

تقابل اثر نالوکسان با ناباروری القایی سیستم نیتریک اکساید در مدل حیوانی تخمدان پلی کیستیک

نویسندگان: فاطمه لک‌زایی^۱، منیژه کرمی^{۲*}، محمدرضا جلالی‌ندوشن^۳، فاطمه حسنی^۴

۱. کارشناس ارشد گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۲. دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۳. استاد گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۴. کارشناس ارشد گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه دانشگاه شاهد، تهران، ایران

E-mail: Karami@shahed.ac.ir

* نویسنده مسئول: منیژه کرمی

چکیده

مقدمه و هدف: نشانگان تخمدان پلی کیستیک (PCOS)، طبق شواهد در درصد بالایی از زنان در سن باروری، باعث بروز مشکل ناباروری می‌شود؛ در این مطالعه، رفع این مشکل در موش‌های سفید بزرگی که به کمک بیش‌تحریکی سیستم نیتریک اکساید (NO) به عارضه PCOS، دچار شدند، بررسی شد.

مواد و روش‌ها: موش‌های سفید بزرگ آزمایشگاهی ماده نژاد ویستار (با وزن ۲۰۰-۲۵۰ گرم) به صورت باکره دی استروس تحت شرایط استاندارد نگهداری شدند. یک گروه از آنها فقط ال-آرژنین (۵۰ mg/kg) را به‌طور داخل‌صفاقی طی یک دوره نه روزه، روزی یک‌بار، دریافت کردند؛ گروه دیگر ۳۰ دقیقه پیش از تزریق آن محرک سیستم نیتریک اکساید، نالوکسان (۰/۴ mg/kg) گرفتند. گروه سوم، فقط نالوکسان (۰/۴ mg/kg) و گروه کنترل، فقط سالین (۱ ml/kg) را دریافت کردند.

نتایج: تخمدان موش‌های تیمار شده با ال-آرژنین در مقایسه با گروه شاهد و گروهی که با پیش‌تزریق نالوکسان مواجه بود، ساختارهای کیستیک را معنی‌دار نشان داد. وضعیت پلی کیستیک تخمدان با پیش‌تزریق نالوکسان بهبود یافت؛ در ضمن ال-آرژنین بر رحم اثر التهابی داشت، حال آنکه نالوکسان بر دیواره رحم، اثر فزاینده چین‌خوردگی اندومتر و گسترش سطح نشان‌داد.

نتیجه‌گیری: نالوکسان با عارضه پلی کیستیک تخمدانی القاشده با بیش‌تحریکی سیستم نیتراژیک تقابل اثر نشان داده‌است؛ این تحقیق می‌تواند با معرفی این اثر نالوکسان درجه‌ای جدید را در رفع ناباروری ناشی از سندرم تخمدان پلی کیستیک بگشاید.

واژگان کلیدی: سندرم تخمدان پلی کیستیک، ناباروری، ال-آرژنین، نیتریک اکساید، نالوکسان

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست‌ویکم-شماره ۱۱۰
اردیبهشت ۱۳۹۳

دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۱۹

آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۳/۰۱/۱۰

پذیرش: ۱۳۹۳/۰۱/۱۱

مقدمه

تخمندان پلی کیستیک با سقط را با اندومتر غیر طبیعی ناشی از سنتز پروستاگلاندین‌ها توجیه کرده‌اند (۱۴). بررسی‌ها نشان داده‌اند که پروستاگلاندین‌هایی که از طریق مسیر سیکلواکسیژناز تولید می‌شوند، در قالب پاتوفیزیولوژی و درمان از دیدگاه بالینی با طب تولیدمثل مرتبط‌اند؛ حتی در بعضی مطالعات از مهارکنندگان تولید پروستاگلاندین برای جلوگیری از سقط استفاده شده‌است (۱۷-۱۵). در میان درمان‌های رایج برای این سندرم، برخی از محققان، نقش سرکوب سیستم اپیوئید را در کنترل علائم این بیماری، محتمل دانسته‌اند (۱۸). پپتیدهای اپیوئید درون‌زاد، نقشی ممانعتی در ترشح هورمون آزادکننده گنادوتروپین (Gonadotropin Releasing Hormone) یا GnRH دارند (۱۹).

