

DUŠIKOV OKSID – VAŽNA SIGNALNA MOLEKULA U NORMALNOJ I PATOLOŠKOJ TRUDNOĆI

NITRIC OXIDE – AN IMPORTANT SIGNALLING MOLECULE IN NORMAL AND PATHOLOGICAL PREGNANCY

GORANKA HUDIČEK-MARTINČIĆ, MARIJA KUŠAN-JUKIĆ, AIDA SALIHAGIĆ-KADIĆ*

Deskriptori: Dušikov oksid – fiziologija, metabolizam; Trudnoća – metabolizam; Trudnoća, komplikacije – metabolizam; Dušikov oksid sintetaza – metabolizam

Sažetak. Brojna istraživanja upućuju na različite uloge dušikova oksida (NO) u važnim procesima kardiovaskularnog, živčanog, probavnog, urogenitalnog te imunskog sustava. U ovom preglednom radu prikazani su rezultati istraživanja provedenih na životinjskim modelima odnosno rezultati kliničkih istraživanja o djelovanju NO-a i njegovih metabolita tijekom trudnoće i porođaja. Za vrijeme trudnoće NO je jedan od važnih čimbenika u relaksaciji mišića maternice te sudjeluje i u kontroli protoka krvi kroz maternicu i posteljicu. Promjene u stvaranju NO-a na kraju trudnoće također bi mogle biti važne u otpočinjanju porođaja i sazrijevanju vrata maternice. Naši preliminarni rezultati, kao i rezultati drugih istraživača, upućuju na to da je stvaranje NO-a u posteljici povećano u nekim patološkim stanjima, kao što su zastoj u rastu fetusa, preeklampsija, prijevremeni porođaj. U ovom radu također su prikazani terapijski učinci donora NO-a ili inhibitora sinteze NO-a u patološkim trudnoćama.

Descriptors: Nitric oxide – physiology, metabolism; Pregnancy – metabolism; Pregnancy, complications – metabolism; Nitric-oxide synthetase – metabolism

Summary. The numerous studies on the multifunctional nature of the nitric oxide (NO) have suggested the wide variety of functions mediated by this molecule in vital processes in cardiovascular, nervous, gastrointestinal, urogenital system and during immunological reactions. In this review we present the results of experiments carried out on animal models, as well as the results of clinical studies considering the role of NO and its metabolites during pregnancy and delivery. During pregnancy NO is one of the most important relaxing factors of myometrium, and also no less important in the control of blood flow in uterus and placenta. Changes in NO production at the end of pregnancy could be important for the beginning of delivery and cervical maturation. Also it seems, and our preliminary results as well as results of other investigators suggest, that higher levels of NO are produced during some pathological conditions in pregnant women, e.g. IUGR, preeclampsia, preterm delivery. The implications of NO donors or inhibitors of NO synthesis used in therapy of previously mentioned conditions will be also discussed.

Liječ Vjesn 2004;126:80–85

Prošlo je nešto više od 10 godina od kada je tvar, poznata kao endotelni čimbenik relaksacije (prema *engl.* endothelium derived relaxing factor, EDRF) identificirana kao jednostavna molekula anorganskog plina – dušikova monoksida (NO). Prvi je put otkriveno da jedan plin može biti signalna molekula u organizmu.¹ Prije tog otkrića NO je smatran tek popratnim spojem nastalim pri izgaranju dušika, onečišćivačem atmosfere, sastavnim dijelom smoga, kiselih kiša i ozonskih rupa. A prijenosom signala s pomoću plina koji stvara jedna stanica, i pritom se regulira funkcija drugih stanica otvorena su potpuno nova područja u proučavanju prijenosa signala u biološkim sustavima.² Nobelovu nagradu za medicinu dobila su 1998. godine tri znanstvenika, R. Furchgott, F. Murad i L. Ignarro, upravo zbog otkrića djelovanja NO-a kao signalne molekule u kardiovaskularnom sustavu.^{3,4} Istraživanja različitih učinaka NO-a u organizmu od tada su vrlo intenzivna. Pokazano je da NO ima ključnu ulogu u brojnim fiziološkim, ali i patološkim procesima. Kontinuirano stvaranje NO-a u endotelnim stanicama krvnih žila dovodi do relaksacije glatkih mišićnih stanica stijenke krvnih žila i vazodilatacije te se NO smatra jednim od najvažnijih regulatora tonusa krvnih žila.⁵ Također je pokazano da NO inhibira agregaciju trombocita te i na taj način sudjeluje u regulaciji protoka krvi.⁶ Zatim, dušikov monoksid je važan neurotransmiter u perifernom živčanom sustavu. Nalazimo ga u živcima gastrointestinalnog i urogenitalnog sustava gdje sudjeluje u regulaciji motiliteta, a jedan je i od glavnih medijatora penilne erekcije. U središnjem živčanom sustavu NO također ima ulogu neurotransmitera te sudjeluje u procesima pamćenja i regulacije boli.² Aktivacija imunskog sustava, posebno makrofaga, za posljedicu ima stvaranje velikih količina NO-a, nužnog za obranu organizma od različitih patoge-

