak desidualizasyon yanı sıra angiogenezi de düzenlediği ifade edilmiştir.<sup>50</sup>

Biz, literatürle uyumlu olarak, bFGF'nin endometriyumun luminal ve glandular epiteli, stromal hücreler, damar endoteli ve miyometriyumda eksprese olduğunu belirledik. bFGF ekspresyonu genel olarak dördüncü günden itibaren artmakla birlikte en fazla artışı Ss grubunda luminal epitelde saptadık. Embriyoyla karşılaşan endometriyal epitel hücreleri, apoptoza girmekte ve embriyonun invazyonunu kolaylaştırmaktadır.<sup>46</sup> Sildenafil sitratın özellikle luminal epitelde bFGF ekspresyonunu artırması, LE hücrelerinin embriyoya tutunmasını kolaylaştırması ya da apoptoza girmesini sağlayarak embriyo invazyonunu kolaylaştırması açısından önemli olabilir. Ayrıca, stromal hücre-

lerde ekspresyonu artırması da desidualizasyondaki önemini göstermektedir.

Sildenafil, siklik guanozin monofosfat (cGMP)-spesifik fosfodiesteraz tip 5'in (PDE5) oral etkili, güçlü ve selektif bir inhibitördür ve erkekte erektil fonksiyon yetersizliği tedavisinde kullanılmaktadır. Sildenafil, korporal düz kaslarda cGMP konsantrasyonunu artırarak, nitrik oksidin gevşetici etkisini güçlendirir. Sildenafilin kan akımındaki kontrolü, süngersi dokudaki endotel ve sinir hücrelerinden salgılanan NO, tarafından sağlanır. NO, damarların genişlemesini sağlayan cGMP yapımını uyarır.<sup>51</sup> Postganglionik sinir uçları ve damar endotelinde L-arjininden nitrik oksid sentetaz (NOS) enzimi yardımıyla sentezlenen NO guanilat siklazı aktive ederek guanozin trifosfattan cGMP yapımını sağlar.<sup>52</sup> cGMP ereksiyon için mutlak gerekli olan kavernoza düz kas gevşemesinin temel molekülüdür. cGMP'nin korpus kavernoza düz kasında inaktif hale geçmesi için gerekli enzim fosfodiesterazdır.<sup>53</sup> Sildenafil sitrat, cinsel uyarı ile cGMP yapımı arttığında devreye girer ve ortamdaki cGMP'yi parçalayan fosfodiesterazı baskılayarak cGMP'nin etkinliğini artırır, sertleşmeyi ve sertleşmenin uzun sürmesini sağlar.<sup>52</sup>

Üreme sistemiyle ilgili olarak ovaryen follikulogenez, ovulasyon, GnRH salgılanması, sperm hareketliliği, döllenme ve embriyo gelişiminde nitrik oksidin rol oynadığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir.<sup>54,55</sup> Bundan başka, iNOS ya da endojen NO'nun uterin duyarlılığı artırıp doğrudan ya da endometriyal damarlanmayı değiştirerek dolaylı yoldan desidual büyümeyi etkilediği öne sürülmektedir.<sup>56</sup> Sildenafil sitrat implantasyon pencere döneminde endometriyum reseptivite belirteçlerine olan etkilerini NO ya da NOS üzerinden gerçekleştiriyor olabilir.

Sonuç olarak araştırmamızda sildenafil sitrat uyguladığımız sıçan gruplarında, literatürde ilk kez endometriyum reseptivite belirteçlerinden IGF-1 ve bFGF'in diğer gruplara göre daha yoğun immünoreaktivite gösterdiğini saptadık. Bu bulgular, sildenafil sitratın implantasyon pencere döneminde etkili olabileceğini ilk kez göstermektedir. Sildenafil sitratla ilgili ulaştığımız immünohistokimyasal

bulguların, gelecekte tekrarlayan implantasyon başarısızlıkları ve endometriyal reseptivite bozuklukları yaşayan kadınlarda yeni tedavi protokollerinin oluşturulmasında ön veriler olarak umut verici olduğunu düşünüyoruz.