برپایه برخی مطالعات نالوکسان به‌عنوان یک آنتاگونیست ماده مخدر با مهار گیرنده‌های اپیوئیدی اثر تعدیل‌کنندگی بر ترشح GnRH داشته، به‌این‌ترتیب به بهبود عملکرد محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-غده جنسی (Hypothalamus-Pituitary Gonad: HPG) منجر می‌شود (۲۰-۱۸)؛ بررسی‌های دیگر نشان داده‌اند، در بیمارانی که به آمنوره هیپوتالامیک دچارند، انسداد گیرنده‌های اپیوئیدی به کمک آنتاگونیست‌های رقابتی مرفین نظیر نالوکسان، باعث افزایش آزادسازی GnRH و از این طریق به بالارفتن سطح Luteinizing Hormone منجر می‌شود که این امر به برگشت سیکل‌های قاعدگی به حالت طبیعی می‌انجامد (۱۸)؛ همچنین این نوع مهار اثر نافی بر هیپرانسولینی در زنانی که به PCOS دچارند، می‌شود (۲۱ و ۲۲).

بر اساس نتایج پژوهشی از این گروه، بیش‌تحریکی آنزیم نیتریک اکساید سینتاز به‌واسطه تزریق مکرر پیش‌ساز نیتریک اکساید (ال-آرژنین) به‌صورت تزریق داخل‌صفافی در موش‌های سفید بزرگ آزمایشگاهی، باعث ایجاد ظاهر کیستیک در تخمدان به شکلی می‌شود که به سندرم مورد نظر نسبت داده می‌شود (۲)؛ با در نظر گرفتن این مسئله که نشانگان تخمدان پلی کیستیک

سندرم تخمدان پلی کیستیک (Polycystic Ovary Syndrome) با هیپراندرژنیسم بالینی یا بیوشیمیایی، فقدان قاعدگی (آمنوره) و وجود کیست در تخمدان تشخیص داده می‌شود (۱)؛ این سندرم در ۷۵ درصد زنان نابارور که علت ناباروری آنها فقدان تخمک‌گذاری است، دیده می‌شود (۱)؛ امروزه این سندرم در گروه اختلال‌های التهابی دسته‌بندی می‌شود (۲) و ناباروری، یکی از پیامدهای بالینی این سندرم است (۳). سازوکار دقیق ایجاد این بیماری هنوز مشخص نیست اما مطالعات پیشین، عواملی متعدد را در بروز این نشانگان، مؤثر دانسته‌اند که از میان آنها تولید نیتریک اکساید (Nitric Oxide) فراوان در بسیاری از منابع به‌عنوان یکی از محرک‌های اساسی، مطرح شده‌است (۱ و ۴). نیتریک اکساید (NO) یک مولکول رادیکال آزادگازی است که از متابولیسم ال-آرژنین به ال-سیتولین توسط فعالیت ایزوفرم‌های آنزیم نیتریک اکساید سینتاز حاصل می‌شود (۵). بیان آنزیم نیتریک اکساید سینتاز و تولید گاز NO در تخمدان‌های موش‌های بزرگ آزمایشگاهی و انسان گزارش شده‌است (۴). NO نقش‌هایی بسیار را در ساخت استروئیدهای تخمدانی، تخمک‌گذاری و آپتوز فولیکولی ایفای می‌کند (۴). گزارش شده که iNOS (نیتریک اکساید سینتاز القایی)، ایزوفرم اصلی درگیر در فرایند تخمک‌گذاری تخمدان است (۶)، طی فرایند تخمک‌گذاری، افزایش در فعالیت NOS تخمدانی به افزایش در NO منجر می‌شود که تولید پروستاگلاندین‌ها را تحریک می‌کند و فرایند التهابی را افزایش می‌دهد که این خود پارگی فولیکولی را تسهیل می‌کند (۷)؛ از طرفی، مطالعات نشان داده‌اند که غلظت‌های افزایش‌یافته NO یا عوامل آزادکننده نیتریک اکساید، باعث مهار تولید استروئیدها در سلول‌های لوتال و گرانولوزا در انسان و موش‌های بزرگ آزمایشگاهی می‌شوند (۸ و ۹)؛ همچنین بسیاری مطالعات به ارتباط میان تولید نیتریک اکساید و تولید پروستاگلاندین‌ها در بدن به‌ویژه رحم اشاره کرده‌اند (۱۰-۱۳). در بعضی منابع، ارتباط سندرم