nih uzročnika. Međutim, neki istraživači smatraju da pretjerana stimulacija imunskog sustava i stvaranje velikih količina NO-a mogu biti uzrokom teških oksidativnih oštećenja organizma, hipotenzije i šoka.⁷ Također potrebno je istaknuti središnju ulogu dušikova oksida u septičkom šoku, a ne treba zaboraviti ni ulogu NO-a odnosno njegovih metabolita kao slobodnih radikala.^{8,9}

U trudnoći je NO važan za inhibiciju kontraktilnosti mišića maternice, regulaciju protoka posteljice, kao i protoka krvi fetusa. Sve se više istražuje njegova uloga u pojedinim razdobljima trudnoće te se zbivanja u različitim patološkim stanjima u trudnoći povezuju uz poremećaje stvaranja NO-a. Ovaj rad pregled je novijih spoznaja o ulozi NO-a tijekom normalne i patološke trudnoće, uz osvrt na mogućnosti primjene tih spoznaja u terapiji pojedinih patoloških stanja u trudnoći.²

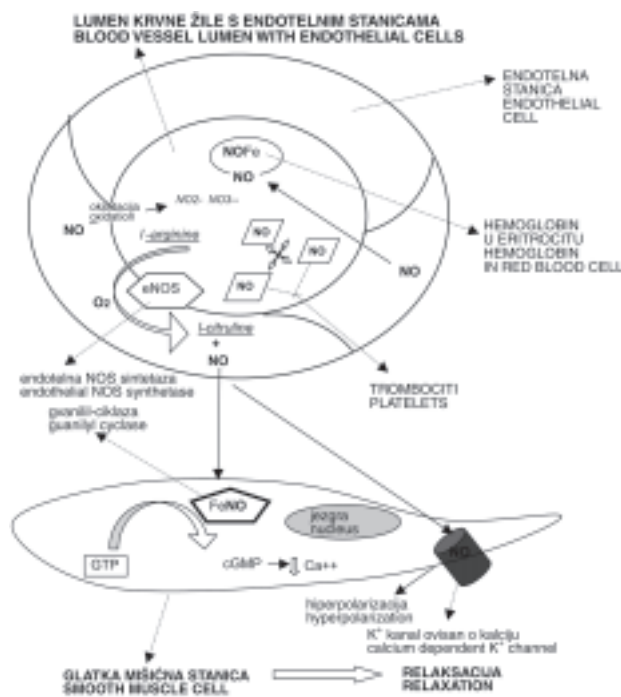
Biokemijske karakteristike, put nastanka i učinci NO-a

Dušikov monoksid nestabilan je plin bez boje i mirisa. Slobodan je radikal (ima jedan nesparen elektron) te vrlo brzo reagira s drugim slobodnim radikalima. U biološkom tkivu njegovo poluvrijeme života iznosi oko 5 sekunda, do maksimalno 30 sekunda. Djelovanje NO-a očituje se u stanici u kojoj

* Poliklinika Sunce, Zagreb (Goranka Hudiček-Martinčić, dr. med.), Zavod za fiziologiju, Medicinski fakultet, Hrvatski institut za istraživanje mozga (Marija Kušan-Jukić, dr. med.; Aida Salihagić-Kadić, dr. med.)