## Teşekkür

*Bu çalışma Kocaeli Üniversitesi (Proje No: 2007/078) ve TÜBİTAK (107S444) tarafından desteklenmiştir. Çalışmanın istatistiksel değerlendirmesini yapan Doç. Dr. Müge Filiz'e teşekkür ederiz.*

## KAYNAKLAR

- Jabbour HN, Kelly RW, Fraser HM, Critchley HO. Endocrine regulation of menstruation. *Endocr Rev* 2006;27(1):17-46.
- Simón C, Martín JC, Pellicer A. Paracrine regulators of implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2000;14(5):815-26.
- Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ. Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med* 2001;345(19):1400-8.
- Wilcox AJ, Baird DD, Weinberg CR. Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy. *N Engl J Med* 1999;340(23):1796-9.
- Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers: the journey to successful embryo implantation. *Hum Reprod Update* 2006;12(6):731-46.
- Lessey BA, Damjanovich L, Coutifaris C, Castelbaum A, Albelda SM, Buck CA. Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle. *J Clin Invest* 1992;90(1):188-95.
- Tabibzadeh S, Babaknia A. The signals and molecular pathways involved in implantation, a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue invasion. *Hum Reprod* 1995;10(6):1579-602.
- Paria BC, Reese J, Das SK, Dey SK. Deciphering the cross-talk of implantation: advances and challenges. *Science* 2002;296(5576):2185-8.
- Kodaman PH, Taylor HS. Hormonal regulation of implantation. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2004;31(4):745-66, ix.
- Wang HS, Chard T. IGFs and IGF-binding proteins in the regulation of human ovarian and endometrial function. *J Endocrinol* 1999;161(1):1-13.
- Yoshimura Y, Ando M, Nagamatsu S, Iwashita M, Adachi T, Sueoka K, et al. Effects of insulin-like growth factor-I on follicle growth, oocyte maturation, and ovarian steroidogenesis and plasminogen activator activity in the rabbit. *Biol Reprod* 1996;55(1):152-60.
- Gluckman PD, Harding JE. The physiology and pathophysiology of intrauterine growth retardation. *Horm Res* 1997;48(Suppl 1):11-6.
- Lighten AD, Moore GE, Winston RM, Hardy K. Routine addition of human insulin-like growth factor-I ligand could benefit clinical in-vitro fertilization culture. *Hum Reprod* 1998;13(11):3144-50.
- Henemyre C, Markoff E. Decidualization and expression of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-4 in the periimplantation mouse uterus. *Biol Reprod* 1998;58(3):801-6.
- Giudice LC. Growth factors and growth modulators in human uterine endometrium: their potential relevance to reproductive medicine. *Fertil Steril* 1994;61(1):1-17.
- Reynolds TS, Stevenson KR, Wathes DC. Pregnancy-specific alterations in the expression of the insulin-like growth factor system during early placental development in the ewe. *Endocrinology* 1997;138(3):886-97.
- Zhou J, Bondy C. Insulin-like growth factor-II and its binding proteins in placental development. *Endocrinology* 1992;131(3):1230-40.
- Kaye PL, Bell KL, Beebe LF, Dungleon GF, Gardner HG, Harvey MB. Insulin and the insulin-like growth factors (IGFs) in preimplantation development. *Reprod Fertil Dev* 1992;4(4):373-86.