تجویز داروها

۲۴ سر موش به طور تصادفی به چهار گروه شش تایی آزمایشی (۳ گروه از آنها) و شاهد (دریافت کننده سالین) تقسیم شدند. به گروه کنترل طی آزمایش تنها سالین (۱ میلی لیتر/کیلوگرم) به طور داخل صفاقی توسط سرنگ انسولین تزریق شد؛ به گروه دوم برای برانگیختن سندرم تخمدان پلی کیستیک، ال-آرژینین (۵۰ میلی گرم/کیلوگرم) طی نه روز (هر روز یک بار) به شکل داخل صفاقی تزریق شد؛ به گروه سوم ۳۰ دقیقه پیش از تزریق ال-آرژینین، نالوکسان (۰/۴ میلی گرم/کیلوگرم) به طور داخل صفاقی طی نه روز (هر روز یک بار) تزریق شد و به گروه چهارم، طی دوره آزمایش فقط نالوکسان (۰/۴ میلی گرم/کیلوگرم) به طور داخل صفاقی تزریق شد.

برداشت تخمدان و رحم

پس از اتمام مرحله تجویز داروها، هر موش درون دسیکاتور با اتر فراوان بیهوش شد؛ سپس تخمدان‌ها پس از مطالعه بیومتریک (به کمک کولیس) و رحم از بافت‌های اطراف جدا و درون محلول ثبوت (فرمالین ۱۰ درصد) برای مطالعه بافتی قرارداد شدند.

برش گیری و رنگ آمیزی بافت‌ها

بافت‌ها پس از پاساژ، به مدت ۱۶ ساعت در (tissue processor) مورد آگیری قرار گرفتند؛ سپس از بافت تخمدان و رحم با استفاده از دستگاه میکروتوم برش‌های ۳ میکرونی گرفته شد و این برش‌ها به کمک روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین و اتوزین (Hematoxylin Eosin) رنگ شدند.

بررسی‌های آماری

برای آزمون فرض از آنالیز واریانس ANOVA یک طرفه استفاده شد. برای مقایسه میان گروه‌ها از LSD در صورت نیاز از توکی (Tukey) استفاده شد. $P < 0.05$ به عنوان معنی دار در نظر گرفته شد. مطالعات آماری بافتی با نرم افزار Image Tool (version 2003) در مقاطع ۱۰۰ میکرومتری انجام گرفتند.

ممکن است در نتیجه یک التهاب محلی در تخمدان ایجاد شود (۲)، نالوکسان به عنوان یک داروی ضدالتهابی (۲۳ و ۲۴) به احتمال می‌تواند در رفع التهاب القایی سیستم نیتراژیک نقش ایفا کند (۲۵)؛ از این رو در این مطالعه از نالوکسان در راستای رفع ناباروری موش‌های مبتلا به تخمدان‌های پلی کیستیک القایی بیش تحریکی سیستم نیتراژیک استفاده شد. بافت‌های تخمدان و رحم حیوانات برای مقایسه آثار ال-آرژینین (پیش ساز نیتریک اکساید) و نالوکسان مورد مطالعه قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

حیوانات مورد آزمایش

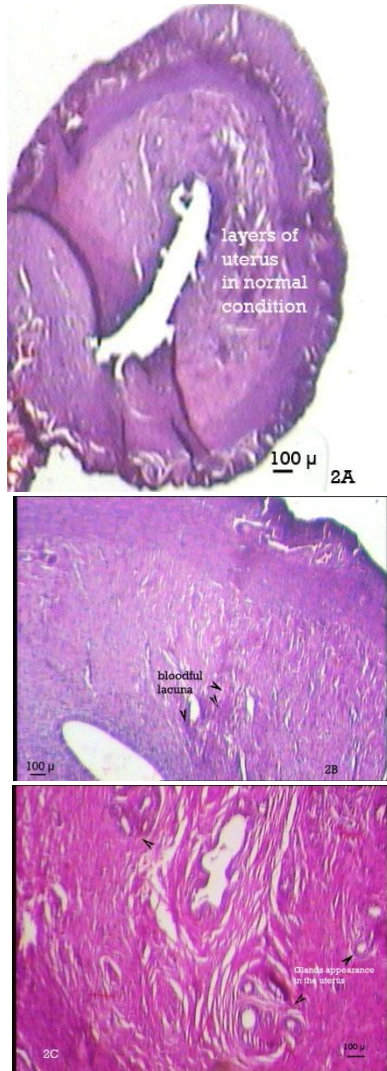
موش‌های سفید بزرگ آزمایشگاهی ماده، نژاد ویستار باکره (virgin) در محدوده وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم (توزین شده توسط ترازوی مخصوص توزین موش (Animal Scale) در آزمایشگاه حیوانات دانشگاه شاهد به صورت دی استروس تحت شرایط استاندارد نگهداری شدند.

