

ارزیابی آنژیوژنز و ضخامت میومترיום رحم موش، بلافاصله قبل از لانه‌گزینی در چرخه طبیعی، همراه با تحریک تخمک‌گذاری و مصرف سیلدنافیل سیترات

غلامرضا دشتی^۱، آریوبرزن فرهادی^۲، محمد جواد سعیدی بروجنی^۳، بهمن رشیدی^۱

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: انقباضات میومتر رحمی، نقش کلیدی در شکست یا موفقیت لانه‌گزینی رویان بازی می‌کند. افزون بر آن، آنژیوژنز کافی در میومترיום، یک رویداد مهم برای تأمین خون اندومترיום می‌باشد. به تازگی، مطالعات زیادی به منظور بررسی اثرات سیلدنافیل سیترات بر روی باروری زنان انجام شده است. این مطالعه، با هدف بررسی تغییرات ضخامت میومترיום و آنژیوژنز وابسته به آن به دنبال تجویز سیلدنافیل سیترات در موش‌هایی که تحریک تخمدانی شده‌اند انجام شد.

روش‌ها: ۳۰ سر موش بالغ ماده و ۱۰ موش بالغ نر خریداری شدند. موش‌های ماده به سه گروه ۱۰ تاپی شاهد (بدون هیچ گونه مداخله)، گونادوتروپین (دریافت کننده‌ی Human menopausal gonadotropin یا HMG و Human chorionic gonadotropin یا HCG) و گونادوتروپین + سیلدنافیل سیترات (دریافت کننده‌ی HMG، HCG و سیلدنافیل سیترات) تقسیم شدند. بعد از جفت‌گیری، حیوانات بیهوش و رحم آن‌ها به طور سریع برای اهداف بافت‌شناسی و ایمونوهیستوشیمی برای سلول‌های Cluster of differentiation 31 (CD31) خارج شد.

یافته‌ها: در گروه سیلدنافیل سیترات + گونادوتروپین، ضخامت میومترיום به طور معنی‌داری بیشتر از گروه‌های گونادوتروپین و شاهد بود ($P < 0.05$). نتایج ایمونوهیستوشیمی برای سلول‌های CD31 در میوترיום نشان داد که تجویز سیلدنافیل سیترات هیچ تغییر معنی‌دار مرتبط با آنژیوژنز را در میوترיום القا نمی‌کند ($P > 0.05$).

نتیجه‌گیری: تجویز سیلدنافیل سیترات، هیچ تغییر مشهودی را در آنژیوژنز میومترיום ایجاد نمی‌کند، اما سبب افزایش ضخامت آن می‌شود. با این وجود، برای ابراز تصمیم دقیق در مورد نقش سیلدنافیل سیترات بر روی پارامترهای اشاره شده، بررسی‌های دقیق مولکولی و افزایش مدت زمان مصرف دارو ضروری می‌باشد.

واژگان کلیدی: سیلدنافیل سیترات، میومترיום، آنژیوژنز

ارجاع: دشتی غلامرضا، فرهادی آریوبرزن، سعیدی بروجنی محمد جواد، رشیدی بهمن. ارزیابی آنژیوژنز و ضخامت میومترיום رحم موش، بلافاصله قبل از لانه‌گزینی در چرخه طبیعی، همراه با تحریک تخمک‌گذاری و مصرف سیلدنافیل سیترات. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۶؛ ۳۵ (۴۴۷): ۱۲۲۴-۱۲۱۷

مقدمه

میوتریوم، ضخیم‌ترین لایه‌ی رحم است که از سه (یا چهار) لایه‌ی عضلانی صاف غیر قابل تفکیک تشکیل شده است. لایه‌ی میانی میوتریوم، طبقه‌ی عروقی نام دارد و حاوی شبکه‌ی عروقی و لنفاوی گسترده‌ای است. از شبکه‌ی شریانی موجود در طبقه‌ی عروقی، چندین شاخه جدا می‌شود که پس از ورود به اندومتریوم، تغذیه‌ی عروقی این لایه را عهده‌دار می‌باشد (۱).

یکی از رویدادهای فیزیولوژیکی بسیار مهم و دخیل در یک حاملگی موفق، تطابق عروقی در رحم مادر است. کاهش تون عروقی

رحم و افزایش میزان جریان خون، دو رویداد مهم در جریان حاملگی هستند که هر دو رویداد، با افزایش مبادلات بین مادر و جنین در حال رشد مرتبط می‌باشند. به نظر می‌رسد، انقباض میوزنیک وابسته به فشار، یک گام اساسی در تنظیم تون پایه‌ی عروق رحم و افزایش میزان جریان خون در آن‌ها باشد (۴-۲).

سیلدنافیل سیترات یا وایاگرا در ابتدا به عنوان یک کاهنده‌ی فشار خون برای درمان فشار خون بالای ریوی مورد استفاده قرار گرفت. سپس، با توجه به تحقیقات صورت گرفته، برای درمان ناتوانی جنسی مردانه و به خصوص اختلال در نعوظ استفاده شد (۵). این دارو، جزء

۱- دانشیار، گروه علوم تشریحی و زیست‌شناسی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشجوی پزشکی، کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه علوم تشریحی و زیست‌شناسی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: b_rashidi@med.mui.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤول: بهمن رشیدی

ادامه و اتمام بارداری نمی‌باشند نیز نابارور محسوب می‌شوند. بارداری، فرایندی است که مراحل فراوانی را شامل می‌شود. در هر دوره‌ی ماهیانه، یک تخمک از یکی از تخمدان‌ها آزاد می‌شود و از طریق لوله‌ی فالوپ به سمت رحم می‌رود و چنانچه اسپرم به آن پیوسته و لقاح اتفاق بیفتد، در صورت لانه‌گزینی در رحم، بارداری رخ می‌دهد و در صورت عدم لانه‌گزینی، ناباروری ایجاد می‌شود.

