

رابطه اندازه فولیکول‌های سالم و کیستیک تخمدان گاو با میزان نیتریک اکساید و استرادیول موجود در مایع فولیکولی

حمید رضا خدایی (M.Sc.)^۱، سید مهدی قریشی (M.Sc.)^۲، سید حسین حجازی (Ph.D.)^۴

۱- گروه فیزیولوژی دام، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد خوراسگان، گلپایگان، اصفهان، ایران.

۲- گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.

۳- دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران.

۴- گروه انگل و قارچ‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی اصفهان، اصفهان، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: نیتریک اکساید (NO) نوروترانسمیتری کوچک مولکول و تند اثر است که توسط آنزیم نیتریک اکساید سنتاز از ال-آرژنین ساخته می‌شود. مشخص شده است نیتریک اکساید در فرایندهای گوناگون تولید مثل اثرگذار است. سنتز هورمون‌های استروئیدی جنسی، افزایش ناگهانی LH در زمان تخمک‌گذاری، رشد فولیکول تخمدانی و تخمک‌گذاری متأثر از عمل نیتریک اکساید است. لذا هدف این مطالعه بررسی ارتباط تولید نیتریک اکساید و استرادیول (E_2)، در فولیکول‌های تخمدانی در حال رشد و فولیکول‌های کیستیک در گاو می‌باشد.

روش بررسی: برای این مطالعه دو آزمایش طراحی شد و غلظت استرادیول (E_2) و NO در سرم و مایع فولیکولی دو گروه اندازه‌گیری شد: در آزمایش اول مایع فولیکولی از تخمدان‌های ۳۰ گاو کشتارگاهی به دست آمد. فولیکولها به سه گروه کوچک (کمتر از ۵mm)، متوسط (۵-۱۰ mm) و بزرگ (بیشتر از ۱۰mm) طبقه‌بندی شد. برای آنالیز مناسب آماری تعداد ۳۰ فولیکول به طور تصادفی در هر گروه مورد بررسی قرار گرفت. نمونه خون با استفاده از سرنگ از سیاهرگ گردنی گاوها تهیه شد. غلظت NO در سرم و مایع فولیکولی به روش گریس و اندازه‌گیری E_2 به روش رادیوایمونواسی انجام شد. در آزمایش دوم تعداد ۱۲ گاو با عارضه کیست تخمدانی در فاز فولیکولی انتخاب و ۱۲ فولیکول کیستیک تخمدانی مناسب جهت آزمایش در نظر گرفته شد. NO و E_2 به روش فوق بررسی گردید. داده‌ها بوسیله برنامه نرم افزاری SAS با تشکیل جدول ANOVA و آزمون دانکن آنالیز گردید.

نتایج: نتایج نشان داد تولید NO و E_2 در فولیکول‌های بزرگ به صورت کاملاً معنی‌داری بیش از فولیکول‌های متوسط و کوچک است (۳۱۲ng/ml در مقابل ۲۴ng/ml) ($p < 0.01$). تفاوت کاملاً معنی‌داری بین غلظت نیتریک اکساید و نیترات (متابولیت‌های پایدار NO) در فولیکول‌های بزرگ و فولیکول‌های کیستیک وجود داشت به نحوی که سطح NO در فولیکول‌های کیستیک به شدت کاهش و E_2 افزایش داشت ($p < 0.01$).

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان می‌دهد NO می‌تواند از طریق اعمال اثرات پاراکرین، به تنهایی و یا همراه با سایر فاکتورهای بیولوژیک، نقش مهمی در کنترل تکامل، توسعه فولیکول‌های تخمدانی و همچنین بیماری کیستیک تخمدانی در گاو داشته باشد. همچنین به نظر می‌رسد NO آثار خود را از طریق مهار استروئیدسازی تخمدانی انجام می‌دهد.