Adresa za dopisivanje: Dr. M. Kušan-Jukić, Zavod za fiziologiju, Medicinski fakultet, Šalata 3, 10000 Zagreb

Primljeno 17. srpnja 2002., prihvaćeno 12. veljače 2004.



Slika 1. Biokemijski mehanizam nastanka dušikova oksida u endotelnoj stanici i njegovo djelovanje na glatku mišićnu stanicu stijenke krvne žile (NOFe – vezanje dušikova oksida u ciljnoj molekuli, hemoglobinu odnosno gvanilil-ciklazi za atom željeza; GTP – gvanosin tri fosfat; cGMP – ciklički gvanozin monofosfat)

Figure 1. Biochemical mechanism of NO synthesis in endothelial cell and action on the smooth muscle cell of the vessel (NOFe – binding of NO to the ferric atom in the target molecules, haemoglobin or guanylyl-cyclase; GTP – guanosine triphosphate; cGMP – cyclic guanosine monophosphate)

nastaje, kao i u susjednim stanicama jer je izrazito lipofilan te brzo difundira kroz staničnu membranu.⁵

Glavno mjesto kontinuirane sinteze NO-a je endotelna stanica krvnih žila – arterija i arteriola (slika 1). Čini se da ne postoji bazalna produkcija NO-a u venama.¹⁰ Glavni fiziološki poticaj za sintezu NO-a u endotelnim stanicama jesu sile smicanja (prema *engl.* shear stress) koje nastaju zbog protoka krvi. Sintetiziraju ga još trombociti i aktivirani makrofazi.¹¹ Endogeni NO nastaje oksidacijom aminokiseline L-arginina u L-citrulin. Enzim koji katalizira pretvorbu L-arginina u L-citrulin je NO sintetaza (NOS) koja u organizmu postoji u tri izoforme. Dvije izoforme su tzv. konstitutivne NOS ili cNOS:

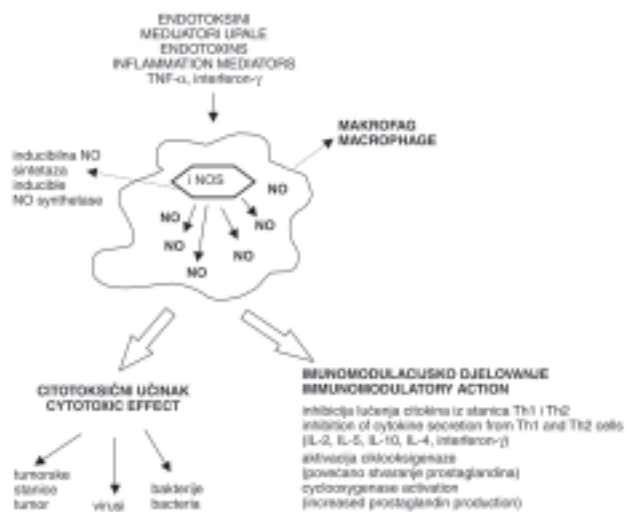
1. *endotelna NOS ili eNOS* (prije poznata kao tip III NOS, NOS-3) primarno je smještena na membrani endotelnih stanica krvnih žila te u trombocitima i nekim živčanim stanicama mozga. Gen za sintezu tog enzima nalazi se na 7. kromosomu.^{11,12}
2. *neuronalna NOS ili nNOS* (prije poznata kao tip I NOS, NOS-1, bNOS) primarno je smještena u citosolu živčanih stanica središnjeg i perifernoga živčanog sustava. Gen za sintezu nNOS nalazi se na 12. kromosomu. Prisutna je i u citosolu epitelnih stanica bronha i traheje, kao i u skeletnom mišiću.¹²

Navedene sintetaze normalno su prisutne u stanicama i proizvode NO kontinuirano u malim količinama (nmol). Njihova aktivnost ovisi samo o promjeni koncentracije Ca^{++} . Povećanje unutarstanične koncentracije Ca^{++} , kao odgovor na stimulaciju određenim agonistima (na primjer, acetilkolinom, bradikininom, endotelinom 1), odnosno djelovanje sile smicanja protoka krvi, trenutno potiču stvaranje NO-a.