در مطالعات انجام شده، شیوع ناباروری در چین حدود ۹ درصد، در آمریکا ۱۵-۱۰ درصد و در سبیری حدود ۱۶ درصد برآورد شده است. این میزان در ایران حدود ۲۵-۲۳ درصد گزارش شده است (۲۴-۲۱). تاکنون مطالعات زیادی برای یافتن علل مختلف نازایی صورت گرفته است. یکی از علل شناخته شده‌ی نازایی که به آن کمتر پرداخته شده است، لانه‌گزینی ناموفق زیگوت به دلیل ضخامت ناکافی آندومتر رحم ناشی از خون‌رسانی ناکافی از میومتر به آندومتر می‌باشد (۲۵). از طرف دیگر، انقباضات رحمی ناشی از میومتریم نیز می‌تواند بلافاصله قبل از لانه‌گزینی، مانع از لانه‌گزینی موفق گردد (۲۷-۲۶).

به نظر می‌رسد سیلدنافیل سیترات، می‌تواند از طریق افزایش ماندگاری نیتریک اکساید در عضلات صاف و همچنین، استراحت میومتر و از طرف دیگر، از طریق انبساط عروقی، خون‌رسانی به آندومتریم را افزایش دهد و نقش مهمی را در موفقیت بارداری بازی کند. از این رو، در مطالعه‌ی حاضر، به بررسی اثرات احتمالی سیلدنافیل سیترات بر ضخامت میومتریم و همچنین، آنژیوتنز آن پرداخته شد.

روش‌ها

حیوانات آزمایشگاهی و طراحی مطالعه: این مطالعه بر روی تعداد ۳۰ سر موش سوری ماده‌ی بالغ با وزن تقریبی بین ۳۰-۲۵ گرم و تعداد ۱۰ سر موش نر بالغ از همان نژاد انجام شد. حیوانات از انستیتو پاستور خریداری و به خانه‌ی حیوانات گروه فیزیولوژی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان منتقل گردیدند. در طول مدت مطالعه، تمام موش‌ها با شرایط استاندارد، در چرخه‌ی نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. در طول مدت انجام مطالعه، حیوانات به آب و غذای کافی دسترسی داشتند.

موش‌های ماده با استفاده از روش نمونه‌گیری تصادفی ساده، به ۳ گروه ۱۰ تایی تحت عنوان‌های گروه شاهد، گروه گنادوتروپین و گروه گنادوتروپین + سیلدنافیل سیترات تقسیم شدند. جهت تحریک تخمک‌گذاری، از داروهای Human monopsal gonathotropine (HMG) و Human chorionic gonathotropine (HCG) که باعث ایجاد فرایند تخمک‌گذاری و ایجاد شرایط مناسب برای فرایند

خانواده‌ی فسفودی استراز ۵ (phosphodiesterase-5 یا PDE-5) می‌باشد و از طریق هیدرولیز آنزیم‌های تخریب‌کننده‌ی گوانوزین مونوفسفات حلقوی (Cyclic guanosine monophosphate یا cGMP) باعث افزایش میزان داخل سلولی آن و در نهایت، افزایش نیتریک اکساید (Nitric oxide یا NO) در داخل سلول عضله‌ی صاف و در نتیجه شل شدن عضلات می‌گردد (۶).

در سال‌های اخیر، مطالعات زیادی به بررسی اثرات سیلدنافیل سیترات بر سیستم تولید مثل زنانه پرداخته‌اند. افزایش ضخامت آندومتریم، افزایش جریان خون رحمی و افزایش شانس بقای تخمک، پاره‌ای از اثرات اثبات شده‌ی سیلدنافیل سیترات می‌باشد (۱۱-۷).

آنژیوتنز، فرایندی کنترل شده است و در افراد بالغ به غیر از مواردی مثل ترمیم زخم و دوره‌ی ماهانه در خانم‌ها، به ندرت رخ می‌دهد. محققان بر این عقیده‌اند که برای القای آنژیوتنز، کاهش اکسیژن خون (هیپوکسی) در بافت از اهمیت زیادی برخوردار است. در چنین شرایطی، بافت دچار هیپوکسی، اقدام به سنتز و رهاسازی عواملی نظیر عامل رشد اندوتلیال عروقی می‌کند (۱۲). این عوامل پس از اتصال به گیرنده‌های خود بر روی سلول‌های اندوتلیال، منجر به فعال شدن آن‌ها می‌شوند. با شروع فعالیت سلول‌های اندوتلیال، انواع خاصی از متالوپروتئینازها از سلول‌های پیش‌گفته ترشح می‌شود و غشای پایه را در این منطقه تجزیه می‌کند. با هضم غشای پایه، سلول‌های اندوتلیال اقدام به مهاجرت و تکثیر می‌نمایند. علاوه بر این، مولکول‌های اتصالاتی نظیر اینتگرین‌ها نیز به فرایند کشیدن و جلو رفتن جوانه‌های رگ‌های خونی در حال رشد کمک می‌نمایند (۱۵-۱۳).