مواد و داروهای مورد استفاده

- ۱- ال-آرژینین هیدروکلراید (L-Arginine HCl) خریداری شده از Sigma Co. آمریکا؛
- ۲- نالوکسان هیدروکلراید (Naloxone) تهیه شده از شرکت تولید دارو؛
- ۳- فرمالین ۱۰ درصد برای تثبیت بافت‌های تخمدان و رحم؛
- ۴- سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد؛
- ۵- هماتوکسیلین-اتوزین برای رنگ آمیزی بافت. خریداری شده از Sigma Co. آمریکا؛
- ۶- چسب اتنالن (خرید از Merck آلمان) برای مونت کردن بافت روی لام و چسباندن.

نتایج

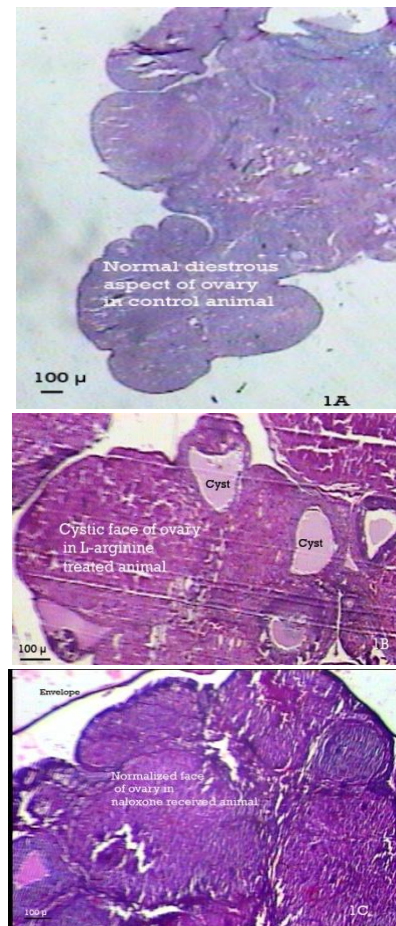
آزمایشگاهی ماده نژاد ویستار، فقط سالین (1 ml/kg) را دریافت کردند. گروه ال-آرژینین (50 mg/kg) این محرک سیستم نیتریک اکساید را به طور داخل صفاقی طی یک دوره نه روزه، روزی یکبار، دریافت کردند؛ گروه دیگر 30 دقیقه پیش از تزریق آن محرک سیستم نیتریک اکساید، نالوکسان (0.4 mg/kg) گرفتند.



شکل ۲

در شکل به ترتیب، تصویر اندومتر رحم حیوان کنترل (2A)، گروه دریافت کننده ال-آرژینین، گروه پیش تزریق نالوکسان بر ال-آرژینین قابل مشاهده است. آنچه از تصاویر برداشت می شود اینکه ال-آرژینین بر رحم اثر التهابی دارد (2B)؛ حال آنکه نالوکسان بر دیواره رحم، اثر گسترش سطح و افزایش چین خوردگی اندومتر و نیز رشد غدد ترشحاتی نشان می دهد (2C).

تخمندان موش های تیمار شده با ال-آرژینین در مقایسه با گروه شاهد و گروه پیش تزریق نالوکسان ساختارهای کیستیک را به طور معنی داری (F3,20= 10.815, p<0.0001) نشان داد (شکل 1)؛ نتایج حاصل همچنین به طور معنی داری، نمایانگر کاهش تعداد کیست ها در نمونه های با پیش تزریق نالوکسان است. در گروهی که ال-آرژینین گرفت، آثار التهابی رحم مشهود است (شکل 2)؛ پرخونی اندومتر و از این آثار بود. ولی رحم در نمونه های مربوط به نالوکسان افزایش چین خوردگی و رشد سطح را همراه رشد غدد منعکس کرد.



شکل ۱

تصویر تخمدان حیوان کنترل با منظر دیاستروس قابل مشاهده است (1A). تخمدان حیوانی که به طور مکرر، ال-آرژینین دریافت کرد، پر از کیست است (1B). تخمدان گروه ال-آرژینین / نالوکسان نیز فاقد کیست بوده، به وضعیت نرمال رسیده است (1C). لازم به یادآوری است که گروه کنترل موش های سفید بزرگ

بحث

تخمدان نشان داده شده است (۲۹).