Treća izoforma enzima je *inducibilna NOS ili iNOS* (prije poznata kao tip II NOS, NOS-2, macNOS, hepNOS), a njezina je aktivnost neovisna o promjenama unutarstanične koncentracije Ca^{++} . Stanice koje sintetiziraju iNOS su makrofazi i leukociti, aktivirani vanjskim čimbenicima, kao što su endotoksini bakterija, medijatori upale i različiti citokini (slika 2). Gen za sintezu tog enzima nalazi se na 17. kromosomu, a dokazano je da navedeni vanjski čimbenici potiču njegovu ekspresiju. Tako inducirani enzim u citosolu stanica proizvodi velike količine NO-a (μmol) koje mogu djelovati citotoksično, primjerice, na bakterije, viruse, stanice tumora. Treba istaknuti da i konstitutivne NOS mogu pojačano djelovati u određenim stanjima, kao što je dugotrajno vježbanje ili trudnoća.¹¹

U ciljnoj stanici mjesto vezanja NO-a je Fe^{++} u hem-skupini enzima, gvanilil-ciklaze, koji se nalazi u citosolu stanica. Vezanjem NO-a na Fe^{++} dolazi do aktivacije tog enzima i stvaranja 50–200 puta većih količina cikličkoga gvanozin-monofosfata (cGMP). Ciklički GMP je drugi glasnik u stanici koji potiče kaskadu biokemijskih reakcija čiji je krajnji rezultat smanjenje ulaska iona kalcija u stanicu. Tako, na primjer, na staničnoj se razini zbiva relaksacija glatke mišićne stanice krvnih žila te vazodilatacija¹³ (slika 1).

Koncentracija NO u krvi posljedica je ravnoteže između stvaranja NO-a s pomoću NO sintetaza i vezanja NO-a na hemoglobin i trole u procesu nitrozacije te pretvorbe u nitrite (NO_2^-) i nitrate (NO_3^-) (slika 1). Difuzijom u lumen krvne žile NO se brzo veže na Fe^{++} u oksihemoglobinu i biva oksidiran dajući nitrate (koji se odstranjuju iz organizma urinom, s vremenom poluzivota od 5 do 8 sati) i methemoglobin.² Neki autori osporavaju važnost te reakcije *in vivo*, iako ne uspijevaju objasniti podrijetlo nitrata u plazmi sisavaca.^{14,15} Važno je naglasiti da NO ima 200 000 puta veći afinitet za hemoglobin od afiniteta O_2 . U vodenoj otopini (na primjer, krvnoj plazmi) u aerobnim uvjetima NO brzo oksidira stvarajući nitrite i nitrate. To su stabilni metaboliti NO-a u plazmi, tkivima i urinu te se određivanjem njihove koncentracije može posredno zaključivati o intenzitetu endogene sinteze NO-a u *in vivo* te u *in vitro* eksperimentalnim sustavima.¹⁶ Međutim, upotreba koncentracije nitrata u urinu, za procjenu sinteze NO-a *in vivo*,



Slika 2. Najvažniji čimbenici koji potiču sintezu dušikova oksida u makrofagu te njegov citotoksični učinak i imunomodulacijsko djelovanje (TNF α – čimbenik tumorske nekroze α ; Th-1 – pomagački limfociti Th-1 odgovora; Th-2 – pomagački limfociti Th-2 odgovora; IL – interleukin)

nije sasvim pouzdana budući da koncentracija nitrata u urinu ovisi o inhalaciji NO-a iz zraka i prehrani bogatoj nitritima (povrće, meso).¹⁷