کلید واژگان: نیتریک اکساید، استرادیول، فولیکول کیستیک، گاو، اووژنز، بلوغ تخمک، مایع فولیکولی.

مسئول مکاتبه: حمید رضا خدایی، گروه فیزیولوژی دام، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان، گلپایگان، ایران.

پست الکترونیکی: khodaei@khuisf.ac.ir

زمینه و هدف

نیتریک اکساید یک رادیکال آزاد گازی شکل با اثر کوتاه مدت است که از ال- آرژنین بوجود می‌آید و نظر بر آن است که میانجی اصلی در بسیاری از اعمال طبیعی دستگاه‌های قلبی- عروقی، تولید مثل، دستگاه گوارش و سیستم ایمنی باشد (۱). براساس نتایج مطالعات مختلف، تخمدانها قادر به سنتز نیتریک اکساید هستند (۲). احتمالاً این ماده در استروئیدسازی تخمدان، تخمک‌گذاری و از بین رفتن جسم زرد نقش داشته باشد (۳-۴).

ایزوآنزیم‌های سازنده نیتریک اکساید در بخش‌های مختلف تخمدان فعالند؛ که این فعالیت بوسیله گونادوتروپینها کنترل می‌شود (۵). به جزء تخمدان آنزیم‌های مولد نیتریک اکساید را در کل محور هیپوتالاموس-هیپوفیز و گنادها می‌توان یافت (۱). نیتریک اکساید در تخمدانها از گونادوتروپینها اثر می‌پذیرد؛ اما در هیپوتالاموس بر آنها اثر می‌گذارد (۳). محل نرون‌های تولیدکننده نیتریک اکساید در نزدیکی نورون‌های GnRH در هیپوتالاموس است (۵). سدیم نیتروپروساید به عنوان یک آزادکننده نیتریک اکساید در محیط باعث آزادسازی GnRH از هیپوتالاموس می‌شود (۵). نقش نیتریک اکساید در کنترل پیش از تخمک‌گذاری ضربان‌های^۱ GnRH و افزایش ناگهانی LH مطرح شده است. خاصیت گشادکنندگی عروقی نیتریک اکساید مدت‌هاست که شناخته شده است؛ به نظر می‌رسد نیتریک اکساید بر عروق تخمدان نیز اثر می‌گذارد (۶). نیتریک اکساید تنها در شرایط طبیعی تخمدان بر آن اثر نمی‌گذارد. سندرم تخمدان پلی‌کیستیک و فعل نشدن^۲ (عدم تخمک‌گذاری در حیوان ماده) با دلایل نامعلوم در حیوانات احتمالاً با آثار موضعی نیتریک اکساید در ارتباط است (۶،۷). مطالعاتی وجود دارد که بر نقش

نیتریک اکساید بر استروئیدسازی تخمدان تأکید دارند. در چرخه جنسی حیوانات (چرخه فحلی) تغییرات زیادی در تخمدان و فعالیت هورمونی آنها دیده می‌شود. فعالیت نیتریک اکساید در استروئیدسازی جسم زرد مهم است (۲). نیتریک اکساید در شرایط کشت سلولی فعالیت سیستم آنزیمی آروماتاز را مهار کرده و به دنبال آن تولید استرادیول را کاهش می‌دهد (۸). ایزوآنزیم‌های سنتزکننده نیتریک اکساید (NOS) در طی تکامل فولیکول‌های تخمدانی خوک مشاهده شده است (۹).

در انسان نیتریک اکساید بر استروئیدسازی تخمدانی اثر بازدارنده دارد و احتمالاً این اثر را به طور مستقیم بر سلول‌های ترشحی اعمال می‌کند (۱).

با توجه به اهمیت نقش نیتریک اکساید در استروئیدسازی تخمدان، تحقیقی مشتمل بر دو آزمون پایه‌ریزی شد تا در آن ارتباط و همبستگی بین سطح نیتریک اکساید و استرادیول (E₂) در چرخه فحلی و نقش آن در مراحل مختلف فولیکول‌نوزن در گاوهای شیری نژاد هلشتاین^۳ بررسی شود.