همچنین در این مطالعه پیش تزریق نالوکسان توانست تعداد کیست‌ها را به طور معنی داری کاهش دهد که این نتیجه با یافته‌های مطالعات گذشته مطابقت دارد (۲ و ۳۰). مطالعات نشان دادند که ممانعت از مداخله سیستم اپوئیدی با نالتروکسان یا نالوکسان به کاهش هیپرانسولینی در زنان دچار PCOS منجر می‌شود (۲۱ و ۲۲) که این روند به احتمال می‌تواند به کاهش سطح آندروژن مترشحه تخمدان و در نتیجه از بین رفتن کیست‌ها در تخمدان کمک کند.

طبق مشاهدات پیشین، میزان شیوع سقط‌های مکرر در زنان مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک زیاد است. در مطالعاتی نشان داده شده است که تا ۸۲ درصد زنان دچار سقط‌های مکرر به سندرم تخمدان پلی کیستیک مبتلا هستند (۳۱-۳۳). در مطالعه حاضر نیز نشان داده شده که رحم حیوان گرفتار شده با عارضه چندین کیستی تخمدان پرخونی، یعنی به نوعی التهاب رحم نسبت به گروه کنترل اتفاق افتاده است، اما در گروه‌های دریافت کننده نالوکسان نه تنها این اثر مرتفع شده بلکه رشد غدد و افزایش چین خوردگی و سطح اندومتر مشهود است که این یافته می‌تواند نشان دهنده تأثیر مثبت نالوکسان بر روند باروری آینده باشد.

برخی مطالعات بیان کرده‌اند که ناباروری حاصل از سندرم تخمدان پلی کیستیک ناشی از عدم تخمک گذاری مزمن در تخمدان‌های این افراد است (۳۴). در تحقیق حاضر نیز نارسایی در تخمدان موش‌های گروه ال-آرژنینین (و برطرف شدن آن پس از تزریق نالوکسان) دیده می‌شود. پس عارضه پلی کیستیک حاصل از تزریق مکرر ال-آرژنینین و همچنین برطرف شدن این مشکل پس از تزریق نالوکسان را می‌توان به تقابل اثر این مشتق اپوئیدی بر ناباروری نارسایی ناشی از تخمدان‌های پلی کیستیک نسبت داد.

در این پژوهش دریافتیم که در حیوانات تحت تزریق‌های متوالی ال-آرژنینین، تخمدان‌ها منظره پلی کیستیک پیدا کردند ولی با پیش تزریق نالوکسان اثر یاد شده تعدیل شد. اندومتر رحم در اثر تزریق ال-آرژنینین به التهاب دچار شد اما نالوکسان افزایش چین خوردگی و رشد سطح اندومتر را همراه رشد غدد نشان داد.

محدود بودن انجام تحقیق‌ها و بررسی‌ها در انسان، پژوهشگران را بر آن می‌دارد تا از نمونه‌های حیوانی سندرم تخمدان پلی کیستیک استفاده کنند. تاکنون روش‌هایی گوناگون برای ایجاد این سندرم پیشنهاد شده است مانند تجویز آندروژن‌ها و استروژن‌ها (۲۶) ولی هیچ یک تمامی نشانگان را بازسازی نکرده است، حتی پدیده پلی کیستیک تخمدان در این مدل‌ها به وضوح نمایانده نشده است. این مطالعه برای ایجاد عارضه تخمدان‌های پلی کیستیک از بیش تحرکی سیستم نیتریک اکساید به عنوان یک سیستم التهابی به واسطه تجویز مکرر ال-آرژنینین (پیش ساز نیتریک اکساید) استفاده کرد (۲). با در نظر گرفتن این مطلب که یکی از معیارهای تشخیصی مهم در سندرم تخمدان پلی کیستیک خود وجود کیست‌ها در تخمدان‌ها است (۲ و ۲۶)، این تحقق به آن دست یافت چرا که در این مطالعه ظاهر کیستیک و تفاوت معنی دار تعداد این کیست‌ها با آنچه در نمونه‌های کنترل دیده می‌شد، گواه این مطلب است ولی اینکه چرا تخمدان پلی کیستیک می‌شود مطالعات بسیار دقیقی در این رابطه با شیوه‌های گوناگون انجام شده و مطالعات نشان داده است که غلظت‌های افزایش یافته NO یا عوامل آزادکننده نیتریک اکساید می‌توانند از ساخت استروئیدها در سلول‌های لوتئال و گرانولوزا در انسان و موش جلوگیری کنند (۲۷ و ۲۸). این امر به احتمال می‌تواند باعث افزایش سطح آندروژن تخمدانی شده و در نتیجه کیستی شدن تخمدان‌ها را به دنبال داشته باشد؛ از طرفی، نوعی سمیت سلولی (سیتوتوکسیسیته) با واسطه NO در