در مطالعات اخیر، به نقش سیلدنافیل در پیشبرد فرایند آنژیوتنز اشاره شده است و آن را به عنوان یکی از پتانسیل‌های درمانی در شرایطی که نیاز به تشکیل عروق جدید است، معرفی کرده‌اند (۱۸-۱۶). این گونه بیان شده است که افزایش داخل سلولی NO، سبب تحریک تشکیل عروق خونی جدید می‌شود و مهار کننده‌های سنتز NO سبب کاهش نئوواسکولاریزاسیون در پاسخ به ایسکمی بافتی می‌گردد. افزون بر آن، مهار فارماکولوژیک تولید NO، سبب کاهش خصوصیت آنژیوتنزی سلول‌های اندوتلیال کشت داده شده گردید.

چنین پیشنهاد شده است که cGMP یک واسطه‌ی مهم در القای اثرات آنژیوتنیک NO می‌باشد. با علم به این موضوع که سیلدنافیل سیترات سبب افزایش غلظت درون سلولی cGMP و NO می‌شود، در سال‌های اخیر مطالعات زیادی به بررسی و اثبات اثرات این دارو در پیشبرد فرایند آنژیوتنز پرداخته‌اند (۱۹، ۱۷).

ناباروری به معنای عدم توانایی در باردار شدن پس از یک سال تلاش می‌باشد (۲۰). همچنین، زنانی که باردار شده‌اند، اما قادر به

لقاح در آندومتر می‌شوند، استفاده گردید.

در گروه شاهد، هیچ گونه مداخله‌ای انجام نشد. ابتدا، برای تحریک تخمک‌گذاری، به موش‌ها در همه‌ی گروه‌های مورد، HMG به میزان ۷/۵ واحد بین‌المللی به صورت داخل صفاقی (Intraperitoneal یا IP) تزریق شد و ۴۸ ساعت پس از آن، HCG به مقدار ۷/۵ واحد بین‌المللی به همان روش تزریق گردید. سپس، در همه‌ی گروه‌ها، هر سه موش ماده با یک موش نر برای جفت‌گیری در یک قفس قرار داده شدند. همچنین، به موش‌های گروه گنادوتروپین + سیلدنافیل سیترات به فواصل ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تزریق HCG، سیلدنافیل سیترات با دز ۳ mg/kg میلی‌گرم/کیلوگرم (۶-۵) برای هر موش تزریق گردید. مدت ۹۶ ساعت پس از تزریق HCG، موش‌های گروه‌های مورد مطالعه، با کلرال هیدرات با دز ۳۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم بیهوش (۲۸) و رحم آن‌ها با محیط کشت شستشو داده شد. فقط از رحم موش‌هایی که حاوی بلاستوسیست بودند، نمونه‌برداری از ۱/۳ میانی رحم انجام شد.

هیستومورفولوژی (Histomorphology): رحم موش‌های حاوی بلاستوسیست، جهت عملیات تثبیت (Fixation) در محلول تثبیت کننده‌ی (Fixative) فرمالین ۱۰ درصد با $\text{pH} = ۷/۲$ به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. سپس، قطعه‌ی بافتی در دستگاه اتوتکنیکون جهت پردازش قرار داده شد. با استفاده از دستگاه میکروتوم، مقاطع ۵ میکرومتری به صورت سریال سکشن (Serial section) برای مطالعات بافت‌شناسی و مقاطع ۴ میکرومتری و به فواصل ۵۰۰ میکرومتر برای مطالعات ایمونوهیستوشیمی (Immunohistochemistry) تهیه گردید. در این مرحله، برش‌های تهیه شده بر روی لام حاوی پلی‌الیزین قرار داده شد تا روی لام بچسبد و بدین ترتیب، لام‌ها آماده‌ی رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی شدند.

هیستومورفومتیک (Histomorphometrics): در تمام گروه‌های تحت مطالعه، برای اندازه‌گیری ضخامت میومتریوم، تمام لام‌هایی که برش بافتی به صورت یک دایره بود، به صورت تصادفی انتخاب گردید. سپس، فوتوگراف میکروسکوپ نوری از همه‌ی نمونه‌های انتخاب شده، توسط نرم‌افزار Motic Image Plus 3.2 و با عدسی ۴۰ عکس‌برداری گردید و ضخامت میومتریوم که از حد فاصل خارجی بین پری‌تریوم و میومتریوم تا ناحیه‌ی بازال آندومتر می‌باشد، اندازه‌گیری شد. شایان ذکر است که در هر گروه، به طور متوسط ۲۰۰ ناحیه اندازه گرفته شد.

رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی: جهت تعیین میزان آنژیوزنز و تشخیص سلول‌های اندوتلیال، از روش ایمونوهیستوشیمی استفاده شد. برای تعیین سلول‌های اندوتلیال، از آنتی‌بادی مونوکلونال Anti-CD 31 (Biovision, USA) به عنوان شاخص سلولی

اندوتلیال استفاده گردید. اساس این روش، بر پایه‌ی اتصال آنتی‌ژن موجود در بافت به آنتی‌بادی اولیه در مرحله‌ی اول می‌باشد و در مرحله‌ی دوم، آنتی‌بادی ثانویه متصل به آنزیم پراکسیداز که علیه آنتی‌بادی اولیه ساخته شده است، در اختیار بافت قرار می‌گیرد. بنابراین، آنتی‌بادی اولیه به عنوان آنتی‌ژن برای آنتی‌بادی ثانویه عمل می‌کند. کمپلکس آنتی‌بادی نشان‌دار (آنتی‌بادی ثانویه) و آنتی‌بادی اولیه را می‌توان با استفاده از سوبسترای آنزیم نمایان ساخت. مقاطع بافتی تهیه شده از میومتریوم رحم موش، در زیر میکروسکوپ BH4 Olympus با بزرگ‌نمایی $\times 40$ بررسی شدند و سلول‌های اندوتلیال مشخص شده در تمام نمونه‌ها، در یک دور کامل از میومتریوم و به صورت یک مقطع دایره‌ای کامل شمارش گردید. شایان ذکر است ۲۰ فیلد انتخابی به صورت تصادفی از هر نمونه انتخاب گردید.