گاوهای هلشتاین معروف‌ترین نژاد تولیدکننده شیر می‌باشند که در صورت عدم تولید شیر و گوساله حذف شده تلقی می‌شوند و گرنه هزینه اقتصادی زیادی را به دنبال دارد. از طرفی گاوهای هلشتاین نیمفومانیک^۴ (گاوهایی که دائماً تمایل به جفتگیری دارند) که دارای کیست‌های تخمدانی هستند، از معضلات دامپروری محسوب می‌شوند و تحقیق در خصوص علل کیست‌های تخمدانی گاو واجد اهمیت زیادی است. هدف از اجرای تحقیق حاضر، بررسی ارتباط بین اندازه فولیکول و غلظت نیتریک اکساید موجود در مایع فولیکولی، بررسی تغییرات غلظت نیتریک اکساید و استرادیول در مراحل مختلف رشد فولیکول سالم و مقایسه آنها با فولیکول

3- Holstein
4- Nymphomaniac

1- Pulse
2- Anestrous

کیستیک تخمدان گاو بود.

روش بررسی

این مطالعه روی مایع فولیکولی حاصل از دو گروه از گاوها انجام شد. در مرحله اول از بین گاوهای کشتارگاهی هلشتاین، ۳۰ گاو دارای شرایط لازم با توجه به مورفولوژی تخمدان انتخاب شدند. تعداد تخمدانها ۶۰ عدد بود. اندازه فولیکول به عنوان تیمار^۱ در نظر گرفته شد و اثر آنها بر غلظت نیتریک اکساید و استرادیول بررسی شد. فولیکولهای تخمدانی بوسیله کولیس، به ۳ گروه تقسیم شدند:

- تیمار ۱: فولیکولهای کوچک (تا ۵mm)

- تیمار ۲: فولیکولهای متوسط (۵-۱۰mm)

- تیمار ۳: فولیکولهای بزرگ (بیش از ۱۰mm)

از مجموع ۶۰ تخمدان، ۹۰ فولیکول انتخاب شد و برای هر تیمار ۳۰ فولیکول در نظر گرفته شد. مایع داخل فولیکولی بوسیله سرنگهای انسولین آسپیره شد و تا زمان سنجش پارامترها در هر گروه، در دمای ۲۰°C منجمد شدند.

نیتریک اکساید گازی بسیار ناپایدار است که سریعاً به متابولیت‌های پایدار خود NO₂, NO₃ تبدیل می‌شود. اساس اندازه‌گیری براساس استفاده از معرف گریس^۲ بود (۱۰). این معرف مخلوطی است از (نفتالین دی هیدروکلراید ۰/۱٪، سولفانیلامید ۱٪ و اسید فسفریک ۲/۵٪) که از شرکت Sigma تهیه شد. برای کاهش اثرات متقابل پروتئین بالا در مایع فولیکولی از محلول سولفات روی به میزان ۱۰ μl به ازای هر نمونه استفاده شد. مقدار ۵۰ μl از مایع فولیکولی حاصل با ۵۰ μl از محلول گریس در چاهک‌های پلیت الیزا مخلوط گردید و ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد و سپس توسط ELISA- Reader (Statfax303, USA)؛ جذب نوری آن در طول موج ۵۴۰nm با طول موج مرجع ۶۳۰nm قرائت شد.

معرف گریس قادر به اندازه‌گیری NO₃ (نیترات) نیست. به همین دلیل از گرانونل‌های عنصر کادمیوم (Cd) که توانایی احیای نیترات را دارد، استفاده شد. به ازای هر نمونه، ۰/۰۰۵ gr کادمیوم شسته شده با آب مقطر؛ ۱۰ μl HCl (۰/۱ مولار) و ۱۰ μl NH₄OH (۰/۱ مولار) به چاهکها اضافه شد.