نتیجه‌گیری

عارضه تخمدان‌های پلی‌کیستیک را در مدل حیوانی می‌توان به کمک نالوکسان بهبود داد که این امر به احتمال از طریق رفع آثار التهابی (ضدالتهابی بودن نالوکسان) و کاهش تولید کیست میسر می‌شود؛ از طرفی، نالوکسان می‌تواند باعث افزایش قابلیت اندومتر رحم نیز بشود و اگر حاملگی روی دهد (پس از باروری) در نگهداری و حفظ حاملگی مؤثر واقع شود که این امر نیز به تداوم حاملگی تا تولد نوزاد حیوان کمک خواهد کرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شاهد و از کارشناسان محترم آزمایشگاه پاتوبیولوژی بیمارستان شهید مصطفی خمینی (بخش بافت‌شناسی) کمال تشکر و قدردانی خویش را اعلام می‌کنند.

آثار التهابی نیتریک اکساید و نقش آن در تولید عوامل التهابی نظیر پروستاگلاندین‌ها در رحم در مطالعات پیشین به اثبات رسیده است (۱۳-۱۰)؛ پس می‌توان تولید پروستاگلاندین‌ها و التهاب اندومتر رحم پس از تزریق پیش‌ساز نیتریک اکساید (ال-آرژینین) را در کاهش باروری دخیل دانست؛ از طرفی، افزایش باروری در پی پیش‌تزریق نالوکسان نیز با این یافته‌ها توجیه می‌شود چراکه اثرهای ضدالتهابی نالوکسان نیز در مطالعات پیشین به اثبات رسیده است (۲۳ و ۲۴). برابر یافته‌های دیگران استروژن و پروژسترون از طریق سیستم‌هایی نظیر سیستم نیتریک اکساید باعث رشد رگ‌های خونی در اندومتر یوم رحم و افزایش فعالیت غده‌های تراوشی می‌شوند (۳۵).

در نمونه‌های رحمی که ال-آرژینین دریافت کردند همه این شواهد اعم از رشد دیواره رحم و افزایش رگ‌های خونی دیده می‌شود، پس شاید بتوان تغییرهای ایجاد شده در رحم را به احتمال ناشی از به هم خوردن تعادل هورمونی که در این سندرم دیده می‌شود، یعنی استروژنی که توسط پروژسترون مقابله نمی‌شود، دانست؛ از طرفی، حضور غدد رشدیافته و افزایش چین‌خوردگی‌های رحمی به احتمال، نشان‌دهنده بازگشت تعادل هورمونی استروژن-پروژسترون به حالت طبیعی آن است که این جریان هم به احتمال می‌تواند به دلیل آثار تعدیل‌کننده نالوکسان روی تخمدان و کاهش آندروژن حاصل از آن باشد.

از طرفی طبق برخی مطالعات تولید بیش از حد نیتریک اکساید در بدن از جمله رحم می‌تواند به سمیت سلولی، التهاب، سرطان، اختلال‌های خودایمنی و بازجذب جنینی منجر شود (۱۰). پس شاید بتوان افزایش عروق خونی و رشد اندومتر یوم را در موش‌هایی که ال-آرژینین دریافت کردند نتیجه التهاب حاصل از حضور بیش از حد نیتریک اکساید دانست.