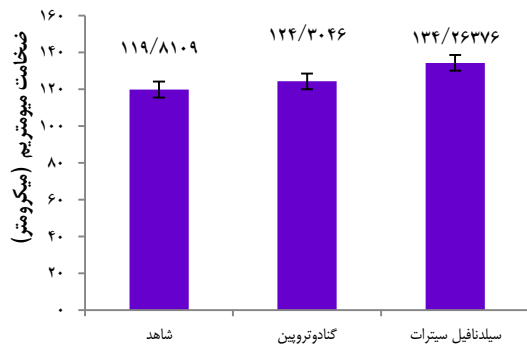
تجزیه و تحلیل اطلاعات: پس از اندازه‌گیری ضخامت میومتریوم در زیر میکروسکوپ نوری و با استفاده از نرم‌افزار Motic Image Plus 3.2 و همچنین پس از شمارش تعداد سلول‌های اندوتلیال با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی و بر اساس نشانگر Cluster of differentiation 31 (CD31)، داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از روش‌های آماری One-way ANOVA و Least significant difference (LSD) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ (version 20, IBM Corporation, Armonk, NY) مورد بررسی آماری قرار گرفت. مقدار $P < ۰/۰۵$ ، به عنوان ارتباط معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

مشاهدات میکروسکوپی نشان داد که مقاطع بافتی تهیه شده دارای پری‌تریوم، میومتریوم و اندومتريوم بسیار واضح بودند. لومن رحم توسط سلول‌های اپی‌تلیال لومینال با ساختمان استوانه‌ای و هسته‌ی قاعده‌ای پوشیده شده است. ساختمان غدد رحمی و اندومتريوم مرحله‌ی پیش از لانه‌گزینی را نشان داد که شامل اندومتريوم خیزدار و ماتریکس خارج سلولی فراوان بود (شکل ۱ا).

میانگین \pm انحراف استاندارد ضخامت میومتریوم بر اساس واحد میکرومتر محاسبه گردید (شکل ۱). نتایج حاکی از اختلاف معنی‌دار در گروه گنادوتروپین + سیلدنافیل سیترات نسبت به دو گروه گنادوتروپین و شاهد بود (شکل ۲).

میزان ضخامت میومتریوم در گروه گنادوتروپین + سیلدنافیل سیترات، گنادوتروپین و شاهد به ترتیب $۹/۹۶ \pm ۱۳۴/۲۶$ ، $۹/۶۱ \pm ۱۲۴/۳۰$ و $۱۰/۴۱ \pm ۱۱۹/۸۱$ میکرومتر بود.

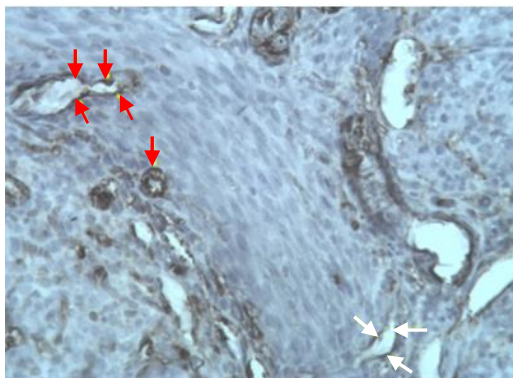


شکل ۲. ضخامت میومتریم رحمی در گروه‌های سه گانه‌ی تحت مطالعه. ضخامت گروه گنادوتروپین + سیلدنافیل سیترات به طور معنی‌داری بیشتر از دو گروه دیگر بود ($P < 0/05$). بین ضخامت میومتر دو گروه شاهد و گنادوتروپین، اختلاف معنی‌داری دیده نشد.

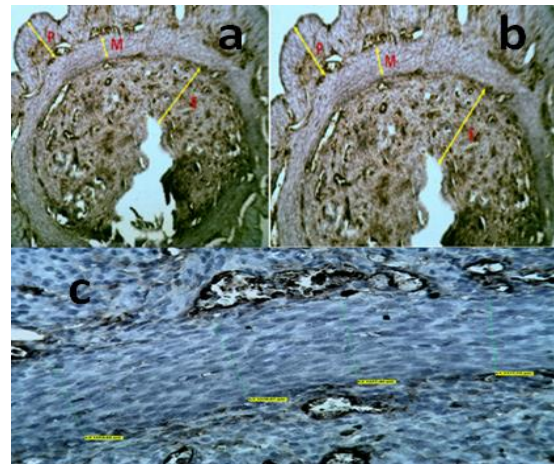
بحث

شکست لانه‌گزینی، در بسیاری از موارد مسؤول ایجاد ناباروری و مهم‌ترین عامل محدود کننده برای دستیابی به نتیجه‌ی موفق در استفاده از روش‌های کمک باروری می‌باشد. روند لانه‌گزینی، نیاز به مشارکت دو جانبه از سوی جنین و آندومتر دارد (۲۹).