- Gluckman PD. Clinical review 68: The endocrine regulation of fetal growth in late gestation: the role of insulin-like growth factors. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80(4):1047-50.
- Westwood M. Role of insulin-like growth factor binding protein 1 in human pregnancy. *Rev Reprod* 1999;4(3):160-7.
- Baird A, Walicke PA. Fibroblast growth factors. *Br Med Bull* 1989;45(2):438-52.
- Rifkin DB, Moscatelli D. Recent developments in the cell biology of basic fibroblast growth factor. *J Cell Biol* 1989;109(1):1-6.
- Fujimoto J, Hori M, Ichigo S, Tamaya T. Expression of basic fibroblast growth factor and its mRNA in uterine endometrium during the menstrual cycle. *Gynecol Endocrinol* 1996;10(3):193-7.
- Sher G, Fisch JD. Vaginal sildenafil (Viagra): a preliminary report of a novel method to improve uterine artery blood flow and endometrial development in patients undergoing IVF. *Hum Reprod* 2000;15(4):806-9.
- Saraçoğlu A, Ergun B, Uzuner K, Aydın Y. [Effects of sildenafil citrate administration on cardiovascular system of subchronic fluoxetine HCl treated male rats]. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2005;25(4):483-8.
- Sher G, Fisch JD. Effect of vaginal sildenafil on the outcome of in vitro fertilization (IVF) after multiple IVF failures attributed to poor endometrial development. *Fertil Steril* 2002;78(5):1073-6.
- Zinger M, Liu JH, Thomas MA. Zinger M, Liu JH, Thomas MA. Successful use of vaginal sildenafil citrate in two infertility patients with Asherman's syndrome. *J Womens Health (Larchmt)* 2006;15(4):442-4.
- Simón C, Moreno C, Remohí J, Pellicer A. Molecular interactions between embryo and uterus in the adhesion phase of human implantation. *Hum Reprod* 1998;13 (Suppl 3):219-32.
- Lédée-Bataille N, Laprée-Delage G, Taupin JL, Dubanchet S, Frydman R, Chaouat G. Concentration of leukaemia inhibitory factor (LIF) in uterine flushing fluid is highly predictive of embryo implantation. *Hum Reprod* 2002;17(1):213-8.
- Huet-Hudson YM, Andrews GK, Dey SK. Cell type-specific localization of c-myc protein in the mouse uterus: modulation by steroid hormones and analysis of the periimplantation period. *Endocrinology* 1989;125(3):1683-90.
- Lundkvist O, Nilsson BO. Endometrial ultrastructure in the early uterine response to blastocysts and artificial decidualogenic stimuli in rats. *Cell Tissue Res* 1982;225(2):355-64.
- Paria BC, Ma W, Tan J, Raja S, Das SK, Dey SK, et al. Cellular and molecular responses of the uterus to embryo implantation can be elicited by locally applied growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(3):1047-52.
- Huet-Hudson YM, Dey SK. Requirement for progesterone priming and its long-term effects on implantation in the mouse. *Proc Soc Exp Biol Med* 1990;193(4):259-63.
- Paria BC, Huet-Hudson YM, Dey SK. Blastocyst's state of activity determines the "window" of implantation in the receptive mouse uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(21):10159-62.