Aktivnost NO-a je određena, kao što smo već rekli, ravnotežom između njegove sinteze i razgradnje. U sisavaca su pokazane značajne razlike između homeostatske i toksične funkcije NO-a, odnosno uvjeta u kojima se NO stvara u malim i velikim količinama. Općenito, može se reći da u fiziološkim i patofiziološkim uvjetima NO ima zaštitnu ulogu u organizmu, premda u određenim okolnostima stvaranje NO-a može biti i štetno.^{7,18}

NO i trudnoća

U regulaciji kontraktilnosti mišića maternice za vrijeme trudnoće i porođaja važnu ulogu imaju fiziološki mehanizmi – neuralni, hormonalni, mehanički i metabolički. U ženki se tijekom trudnoće maternica, zahvaljujući između ostalog i NO-u, u cijelosti relaksira.¹⁹ Nadalje, poznato je da krvne žile maternice stvaraju znatno više vazodilatacijskih tvari, prostaciklina i NO-a, kao odgovor na brojne antagoniste (na primjer, angiotenzin II). Posljedica je vazodilatacije manji otpor te povećan protok krvi kroz krvne žile, što zadovoljava potrebe fetusa u razvoju.²⁰ Koncentracija nitrata i nitrita u serumu majke, izmjerena u normalnoj trudnoći, značajno je viša nego u žena koje nisu trudne.²¹ Budući da NO sudjeluje u regulaciji kontraktilnosti glatkih mišićnih stanica krvnih žila, kao i kontraktilnosti maternice, njegova uloga u normalnoj, a posebno u patološkoj trudnoći, u posljednje se vrijeme intenzivno istražuje.

Uloga NO-a u ranoj trudnoći (prvom tromjesečju)

Prema novijim spoznajama, NO ima važnu ulogu u implantaciji jajašca i ranom embrionalnom razvoju.²² U eksperimentalnih životinja primjena donora NO-a u velikim koncentracijama inhibira razvoj embrija *in vitro* i implantaciju *in vivo*.²³ Rezultati tih i sličnih istraživanja upućuju na to da je za uspješnu implantaciju oplođenog jajašca jedan od ključnih preduvjeta optimalna koncentracija NO-a u tkivu endometrija.^{23,24} Također je na animalnim modelima pokazana značajno veća ekspresija iNOS i eNOS u području embrionalnog pola nakon implantacije, što upućuje na važnost uloge NO u vazoregulaciji, ali i u lokalnoj imunosupresiji. Pojačana ekspresija iNOS u periimplantacijskom razdoblju ima za posljedicu povećano stvaranje NO-a, koji zbog svog vazodilatacijskog djelovanja i poticajnog djelovanja na angiogenezu, stimulira blastocistu da se ugnijezdi u endometriju.²⁵

Čini se da od stanica ključnu ulogu u implantaciji imaju uterini leukociti – NK-stanice, makrofazi i mastociti koji se nakupljaju i diferenciraju na mjestu implantacije. Te stanice imaju pojačanu ekspresiju iNOS te izlučuju citolitičke molekule, poput perforina i granizima, za vrijeme svoje diferencijacije *in situ*.^{26,27} Ekspresija iNOS u navedenim stanicama ovisi o stupnju diferencijacije i aktiviranosti imunskih stanica, odnosno ovisna je o razdoblju trudnoće. U istraživanjima na eksperimentalnim životinjama pokazano je da su uterine NK-stanice pretežno smještene perivaskularno, uglavnom su aktivirane i glavni su izvor interferona γ , a on je jedan od izravnih regulatora ekspresije iNOS.²⁷ Također je dokazano da NK-stanice imaju posebno važnu ulogu tijekom trudnoće u prilagođavanju uterinog žilja i održavanju decidue. Stvaranje NO-a i tumor nekrotizirajući čimbenik α (prema *engl.* tumour necrosis factor- α , TNF- α) spregnuto je s diferencijacijom NK-stanica koja može biti modulirana progesteronom.²⁷ Decidualni makrofazi također stvaraju NO, ovisno o koncentraciji interleukina 1

(IL-1) i TNF- α , a posebice o interferonu γ . U pokusima provedenim na animalnim modelima, u kojima su navedeni čimbenici inhibirani monoklonskim protutijelima, zabilježena je povećana učestalost ranih spontanih pobačaja.²⁸ Također, rezultati različitih istraživača sve više upućuju na povezanost imunskih mehanizama i mehanizama koji su odgovorni za prilagođavanje uterinog žilja potrebama fetusa.