به طور کلی، مرحله‌ی اتصال در حین دوره‌ی پنجره‌ی لانه‌گزینی انجام می‌شود، در حالی که تهاجم در اواخر مرحله‌ی ترشخی رخ می‌دهد (۳۰). تعامل بین جنین و آندومتر به وسیله‌ی یک تعامل مولکولی، با مشارکت سیتوکاین‌ها، عوامل رشد، هورمون‌ها و مولکول‌های چسبنده‌ی سلولی، تحت تأثیر قرار می‌گیرد و پذیرندگی آندومتر را سبب می‌شود. همچنین، آنژیوزنز فرایندی است که در لانه‌گزینی انسان نقش به‌سزایی دارد (۳۲-۳۰). آنژیوزنز تحت تأثیر تعامل بین عوامل تحریک کننده و مهارری رخ می‌دهد.



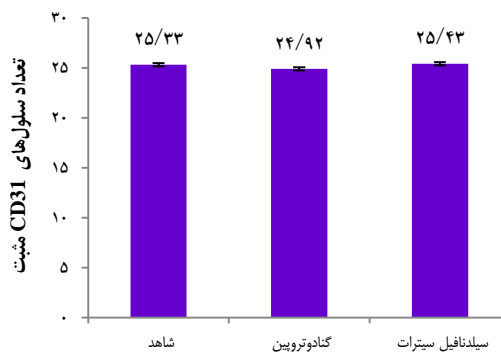
شکل ۳. سمت چپ بیانگر تصویر ایمونوهیستوشیمی مربوط به سلول‌های CD31 (Cluster of differentiation 31) مثبت است (بزرگ‌نمایی $\times 40$). این سلول‌ها مشابه سلول‌های اندوتلیال و به رنگ قهوه‌ای می‌باشند (بیگان قرمز). سمت راست بیانگر تعداد سلول‌های CD31 مثبت است. همان‌طور که دیده می‌شود، هیچ اختلاف معنی‌داری بین تعداد سلول‌ها در گروه‌های سه گانه‌ی تحت مطالعه دیده نمی‌شود.



شکل ۱. فتوگراف میکروسکوپ نوری از رحم موش‌های سوری به منظور مشخص کردن لایه‌های رحمی و ضخامت میومتریم. در شکل‌های بالا، P بیانگر پری‌میتریم، M بیانگر میومتریم و E نشان دهنده‌ی اندومتریم می‌باشد (a و b). در شکل c، ضخامت میومتریم دیده می‌شود.

با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی، تعداد سلول‌های اندوتلیال با استفاده از نشانگر CD31 به کمک میکروسکوپ نوری Olympus با بزرگ‌نمایی $\times 40$ شمارش گردید. در این مطالعه، تعداد سلول‌های اندوتلیال با استفاده از این نشانگر به رنگ قهوه‌ای تیره مشخص شد و اختلاف معنی‌داری بین هیچ یک از گروه‌های مورد مطالعه دیده نشد (شکل ۳).

طبق یافته‌های مطالعه‌ی حاضر که با شمارش سلول‌های اندوتلیال بر روی ۲۰ فیلد انتخابی به روش تصادفی ساده صورت گرفت، به طور میانگین تعداد سلول‌های اندوتلیال در گروه شاهد برابر با $11/15 \pm 25/33$ ، در گروه گنادوتروپین $24/16 \pm 24/92$ و در گروه گنادوتروپین + سیلدنافیل سیترات برابر با $27/42 \pm 25/43$ بود.



میومتر نقش مهمی در این امر دارد؛ چرا که عروقی که اندومتریم را خون‌رسانی می‌کنند، همگی از میومتریم منشأ می‌گیرند (۳۷).

در مطالعه‌ی حاضر، تفاوت معنی‌داری در آنژیوتنز گروه‌های سه‌گانه‌ی تحت مطالعه دیده نشد. به عبارت دیگر، می‌توان گفت که سیلدنافیل سیترات، سبب افزایش آنژیوتنز میوتریم نشده است که می‌تواند به علت کوتاه بودن دوره‌ی درمان و دز پایین داروی مصرفی باشد.

مشکلات مرتبط با ناباروری زنانه، یکی از مسایل مهم مرتبط با سرویس‌های بهداشت جهانی است. تحریکات هورمونی تخمدان به منظور بهبود تخمک‌گذاری، یکی از درمان‌های اصلی در برخورد با این طیف از بیماران می‌باشد. مطالعات تجربی نقش به‌سزایی در پیشبرد دانش تولید مثل ایفا می‌کنند.

نکته‌ی حایز اهمیت در اجرای مدل‌های حیوانی، توجه به سن حیوان است؛ به طوری که باید بیان‌کننده‌ی شرایط مشابهی با موارد انسانی باشد. در مطالعه‌ی حاضر، زمان ۹۶ ساعت بعد از تزریق گنادوتروپین برای بررسی بافتی انتخاب گردید؛ چرا که این زمان، به طور تقریبی مصادف با زمان لانه‌گزینی جنین موش است و وقایع این دوره، نقش مهمی در موفقیت یا شکست بارداری ایفا می‌کند (۳۸).