به منظور کالیبره کردن دستگاه، از NaNO₂ استفاده گردید. به طوریکه در ابتدا ۴ غلظت استاندارد از آن تهیه (۵ μM، ۱۰ μM، ۲۵ μM، ۵۰ μM) و منحنی استاندارد توسط دستگاه رسم شد. منحنی به دست آمده به صورت خط راست و قابل پذیرش بود. مجموع NO₂+NO₃ شاخصی برای غلظت NO در نظر گرفته شد (۱۰). استرادیول موجود در مایع فولیکولی تخمدان و سرم گاوها، با روش رادیوایمونواسی (شرکت کاوشیار، ایران) اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری نیتریک اکساید و استرادیول سرم نیز انجام گردید.

در مرحله دوم تعداد ۱۲ گاو هلشتاین که به تشخیص دامپزشک دچار کیست تخمدانی در فاز فولیکولی بودند و از نظر تاریخچه رفتاری حالت نیمفومانیک داشتند و بنابراین کشتارگاهی بودند، انتخاب شدند. براساس تعریف، تخمدان‌هایی انتخاب شدند که دارای فولیکول بزرگتر از ۲/۵cm بودند (۱۱). تعداد فولیکول انتخاب شده (تکرار) ۱۲ عدد بود. مایع فولیکولها آسپیره و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۲۰°C نگهداری شد. مایع فولیکولی از نظر غلظت NO₂, NO₃, E₂ مورد بررسی قرار گرفت. اندازه‌گیری نیتریک اکساید و استرادیول در سرم نیز انجام شد.

یافته‌های حاصل بوسیله برنامه نرم افزاری SAS 98 آنالیز شد (۱۲). جدول ANOVA تشکیل و تفاوت بین میانگینها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن بررسی شد. جهت مقایسه فولیکول‌های کیستیک با تیمارهای آزمایش اول (مقایسه بین آزمایش اول و دوم)، فولیکول‌های کیستیک به عنوان تیمار چهارم در نظر

1- Treatment

2- Greiss

جدول ۱- مقایسه میزان متابولیت‌های نیتریک اکساید و استرادیول در فولیکول‌های با اندازه مختلف و فولیکول‌های کیستیک

پارامتر	نوع فولیکول		
	کوچک	متوسط	بزرگ
NO ₂ (nmol/L)	۲/۵۳±۰/۴۹ ^a	۳/۰۵±۰/۳۰۵ ^a	۵/۱۲±۰/۵۱ ^b
NO ₃ (nmol/L)	۱۸/۲۴±۰/۹۱ ^a	۱۹/۹۱±۱/۰۳ ^a	۲۶/۷۷±۲/۳ ^b
E ₂ (ng/ml)	۷/۶۶±۲/۹۲ ^a	۲۴/۰۳±۶/۰۱ ^b	۳۱۲±۱۶/۲ ^c

حروف مشترک در هر ردیف نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار است.

محسوسی بیشتر بود ($p < 0.01$).

همبستگی کاملاً معنی‌داری میان E₂ سرم و E₂ مایع فولیکول‌های بزرگ به دست آمد ($r = 0.72$, $p < 0.01$). این در حالی بود که همبستگی میان E₂ سرم و E₂ مایع فولیکولی (با مقیاس متوسط و کوچک) به ترتیب $r = 0.45$, $r = 0.58$ به دست آمد. میانگین غلظت E₂ در مایعات فولیکول‌های کیستیک نسبت به غلظت E₂ سرم بسیار بالاتر بود؛ اما با میانگین غلظت E₂ سرم همبستگی مستقیم و برابر ($r = 0.79$) داشت.