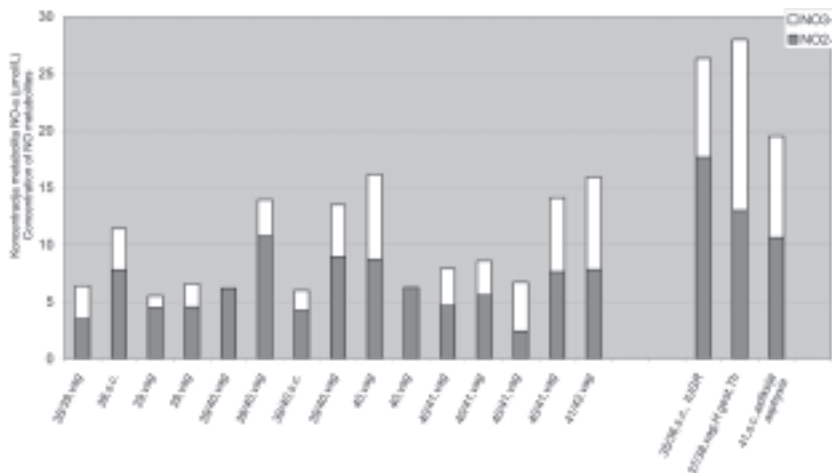
Budući da je pokazano da ekspresija iNOS ovisi i o mjesečnom spolnom ciklusu žene, može se zaključiti da spolni hormoni sudjeluju u lokalnoj regulaciji stvaranja NO-a i za vrijeme trudnoće. Čini se da estradiol nema učinka na makrofage i njihovo stvaranje NO-a dok progesteron inhibira sintezu NO-a i TNF- α u makrofazima. Estradiol potiče u mastocitima sintezu NO-a i TNF- α .²⁹ Da bi nam bila jasna daljnja djelovanja pojedinih hormona na NO sintetaze u različitim razdobljima trudnoće, važno je dobro poznavati smještaj pojedinih izoforma enzima NO sintetaze u maternici.

Iz uzoraka tkiva vrata maternice, dobivenih za vrijeme ranog namjernog prekida trudnoće dokazana je aktivnost NOS u stijenici krvnih žila, u glatkim mišićnim stanicama vrata maternice te u stanicama pojedinačno razbacanim u vezivnom tkivu.³⁰ Donori NO-a, primijenjeni u istraživanjima, uzrokovali su inhibiciju spontane kontraktilne aktivnosti vrata maternice što upućuje na određenu ulogu NO-a u kontroli funkcije vrata maternice u ranom razdoblju trudnoće.³¹