همچنین، در مطالعه‌ی حاضر، از روش ایمونوهیستوشیمی برای بررسی آنژیوتنز میومتریم استفاده شد. این روش، تنها روش دقیق برای بررسی آنژیوتنز نمی‌باشد، اما به نظر می‌رسد یک تکنیک مناسب برای بررسی روند تغییرات آنژیوتنز باشد. به منظور اجتناب از اشتباهات تشخیصی، به پاره‌ای از خصوصیات کلیدی سلول‌های CD31 مثبت، توجه خاصی شد. در این روش، از آن جایی که آنزیم پراکسیداز با دی‌آمینو بنزیدین واکنش می‌دهد، دی‌آمینو بنزیدین به عنوان سوپسترای پراکسیداز شناخته می‌شود. محصول واکنش رنگ قهوه‌ای تیره ایجاد می‌کند که با میکروسکوپ نوری قابل مشاهده و بررسی می‌باشد (۳۸، ۶). همچنین، این سلول‌ها ظاهری شبیه سلول‌های سنگفرشی ساده دارند که در سطح داخلی ریز عروق‌ها قرار گرفته‌اند.

آنژیوتنز و لانه‌گزینی، دو فرایند ضروری و وابسته به هم می‌باشد. در این مطالعه، با استفاده از داروهای تحریک‌کننده‌ی تخمک‌گذاری و سیلدنافیل سیترات، ضخامت میومتر از لحاظ آماری در گروه سیلدنافیل سیترات نسبت به گروه شاهد تغییر معنی‌داری داشت. این در حالی بود که با استفاده از نشانگر CD31، آنژیوتنز از لحاظ آماری در تمام گروه‌های تجربی نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌داری نشان نمی‌داد.

بی‌شک، با کشف داروهای مؤثر و تحریک‌کننده‌ی آنژیوتنز، می‌توان باعث ایجاد خصوصیات بهتر در پذیرندگی آندومتر از جمله رساندن ضخامت آندومتریم به حد طبیعی و مانع شکست لانه‌گزینی در روش‌های کمک باروری شد. امید است که با پیشرفت‌های اخیر

در سال‌های اخیر، پاره‌ای از مطالعات به عملکرد بهینه‌ی سیلدنافیل سیترات بر روی سیستم تولید مثل زنانه پرداخته‌اند. به عنوان مثال، Taskin و همکاران، به نقش بهینه‌ی سیلدنافیل سیترات در محافظت از تخمک‌های بیماران سرطانی که تحت شیمی‌درمانی قرار گرفته بودند، اشاره دارند (۳۳).

پاره‌ای دیگر از مطالعات، بر نقش مصرف سیلدنافیل سیترات واژینال در بهبود تکامل اندومتریم در زنان حامله تأکید می‌کنند (۳۴، ۱۸). همچنین، Mangal و Mehirishi، اثرات مصرف سیلدنافیل سیترات در جریان خون و افزایش ضخامت اندومتر را به وضوح تأیید کرده‌اند (۳۵). در مطالعه‌ی حاضر، اثرات این دارو بر روی ضخامت میومتر بررسی شد؛ چرا که انقباضات رحمی که از میومتریم منشأ می‌گیرند، یکی از علل پس‌زدگی رویان و شکست حاملگی به حساب می‌آیند. نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که ضخامت میومتریم در گروهی که سیلدنافیل سیترات مصرف کرده بودند، به طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد و گنادوتروپین بود.

این مسأله، می‌تواند نشان‌دهنده‌ی آسودگی عضلانی بیشتر در گروه سیلدنافیل سیترات و شاید به علت افزایش نیتریک اکساید در داخل سلول عضله‌ی صاف و در نتیجه‌ی شل شدن عضلات میومتریم باشد، اما اظهار نظر قطعی منوط به انجام مطالعات الکتروفیزیولوژی است.

نتایج مطالعات Khan و همکاران، اثرات سیلدنافیل سیترات در افزایش آسودگی عضلانی میومتریم رحمی را اثبات کردند (۳۶). آن‌ها در مطالعه‌ی خود بیان داشتند که اثر سیلدنافیل در آسودگی عضلانی میومتریم، غیر وابسته به cGMP می‌باشد و از طریق کانال‌های پتاسیم، این اثر القا می‌شود.

به تازگی، سیلدنافیل سیترات به عنوان یکی از پتانسیل‌های درمانی در شرایطی که ضرورت پیشبرد آنژیوتنز احساس می‌شود، مطرح شده است. همان‌طور که گفته شد، افزایش غلظت درون سلولی NO به عنوان یک عامل دخیل در روند آنژیوتنز مطرح شده است. از طرفی، cGMP یک واسطه‌ی حیاتی در القای آنژیوتنز توسط NO می‌باشد.

تا کنون، مطالعات زیادی به نقش سیلدنافیل سیترات در القای آنژیوتنز اشاره داشته‌اند. در مطالعه‌ی حاضر، به اثرات این دارو بر روی بهبود زخم پرداخته شد و نتایج نشان داد که این دارو، از طریق گشادی عروق و افزایش فیروبلاست‌ها باعث تسریع در روند بهبود زخم می‌شود (۱۶).

در مطالعه‌ی مشابه دیگری، به نقش سیلدنافیل سیترات در پیشبرد روند آنژیوتنز و از طریق تنظیم عامل رشد آندوتلیال عروقی اشاره شده است (۱۹). خون‌گیری مناسب آندومتریم، نقش حایز اهمیت در پیشبرد روند طبیعی حاملگی بازی می‌کند. چنانچه گفته شد، آنژیوتنز

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه‌ی دکتری حرفه‌ای پزشکی عمومی در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان بود. بدین وسیله، از معاونت پژوهشی این دانشگاه قدردانی به عمل می‌آید.

در زمینه‌ی مولکولی، شرایطی فراهم شود که با انجام مطالعات گسترده در محیط برون‌تنی و مدل‌های حیوانی، بتوان آنژیوژنز میومتریم و به دنبال آن، بهبود خون‌گیری آندومتریم را در انسان بهبود بخشید و مانع شکست لانه‌گزینی شد.