بحث

مطالعه حاضر نشان داد اثر تیمار (اندازه فولیکول) بر غلظت پارامترهای اندازه‌گیری شده مؤثر است؛ به نحویکه با افزایش اندازه فولیکول بر میانگین غلظت E₂ افزوده شد. آزمایش دوم نیز نشان داد فولیکول کیستیک به عنوان یک تیمار بر پارامترهای اندازه‌گیری شده اثر می‌گذارد؛ با این تفاوت که بر میانگین غلظت E₂ در مایع فولیکولی و سرم افزوده، اما میانگین غلظت متابولیت‌های پایدار NO نه تنها کاهش یافت، بلکه از نظر عددی از تیمار اول (فولیکول‌های کوچک) نیز کمتر بود.

رابطه NO و هورمون‌های استروئیدی تخمدانی و همچنین اثر NO بر فیزیولوژی تخمدان مدت زیادی نیست که مورد بحث قرار گرفته است. تغییرات دوره‌ای NO در چرخه جنسی پرستانداران ماده، بارها مورد تأکید بوده است (۱). اما دشواری اندازه‌گیری NO و مشکلات دیگر، بحث را به درازا کشانده است. برخی از

گرفته شد و سپس با استفاده از طرح آماری کاملاً تصادفی نامتعادل که توانایی مقایسه بین تکرارهای نامشابه را دارد، به کمک بسته نرم افزاری SAS مقایسه بین میانگینها انجام شد. همچنین همبستگی بین پارامترها تعیین گردید.

نتایج

اندازه‌گیری مایع فولیکولی (کوچک، متوسط و بزرگ) نشان داد که با افزایش اندازه فولیکول، میانگین غلظت E₂ افزایش می‌یابد، (از ۷/۵ ng/ml به ۳۱۲ ng/ml) و این تغییر غلظت E₂ در فولیکولها با یکدیگر تفاوت معنی‌داری داشت ($p < 0.01$). نتایج آزمایش دوم نشان داد مقدار E₂ موجود در فولیکول‌های کیستیک به طور کاملاً معنی‌داری نسبت به سایر فولیکولها بیشتر است (جدول ۱).

در این مطالعه مشخص شد که با افزایش اندازه فولیکول، غلظت متابولیت‌های پایدار نیتریک اکساید NO₂, NO₃ نیز افزایش می‌یابد؛ به نحویکه میزان NO₂ و NO₃ در فولیکول‌های بزرگ به طور کاملاً معنی‌داری از فولیکول‌های کوچک و متوسط بیشتر بود ($p < 0.01$). غلظت متابولیت‌های NO در فولیکول‌های کوچک در مقایسه با غلظت موجود در فولیکول‌های متوسط از نظر عددی کمتر بود؛ اما از نظر آماری معنی‌دار نبود (جدول ۱). آزمایش دوم نشان داد، غلظت متابولیت‌های پایدار NO در فولیکول‌های کیستیک نسبت به فولیکول‌های بزرگ به طور کاملاً معنی‌داری کاهش می‌یابد و به حداقل میزان خود می‌رسد ($p < 0.01$). این کاهش در حدی بود که میانگین غلظت متابولیت‌های پایدار NO در فولیکول‌های کیستیک از فولیکول‌های کوچک نیز کمتر بود (جدول ۱). میانگین غلظت سرمی E₂ نیز در آن دسته از گاوهایی که دارای فولیکول گراف بودند (۸۲±۸ ng/ml)، نسبت به آنهایی که فاقد آن بودند (۴۲±۴ ng/ml)، تفاوت معنی‌داری داشت و به‌طور