NO sintetaza je aktivna i tijekom razdoblja rasta ljudske posteljice. Budući da je primordijalna posteljica avaskularna, pokazano je da su NOS u tim ranim danima trudnoće smještene na stanicama trofoblasta.³² U homogenatima ljudskih posteljica dokazana je aktivnost i Ca⁺⁺-ovisne (90–95%) i Ca⁺⁺-neovisne (5–10%) NOS. Dodatkom glavnog kofaktora enzima NOS, tetrahidrobiopterina (BH4), povećava se u ljudskoj posteljici stvaranje NO-a čak 2–2,5 puta. Kukor i sur. prvi su pokazali da se u ranoj trudnoći Ca⁺⁺-ovisna NOS može potaknuti na pojačano stvaranje NO-a egzogeno primijenjenim BH4.³³ Inducibilna NOS prisutna je na epitelnim stanicama žlijezda endometrija žena u bilo kojem razdoblju menstrualnog ciklusa, ali ne i na stanicama strome.³⁴ U ranoj trudnoći nalazi se u decidui, korionskim resicama i u decidualno promijenjenim stromalnim stanicama.³⁴ Ekspresija iNOS osobito je izražena na stanicama citotrofoblasta i sinciotrofoblasta.³⁴ Budući da se u posteljici tijekom prvog tromjesečja trudnoće nalaze velike količine mRNA iNOS, možemo pretpostaviti je da je NO vrlo važan u održavanju trudnoće. U kasnijim tjednima trudnoće (16.–18. tjedna) mRNA iNOS dokazana je pretežno u sinciotrofoblastu i glatkim mišićnim stanicama arterija ljudske posteljice.³⁵ Endotelna NOS je dokazana u endotelnim stanicama svih krvnih žila miometrija i endometrija te na epitelnim stanicama žlijezda endometrija, što upućuje na važnu ulogu NO-a u lokalnoj kontroli protoka krvi u stijenci uterusa, ali i u kontroli funkcije endometrija.³⁶ Stanice strome endometrija ne posjeduju endotelnu NOS, kao ni inducibilnu NOS, premda su obje izoforme enzima prisutne u ljudskoj placenti.³⁵ U prvom se tromjesečju eNOS nalazi u citotrofoblastu i sinciotrofoblastu, dok posteljica u terminu porođaja gubi eNOS iz citotrofoblasta, ali ne i iz sinciotrofoblasta.³⁷

Budući da je eNOS smještena u stanicama trofoblasta u neposrednoj blizini sinteze humanoga korionskog gonadotropina (HCG-a) te je djelovanje čimbenika koji inače povećavaju stvaranje NO-a praćeno i trenutnim izlučivanjem HCG-a, smatra se da NO igra važnu ulogu u moduliranju endokrine funkcije posteljice.³⁷

Kao što je već ranije navedeno, rezultati istraživanja su pokazali da ovisno o hormonima, ekspresija sintetaza NO-a može biti potaknuta ili inhibirana. Ekspresiju iNOS potiče estrogen, a ekspresija se još više pojačava progesteronom.²⁵ Progesteron je potreban i za održavanje povećane ekspresije iNOS u



Slika 3. Preliminarni rezultati mjerenja koncentracija metabolita NO-a (NO_2 i NO_3) u nadtalogu homogenata posteljica žena nakon normalne trudnoće i vaginalno vođenog porođaja (vag.) odnosno porođaja carskim rezom (s.c.) te tri roditelje s patološkim trudnoćama (IUGR, gestoza i asfiksija novorođenčeta). Brojevi u histogramu označavaju tjedne gestacije

Figure 3. Preliminary results of NO metabolites concentrations (NO_2 and NO_3) measured in supernatants of homogenized placentas of women with normal pregnancy and vaginal delivery and/or section and three women with pathological pregnancies (IUGR, gestosis, newborn asphyxia). Numbers in histogram denote weeks of gestation

trudnoći eksperimentalnih životinja, dok je primjena estrogena u skotnih životinja uzrokovala inhibiciju ekspresije iNOS i stvaranja NO-a. Stoga, pretpostavlja se da estradiol posredno, djelovanjem na ekspresiju iNOS i stvaranje NO-a, sudjeluje u kontroli kontraktilnosti mišića maternice tijekom rane, ali i kasne trudnoće te u vrijeme porođaja.³⁸