References

1. Nguyen TT, Shynlova O, Lye SJ. Matrix metalloproteinase expression in the rat myometrium during pregnancy, term labor, and postpartum. *Biol Reprod* 2016; 95(1): 24.
2. Mandala M, Osol G. Physiological remodelling of the maternal uterine circulation during pregnancy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2012; 110(1): 12-8.
3. Osol G, Moore LG. Maternal uterine vascular remodeling during pregnancy. *Microcirculation* 2014; 21(1): 38-47.
4. Osol G, Mandala M. Maternal uterine vascular remodeling during pregnancy. *Physiology (Bethesda)* 2009; 24: 58-71.
5. Rashidi B, Soleimani Rad JI, Roshangar L, Alizadeh MR. Evaluation of pinopodes expression on the mouse endometrium immediately before implantation by treatment with HMG/HCG and sildenafil citrate administration. *Iran J Basic Med Sci* 2012; 15(5): 1091-6.
6. Rashidi B, Soleimani Rad J, Roshangar L. Comparison of morphological and morphometrical characteristics in the glandular epithelium of mouse endometrium in preimplantation period after administration HMG-HCG, progesterone and sildenafil citrate. *J Isfahan Med Sch* 2010; 28(112): 656-64. [In Persian].
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.
8. Arian DC, Bakan V, Kurutas EB, Sayar H, Coskun A. Protective effect of tadalafil on ischemia/reperfusion injury of rat ovary. *J Pediatr Surg* 2010; 45(11): 2203-9.
9. Celik M, Aksoy AN, Aksoy H, Aksoy Y, Halici Z. Sildenafil reduces ischemia-reperfusion injury in rat ovary: Biochemical and histopathological evaluation. *Gynecol Obstet Invest* 2014; 78(3): 162-7.
10. Fetih AN, Habib DM, Abdelaal II, Hussein M, Fetih GN, Othman ER. Adding sildenafil vaginal gel to clomiphene citrate in infertile women with prior clomiphene citrate failure due to thin endometrium: A prospective self-controlled clinical trial. *Facts Views Vis Obgyn* 2017; 9(1): 21-7.
11. Lopez-Tello J, Arias-Alvarez M, Jimenez-Martinez MA, Barbero-Fernandez A, Garcia-Garcia RM, Rodriguez M, et al. The effects of sildenafil citrate on fetoplacental development and haemodynamics in a rabbit model of intrauterine growth restriction. *Reprod Fertil Dev* 2016. [Epub ahead of print].
12. Rashidi B, Malekzadeh M, Goodarzi M, Masoudifar A, Mirzaei H. Green tea and its anti-angiogenesis effects. *Biomed Pharmacother* 2017; 89: 949-56.
13. Weis SM, Cheresch DA. Tumor angiogenesis: Molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med* 2011; 17(11): 1359-70.
14. Petit I, Jin D, Rafii S. The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: A molecular hub modulating neo-angiogenesis. *Trends Immunol* 2007; 28(7): 299-307.
15. Caporali A, Martello A, Miscianinov V, Maselli D, Vono R, Spinetti G. Contribution of pericyte paracrine regulation of the endothelium to angiogenesis. *Pharmacol Ther* 2017; 171: 56-64.
16. Tas A, Atasoy N, Ozbek H, Aslan L, Yuksel H, Dagoglu CG. Effects of sildenafil citrate (Viagra) in the early phase of healing process in open wounds induced experimentally in dogs. *Acta Vet Brno* 2003; 72: 273-7.
17. Vidavalur R, Penumathsa SV, Zhan L, Thirunavukkarasu M, Maulik N. Sildenafil induces angiogenic response in human coronary arteriolar endothelial cells through the expression of thioredoxin, hemeoxygenase and vascular endothelial growth factor. *Vascul Pharmacol* 2006; 45(2): 91-5.
18. Dehghani Firouzabadi R, Davar R, Hojjat F, Mahdavi M. Effect of sildenafil citrate on endometrial preparation and outcome of frozen-thawed embryo transfer cycles: A randomized clinical trial. *Iran J Reprod Med* 2013; 11(2): 151-8.
19. Pyriochou A, Zhou Z, Koika V, Petrou C, Cordopatis P, Sessa WC, et al. The phosphodiesterase 5 inhibitor sildenafil stimulates angiogenesis through a protein kinase G/MAPK pathway. *J Cell Physiol* 2007; 211(1): 197-204.
20. Gnainsky Y, Granot I, Aldo PB, Barash A, Or Y, Schechtman E, et al. Local injury of the endometrium induces an inflammatory response that promotes successful implantation. *Fertil Steril* 2010; 94(6): 2030-6.
21. Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod* 2007; 22(6): 1506-12.
22. Larsen U. Research on infertility: Which definition should we use? *Fertil Steril* 2005; 83(4): 846-52.
23. Philippov OS, Radionchenko AA, Bolotova VP, Voronovskaya NI, Potemkina TV. Estimation of the prevalence and causes of infertility in western Siberia. *Bull World Health Organ* 1998; 76(2): 183-7.
24. Safarinejad MR. Infertility among couples in a population-based study in Iran: Prevalence and associated risk factors. *Int J Androl* 2008; 31(3): 303-14.
25. McWilliams GD, Frattarelli JL. Changes in measured endometrial thickness predict in vitro fertilization