محققان معتقدند که هورمون‌های تخمدانی در شرایط فیزیولوژیک طبیعی تخمدان احتمالاً تنظیم کننده آنزیم‌های سازنده NO هستند (۵،۱۳). نتایج آزمایش حاضر نشان داد که حداقل در شرایط تخمدان کیستیک گاو چنین نیست. از طرفی به نظر می‌رسد بین سیستم عصبی و اثر نیتریک اکساید بر استروئیدسازی تخمدانی حتی پیش از بلوغ نیز رابطه معکوس وجود داشته باشد (۳). گروهی از محققین نیز بر این باورند که NO به صورت موضعی یا پاراکرین بر تولید E₂ مؤثر است و آنرا کاهش می‌دهد (۸). از مطالعه انجام شده می‌توان حدس زد که NO (به تنهایی یا با کمک سایر فاکتورهای موضعی) پس از رسیدن به غلظتی خاص در فولیکول، اثری منفی بر تولید E₂ می‌گذارد. مکانیسم‌های متعددی را می‌توان برای این موضوع پیشنهاد کرد. NO توانایی اتصال به متالوپروتئینها و تاثیر بر واکنش‌های مربوط به آنها را دارد (۱۴).

تولید E₂ خود ناشی از فعالیت آنزیم آروماتاز است (۱۱) که NO توانایی مهار فعالیت آن را دارد (۸). مطالعات نشان می‌دهند که مهار NO باعث ایجاد یک فعلی دائم در موش‌های صحرایی می‌شود (۷) و این خود اثر مهاری NO را در زمانی از چرخه تخمدانی به نمایش می‌گذارد. مطالعه حاضر نیز نشان داد در فولیکول‌های کیستیک که گاوها داری علامت بالینی فعلی دائم بودند NO به طور معنی‌داری کم بود و اثر مهاری آن بر E₂ دیده نمی‌شد. اثر مهاری NO بر E₂ احتمالاً تنها در هنگام تخمک‌گذاری یا اندکی پس از آن وجود دارد، که موید اثر پذیری NO از افزایش ناگهانی LH در این زمان است (۷،۱۵). البته نباید فراموش کرد که تخمک‌گذاری یک فرایند التهابی است که در آن علاوه بر LH، سایتوکینها و پروستاگلاندینها نیز دخیلند. NO

بر سلول‌های گرانولوزا اثر می‌گذارد (۱۶). گزارش شده است که NO این اثر را از طریق لپتین اعمال می‌کند. لپتین خود بر IGF-1 اثر می‌گذارد که آن نیز در تولید E₂ نقش دارد (۱۷). به نظر می‌رسد که افزایش NO در زمان تخمک‌گذاری از طریق افزایش PGI₂ به تخمک‌گذاری کمک می‌کند (۲،۸). تمامی موارد مطرح شده از اثر موضعی NO بر تخمک‌گذاری دلالت دارد. مقدار زیاد E₂ و کاهش معنی‌دار NO در فولیکول‌های کیستیک این ایده را به ذهن متبادر می‌سازد که شاید با افزایش سیستمیک یا موضعی NO بتوان عارضه گاوهای نیمفومانیک را تقلیل داد. این عارضه در حال حاضر ضررهای اقتصادی جبران‌ناپذیری را بر پیکره دامپروری وارد می‌کند و شیوع آن نزدیک به ۴٪ است (۱۱). عارضه تخمدان پلی‌کیستیک در انسان نیز دارای ابعاد درمانی و اجتماعی فراوان است، از این رو بررسی علل اثرگذار موضعی در این زمینه ضروری به نظر می‌رسد.

در پایان تحقیق بر روی مهارکننده‌ها و آزادکننده‌های نیتریک اکساید و اثرات موضعی آنها بر درمان فولیکول‌های کیستیک پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

گروه تحقیق بر خود لازم می‌دانند از همکاری‌های بی‌دریغ آزمایشگاه دکتر جلایر اصفهان، بیمارستان نور و حضرت علی اصغر (ع) اصفهان که در تهیه امکانات و مواد آزمایشی و انجام آزمایشها ما را یاری کردند تشکر نمایند. همچنین از دست اندرکاران دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان (اصفهان) که هزینه‌های طرح را تقبل نمودند قدردانی می‌شود.