35. Seppälä M, Tiitinen A. Endometrial responses to corpus luteum products in cycles with induced ovulation: theoretical and practical considerations. *Hum Reprod* 1995;10(Suppl 2):67-76.
36. Ubaldi F, Bourgain C, Tournaye H, Smitz J, Van Steirteghem A, Devroey P. Endometrial evaluation by aspiration biopsy on the day of oocyte retrieval in the embryo transfer cycles in patients with serum progesterone rise during the follicular phase. *Fertil Steril* 1997;67(3):521-6.
37. Bourgain C, Ubaldi F, Tavaniotou A, Smitz J, Van Steirteghem AC, Devroey P. Endometrial hormone receptors and proliferation index in the periovulatory phase of stimulated embryo transfer cycles in comparison with natural cycles and relation to clinical pregnancy outcome. *Fertil Steril* 2002;78(2):237-44.
38. Oner J, Oner H. Immunolocalization of insulin-like growth factor I (IGF-I) during preimplantation in rat uterus. *Growth Horm IGF Res* 2007;17(4):271-8.
39. Ghahary A, Chakrabarti S, Murphy LJ. Localization of the sites of synthesis and action of insulin-like growth factor-I in the rat uterus. *Mol Endocrinol* 1990;4(2):191-5.
40. Kapur S, Tamada H, Dey SK, Andrews GK. Expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and its receptor in the peri-implantation mouse uterus, and cell-specific regulation of IGF-I gene expression by estradiol and progesterone. *Biol Reprod* 1992;46(2):208-19.
41. Murphy LJ, Ghahary A. Uterine insulin-like growth factor-1: regulation of expression and its role in estrogen-induced uterine proliferation. *Endocr Rev* 1990;11(3):443-53.
42. Fluhr H, Carli S, Deperschmidt M, Wallwiener D, Zygmunt M, Licht P. Differential effects of human chorionic gonadotropin and decidualization on insulin-like growth factors-I and -II in human endometrial stromal cells. *Fertil Steril* 2008;90(4 Suppl):1384-9.
43. Finn CA. Cellular changes in the uterus during the establishment of pregnancy in rodents. *J Reprod Fertil Suppl* 1982;31:105-11.
44. Möller B, Rasmussen C, Lindblom B, Olovsson M. Expression of the angiogenic growth factors VEGF, FGF-2, EGF and their receptors in normal human endometrium during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 2001;7(1):65-72.
45. Wordinger RJ, Moss AE, Lockard T, Gray D, Chang IF, Jackson TL. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor within the mouse uterus. *J Reprod Fertil* 1992;96(1):141-52.
46. Carlone DL, Rider V. Embryonic modulation of basic fibroblast growth factor in the rat uterus. *Biol Reprod* 1993;49(4):653-65.
47. Cordon-Cardo C, Vlodavsky I, Haimovitz-Friedman A, Hicklin D, Fuks Z. Expression of basic fibroblast growth factor in normal human tissues. *Lab Invest* 1990;63(6):832-40.
48. Rogers PA. The endometrial vascular bed. In: Cameron IT, Fraser IS, Smith SK, eds. *Clinical Disorders of the Endometrium and Menstrual Cycle*. 1st ed. Oxford: Oxford University Press; 1986. p.31-45.
49. Samathanam CA, Adesanya OO, Zhou J, Wang J, Bondy CA. Fibroblast growth factors 1 and 2 in the primate uterus. *Biol Reprod* 1998;59(3):491-6.
50. Nuttall RK, Kennedy TG. Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor increase the production of matrix metalloproteinases during in vitro decidualization of rat endometrial stromal cells. *Endocrinology* 2000;141(2):629-36.
51. McCann SM, Haens G, Mastronardi C, Walczewska A, Karanth S, Rettori V, et al. The role of nitric oxide (NO) in control of LHRH release that mediates gonadotropin release and sexual behavior. *Curr Pharm Des* 2003;9(5):381-90.
52. Refuerzo JS, Sokol RJ, Aranda JV, Hallak M, Hotra JW, Kruger M, et al. Sildenafil citrate and fetal outcome in pregnant rats. *Fetal Diagn Ther* 2006;21(3):259-63.
53. Ergen A, Tekin A. [A new oral agent for erectile dysfunction: sildenafil citrate]. *Turkish Journal of Geriatrics* 1999;2(1):26-8.
54. Rosselli M, Keller PJ, Dubey RK. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Hum Reprod Update* 1998;4(1):3-24.
55. McCann SM, Haens G, Mastronardi C, Walczewska A, Karanth S, Rettori V, et al. The role of nitric oxide (NO) in control of LHRH release that mediates gonadotropin release and sexual behavior. *Curr Pharm Des* 2003;9(5):381-90.
56. Spencer F, Chi L, Zhu MX. Antiproliferative effects of inducible nitric oxide synthase inhibition on decidualization in pseudopregnant rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998;218(1):45-50.