- success. *Fertil Steril* 2007; 88(1): 74-81.
26. Bulletti C, de ZD. Uterine contractility and embryo implantation. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2006; 18(4): 473-84.
 27. Khairy M, Dhillon RK, Chu J, Rajkhowa M, Coomarasamy A. The effect of peri-implantation administration of uterine relaxing agents in assisted reproduction treatment cycles: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2016; 32(4): 362-76.
 28. Saeedi Borujeni MJ, Hami J, Hagher H, Rastin M, Sazegar G. Evaluation of Bax and Bcl-2 proteins expression in the rat hippocampus due to childhood febrile seizure. *Iran J Child Neurol* 2016; 10(1): 53-60.
 29. Dekel N, Gnainsky Y, Granot I, Racicot K, Mor G. The role of inflammation for a successful implantation. *Am J Reprod Immunol* 2014; 72(2): 141-7.
 30. Karizbodagh MP, Rashidi B, Sahebkar A, Masoudifar A, Mirzaei H. Implantation Window and Angiogenesis. *J Cell Biochem* 2017; 118(12): 4141-51.
 31. Chen X, Man GCW, Liu Y, Wu F, Huang J, Li TC, et al. Physiological and pathological angiogenesis in endometrium at the time of embryo implantation. *Am J Reprod Immunol* 2017; 78(2).
 32. Ledee N, Petitbarat M, Chevrier L, Vitoux D, Vezmar K, Rahmati M, et al. The uterine immune profile may help women with repeated unexplained embryo implantation failure after in vitro fertilization. *Am J Reprod Immunol* 2016; 75(3): 388-401.
 33. Taskin MI, Yay A, Adali E, Balcioglu E, Inceboz U. Protective effects of sildenafil citrate administration on cisplatin-induced ovarian damage in rats. *Gynecol Endocrinol* 2015; 31(4): 272-7.
 34. Takasaki A, Tamura H, Miwa I, Taketani T, Shimamura K, Sugino N. Endometrial growth and uterine blood flow: A pilot study for improving endometrial thickness in the patients with a thin endometrium. *Fertil Steril* 2010; 93(6): 1851-8.
 35. Mangal S, Mehirishi S. To study and compare the effect of vaginal sildenafil and estradiol valerate on endometrial thickness, blood flow and pregnancy rates in infertile women undergoing intrauterine insemination. *Int J Reprod Contracept Obstet Gynecol* 2016; 5(7): 2274-7.
 36. Khan RN, Hamoud H, Warren A, Wong LF, Arulkumaran S. Relaxant action of sildenafil citrate (Viagra) on human myometrium of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191(1): 315-21.
 37. Farrer-Brown G, Beilby JO, Tarbit MH. The blood supply of the uterus. 1. Arterial vasculature. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 1970; 77(8): 673-81.
 38. Rashidi B, Rad JS, Rad LR. Immunohistochemical (Ki-67) study of endometrial maturation in mice after use of phosphodiesterase type 5 inhibitor. *Adv Biomed Res* 2015; 4: 154.

The Survey of Angiogenesis and Myometrial Thickness of Preimplantation Mouse Uterine in Natural Cycle in those Received Human Menopausal Gonadotropin-Human Chorionic Gonadotropin (HMG-HCG) and Sildenafil Citrate

Gholam Reza Dashti¹, Ariubarzan Farhadi², Mohammad Javad Saeedi-Borujeni³, Bahman Rashidi¹

Original Article

Abstract

Background: Uterus myometrium contractions play crucial role in break or successful embryo implantation. Furthermore, efficient myometrial angiogenesis is important event for supplying endometrium blood. Recently, many studies were performed for investigating the effects of sildenafil citrate (SC) on female fertility. This study aimed was to assess the changes in myometrial thickness and associated angiogenesis after injections of sildenafil citrate in superovulated mice.

Methods: Thirty adult female mice and ten adult male mice were purchased. The female mice were divided into three equal groups of control without any intervention, gonadotropin receiving human menopausal gonadotropin (HMG) and human chorionic gonadotropin (HCG), and gonadotropin and sildenafil citrate receiving human menopausal gonadotropin, and human chorionic gonadotropin and sildenafil citrate administration. After mating, animals were deeply anesthetized and the uterus was rapidly removed for histology and immunohistochemistry process to identify cluster of differentiation 31 (CD31).

Findings: In gonadotropin + sildenafil citrate group, the thickness of myometrium was significantly thicker than control and gonadotropin groups ($P < 0.05$ for both). The results of immunohistochemistry survey for myometrium CD31 demonstrated that administrated sildenafil citrate did not induce any angiogenesis associated alteration in gonadotropin + sildenafil citrate group ($P > 0.05$).

Conclusion: It may finally conclude that administration of sildenafil citrate does not cause remarkable alterations in myometrial angiogenesis; but increases the thickness of myometrium. Although for realistic decision about the sildenafil citrate effects on aforementioned parameters, more molecular investigations and longer drug consumption periods are necessary.

Keywords: Sildenafil citrate, Myometrium, Angiogenesis

Citation: Dashti GR, Farhadi A, Saeedi-Borujeni MJ, Rashidi B. **The Survey of Angiogenesis and Myometrial Thickness of Preimplantation Mouse Uterine in Natural Cycle in those Received Human Menopausal Gonadotropin-Human Chorionic Gonadotropin (HMG-HCG) and Sildenafil Citrate.** J Isfahan Med Sch 2017; 35(447): 1217-24.

1- Associate Professor, Department of Anatomical Sciences and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Student of Medicine, Student Research Committee, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- PhD Candidate, Department of Anatomical Sciences and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Bahman Rashidi, Email: b_rashidi@med.mui.ac.ir