References

- 1- Dixit VD, Parvizi N. Nitric oxide and the control of reproduction. Anim Reprod Sci. 2001;65:1-16.

- 2- Marinoni E, Iorio R, Villaccio B, Letizia C, Aragona C, Schimberni M, Cosmi EV. Follicular fluid adrenomedullin concentrations in spontaneous and stimulated cycles: relationship to ovarian function and endothelin-1 and nitric oxide. *Regul Peptides*. 2002;107:125-8.
- 3- Delgado SM, Zulema S, Dominguez NS, Casais M, Aguado L, Rastrilla A. Effect of the relation between neural cholinergic action and nitric oxide on ovarian steroidogenesis in prepubertal rats. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004;91:139-45.
- 4- Tognetti T, Estevez A, Luchetti CG, Sander V, Franchi AM, Motta AB. Relationship between endothelin 1 and nitric oxide system in the corpus luteum regression. *Prostag Leukotr Ess*. 2003;69:359-64.
- 5- Honaramooz A, Cook SJ, Beard AP, Bartlewski PM, Rowling NC. Nitric oxide regulation of gonadotropin secretion in prepubertal heifers. *J Neuroendocrinol*. 1999;11:667-76.
- 6- Cussons AJ, Stuckey BGA, Watts GF. Cardiovascular disease in the polycystic ovary syndrome: New insights and perspectives. *Atherosclerosis*. 2006;185:227-39.
- 7- Jablonka-Shariff A, Ravi S, Beltsos A, Murphy LL, Olson LM. Abnormal estrous cyclicity after disruption of endothelial and inducible nitric oxide synthase in mice. *Biol Reprod*. 1999;61:171-7.
- 8- Weems YS, Lennon E, Uchima T, Raney A, Goto K, Ong A, Zaleski H, Weems CW. Is nitric oxide luteolytic or antiluteolytic?. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2005;8:129-38.
- 9- Kim HC, Moon M, Ahn M, Lee Y, Kim H, Kim S, and et al. Expression of nitric oxide synthase isoforms in the porcine ovary during follicular development. *J Vet Sci*. 2005;6:97-101.
- 10- Schulz K, Kerber S, Klem M. Re-evaluation of the Griess method for determining NO/NO₂- in aqueous and protein- containing samples. *Nitric Oxide*. 1999;3: 225-34.
- ۱۱- ضمیری محمد جواد. تولیدمثل در گاو. چاپ دوم، انتشارات دانشگاه شیراز؛ (۱۳۷۴). صفحه: ۴۴۸.
- 12- SAS Institute. 1998 SAS/STAT users Guide. Version. 6.03. SAS Institute Inc, Cary, Nc.
- 13- Jablonka-Shariff A, Olson LM. Hormonal regulation of nitric oxide syntheses and their cell specific expression during follicular development in the rat ovary. *Endocrinology*. 1997;138:460-8.
- 14- Grazul-Bilska AT, Navanukraw L, Johnson ML, Arnold DA, Reynolds LP, Redmer DA. Expression of endothelial nitric oxide synthase in the ovine ovary throughout the estrous cycle. *Reproduction*. 2006;4: 579-87.
- 15- Nemade RV, Carrette O, Larsen J, Markoff E. Involvement of nitric oxide and the ovarian blood follicle barrier in murine follicular cyst development. *Fertil Steril*. 2002;78:1301-08.
- 16- Kim KH, Kwak JY, Shin BS, Choi YM, Oh ST, Lee KS. Nitric oxide inhibition of the proliferation of ovarian endometriotic stromal cells in vitro. *J Reprod Med*. 2005;50:707-14.
- 17- Huang HF, Wang B, Yang XF, Luo Q, Sheng JZ. Nitric oxide mediates inhibitory effect of leptin on insulin-like growth factor I augmentation of 17beta-estradiol production in human granulosa cells. *Biol Reprod*. 2005;72:102-6.