منابع

1. Brock B, Smidt K, Ovesen P, Schmitz O, Rungby J. Is metformin therapy for polycystic ovary syndrome safe during pregnancy? *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* 2005; 96(6): 410-412.
2. Hassani F, Karami M, Jalali Nadoushan MR, Eftekhari Yazdi P. Nitric oxide-induced polycystic ovaries in the Wistar rat. *International Journal of Fertility and Sterility* 2012; 6(2): 111-116.
3. Heard MJ, Pierce A, Carson SA, Buster JE. Pregnancies following use of metformin for ovulation induction in patients with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility* 2002; 77(4): 669-673.
4. Nakamura Y, Kashida S, Nakata M, Takiguchi S, Yamagata Y, Takayama H. Changes in nitric oxide synthase activity in the ovary of gonadotropin treated rats: the role of nitric oxide during ovulation. *Endocrine Journal* 1999; 46 (4): 529-538.
5. Zackrisson U, Mikani M, Wallin A, Delbro D, Hedin L, Brännström M. Cell- specific localization of Nitric Oxide Synthases (NOS) in the rat ovary during follicular development, ovulation and luteal formation. *Human Reproduction* 1996; 11(12): 2667-2673.
6. Faletti A, P´erez-Mart´inez S, Perotti C, De Gimeno MA. Activity of ovarian nitric oxide synthase (NOS) during ovulatory process in the rat: relationship with prostaglandins (PGs) production. *Nitric Oxide* 1999; 3: 330-347.
7. Faletti AG, Mohn C, Farina M, Lomniczi A, Rettori V. Interaction among beta-endorphin, nitric oxide and prostaglandins during ovulation in rats. *Reproduction* 2003; 125: 469-477.
8. Van Voorhis BJ, Dunn MS, Snyder GD, Weiner CP. Nitric oxide: an autocrine regulator of human granulosa-luteal cell steroidogenesis. *Endocrinology* 1994; 135: 1799-1806.
9. Olson LM, Jones-Burton CM, Jablonka-Shariff A. Nitric oxide decreases estradiol synthesis of rat luteinized ovarian cells: possible role for nitric oxide in functional luteal regression. *Endocrinology* 1996; 137: 3531- 3539.
10. Cella M, Farina MG, Dominguez Rubio AP, Di Girolamo G, Ribeiro ML, Franchi AM. Dual effect of nitric oxide on uterine prostaglandin synthesis in amurine model of preterm labour. *British Journal of Pharmacology* 2010; 161: 855-844.
11. Kenneth K. Inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase. *Advances in pharmacology* 1994; 33: 179-198.
12. Cella M, Aisemberg J, Sordelli MS, Billi S, Farina M, Franchi AM, et al. Prostaglandins modulate nitric oxide synthase activity early in time in the uterus of estrogenized rat challenged with lipopolysaccharide. *European Journal of Pharmacology* 2006; 534: 218-226.
13. Franchi AM, Chaud M, Rettori V, Suburo A, McCann SM, Gimeno M. Role of nitric oxide in eicosanoid synthesis and uterine motility in estrogen-treated rat uteri. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994; 91: 539-543.
14. Bonney RC, Franks S. The endocrinology of implantation and early pregnancy. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism* 1990; 4: 207-31.
15. Aisemberg J, Vercelli C, Billi S, Ribeiro ML, Ogando D, Meiss R, et al. Nitric oxide mediates prostaglandins' deleterious effect on lipopolysaccharide-triggered murine fetal resorption. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007; 104: 7534-7539.
16. Rac VE, Scott CA, Small C, Adamson SL, Rurak D, Challis JR, et al. Dose-dependent effects of meloxicam administration on cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 protein expression in intrauterine tissues and fetal tissues of a sheep model of preterm labor. *Reproductive Sciences* 2007; 14: 750-764.
17. Wang PH, Cheng MH, Lee WL. The choice of tocolytic drugs for preterm labor-comparison of COX-2 inhibitor and magnesium sulfate. *The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 2008; 34: 439-440.
18. Krause B, Möller S, Göretzlehner G, Ulrich U, Matuszewski F, Wodrig W, et al. Naloxone stimulation test in women with hypothalamic amenorrhea: a preliminary report. *Experimental and Clinical Endocrinology* 1992; 99(2): 113-5.
19. Falcone TW, Hurd W. *Clinical reproductive medicine and surgery*. Philadelphia: Mosby, Inc; 2007.
20. Krause B, Möller S, Göretzlehner G. Possibility of ovulation induction using naloxone in women with hypothalamic amenorrhea. *Zentralblatt für Gynäkologie* 1991; 113(22): 1221-1233.
21. Fruzzetti F, Bersi C, Parrini D, Ricci C, Genazzani AR. Effect of long-term naltrexone treatment on endocrine profile, clinical features, and insulin sensitivity in obese women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility* 2002; 77: 936-44.
22. Fulghesu AM, Ciampelli M, Guido M, Murgia F, Caruso A, Mancuso S, et al. Role of opioid tone in the pathophysiology of hyperinsulinemia and insulin resistance in polycystic ovarian disease. *Metabolism* 1998; 47: 158-162.
23. Wang Q, Zhou H, Gao H, Chen SH, Chu CH, Wilson B, et al. Naloxone inhibits immune cell function by suppressing superoxide production through a direct interaction with gp91phox subunit of NADPH oxidase. *Journal of Neuroinflammation* 2012; 9: 32.
24. Liu SL, Li YH, Shi GY, Chen YH, Huang CW, Hong JS, et al. A novel inhibitory effect of naloxone on macrophage activation and atherosclerosis formation in mice. *Journal of the American College of Cardiology* 2006; 48 (9): 1871-1879.
25. Espey LL. Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biology of Reproduction* 1994; 50: 233-238.

26. Azziz R. diagnosis of Polycystic Ovarian Syndrome: the Rotterdam criteria are premature. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2006; 91(3): 781-785.
27. Van Voorhis BJ, Dunn MS, Snyder GD, Weiner CP. Nitric oxide: an autocrine regulator of human granulose-luteal cell steroidogenesis. *Endocrinology* 1994; 135: 1799-1806.
28. Olson LM, Jones-Burton CM, Jablonka-Shariff A. Nitric oxide decreases estradiol synthesis of rat luteinized ovarian cells: possible role for nitric oxide in functional luteal regression. *Endocrinology* 1996; 137: 3531-3539.
29. Ellman C, Corbett JA, Misko TP, McDaniel M, Beckerman KP. Nitric oxide mediates interleukin-1-induced cellular cytotoxicity in the rat ovary. A potential role for nitric oxide in the ovulatory process. *The Journal of Clinical Investigation* 1993; 92(6): 3053-3056.
30. Guido M, Romualdi D, Lanzone A. Role of opioid antagonists in treatment of women with glucoregulation abnormalities. *Current Pharmaceutical Design* 2006; 12: 1001-1012.
31. Bayram F, Unluhizarci K, Kelestimur F. Potential utility of insulin sensitizers in the treatment of patients with polycystic ovary syndrome. *Treatments in Endocrinology* 2002; 1(1): 45-53.
32. Jakubowicz DJ, Iuorno MJ, Jakubowicz S, Roberts KA, Nestler JE. Effects of metformin on early pregnancy loss in the polycystic ovary syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002; 87(2): 524-9.
33. Szilágyi A, Szabó I. Endocrine characteristics of polycystic ovary syndrome (PCOS). *Indian Journal of Experimental Biology* 2003; 41(7): 694-700.
34. Speroff L, Marc A. *Clinical gynecologic endocrinology and infertility*. 8th ed. Philadelphia: Lippincott williams & Wilkins; 2011.
35. Zamiri MJ. *Reproduction physiology*. Shiraz: Haghshenas press; 2006.

Opposite effect of naloxone on infertility induced by nitric oxide system in an animal model of polycystic ovary

Fatemeh Lakzaei¹, Manizheh Karami^{1*}, Mohammad Reza Jalali Nadoushan², Fatemeh Hassani¹

1. Dept. Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran.
2. Dept. Pathology, School of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran.

E-mail: karami@shahed.ac.ir

Abstract

Background and Objective: Evidence exist that polycystic ovarian syndrome (PCOS) is responsible for a high percentage of women infertility during reproductive age. In this study, the correction of this problem by hyper-activation of nitric oxide (NO) system was studied in rats.

Materials and Methods: Female Wistar rats (weighing 200-250 g) were kept as virgin diestrous under standard conditions. One group of the rats was i.p. injected with L-arginine (50 mg/kg) through a period lasting nine days/once a day. Another group received naloxone (0.4 mg/kg), 30 min prior to i.p. injection of L-arginine during the experimental phase. The third group was injected with a single dose of naloxone (0.4 mg/kg, i.p.). The control group solely received saline (1 ml/kg, i.p.).

Results: Ovaries from L-arginine treated rats showed polycystic characteristics in comparison with the control; this feature was resolved in the naloxone treated groups. The endometrium due to L-arginine showed inflammation, however, its growth or folding were significant in naloxone treated rats.

Conclusion: Naloxone intervenes with the PCOS induced by over-activation of NOS. This research likely represents the case of infertility in the animal model of PCOS. The study may open a new gate towards the naloxone efficacy on infertility induced of PCOS.

Keywords: Polycystic ovarian syndrome, Fertility, L-arginine, Nitric oxide, Naloxone