NO u kasnoj trudnoći i porođaju

Signali i mehanizmi, odgovorni za kontrolu kontraktilnosti maternice, još su slabo poznati. Iako tvari kao što su oksitocin, prostaglandini i kateholamini mogu značajno promijeniti kontraktilnost miometrija kad se primjene egzogeno, uloga endogenih čimbenika u započinjanju porođajnih kontrakcija kod donošenih trudnoća ili pak u tijeku prijevremenog porođaja još uvijek je nejasna. Postoji mogućnost da uterine kontrakcije ne nastupaju kao posljedica pojave prokontraktilnih tvari, već kao odgovor na nestanak relaksirajućih čimbenika. Jedan od važnijih relaksirajućih čimbenika mogao bi biti NO, premda su mehanizmi njegova djelovanja u kasnijim razdobljima trudnoće i porođaju, različito u literaturi opisani, a nerijetko i sasvim oprečni.³⁹ Inhibicija sinteze NO-a tijekom drugog tromjesečja do razdoblja kasne trudnoće u eksperimentalnih životinja uzrokuje značajno povišenje krvnog tlaka i proteinuriju, uz smanjen protok krvi u bubrezi, srcu, plućima i jetri. Rezultati tih pokusa pokazuju da NO ima važnu ulogu u promjenama sistemske hemodinamike, ali i regionalnog protoka krvi u različitim organima tijekom kasnijeg razdoblja trudnoće.⁴⁰ U skotnih štakorica uterina iNOS ekspresija povećava se za vrijeme trudnoće i pada neposredno prije i za vrijeme porođaja; pokazana je ekspresija svih izoforma enzima NOS, i to u decidual, krvnim žilama, živcima i mišićnim stanicama, dok je cervikalna iNOS niska do termina porođaja, kada naglo raste.⁴¹ Promjena u stvaranju mRNA iNOS na kraju trudnoće mogla bi biti važna u otpočinjanju porođaja i sazrijevanju vrata maternice.

Osnovno djelovanje NO-a za vrijeme kasne trudnoće je inhibicija kontraktilnosti maternice. Dokazano je povećano izlučivanje urinom nitrita i nitrata (metaboliti NO-a) u žena za vrijeme i rane i kasne trudnoće.⁴² Glatke uterine mišićne stanice također stvaraju NO, ali još nam nije poznat mehanizam kojim bi NO djelovao relaksirajuće na mišće gravidne maternice.⁴³

Istraživači koji su dokazali povećanu ekspresiju cNOS enzima u trudnoći također smatraju da je NO važan u održavanju uterine miroće.^{44,45} Štoviše, inhibicija sinteze NO-a produljuje trajanje porođaja, kao i razdoblja između trudova, a smanjuje i rastegljivost vrata maternice.⁴⁶ Za vrijeme trudnoće iNOS je smještena i u miocitima te se njezina ekspresija progresivno povećava prema terminu porođaja. Međutim, pri kraju trudnoće

njezina se ekspresija smanjuje i gotovo je odsutna u trenutku početka porođaja. To upućuje na važnu ulogu iNOS odnosno NO-a u regulaciji kontraktilnosti mišića maternice za vrijeme trudnoće, što ima znatan utjecaj na sam tijek i ishod trudnoće. Čimbenici koji potiču enzim iNOS još se istražuju, no navode se određeni citokini (IL-1, TNF- α , čimbenik stimulacije granulocitno-monocitnih kolonija, transformirajući čimbenik rasta β), kao i hormoni jajnika.¹⁹ U neprimata, početak porođaja karakteriziran je prevagom estrogena nad progesteronom. Iako u žena ne postoji promjena u koncentraciji tih hormona u plazmi, lokalni parakrini sustavi u uterinom tkivu i fetalnim ovojcima uzrokuju porast omjera estrogena i progesterona na početku porođaja. Dominacija estrogena u tom trenutku aktivira brojne putove koji vode započinjanju porođaja, uključujući stimulaciju lučenja oksitocina i porast broja receptora za oksitocin te sintezu prostaglandina.⁴⁷ Kao mogući uzrok smanjene ekspresije iNOS u trenutku početka porođaja navodi se pad koncentracije progesteronskih receptora neposredno prije porođaja, što dovodi do smanjenog stvaranja citokina pod utjecajem progesterona i posljedičnog pada ekspresije iNOS. Ipak, u literaturi se navode i podaci koji ne podupiru pretpostavku o ulozi NO-a u započinjanju porođaja.⁴⁷ Nadalje, u eksperimentalnih životinja nađen je pad broja endometrijskih makrofaga, najmanje jedan dan prije početka porođaja, što govori da bi te imunosne stanice, koje također sudjeluju u stvaranju NO-a, mogle pridonijeti početku porođaja.⁴⁸

I na kraju ovog dijela o djelovanju NO-a u trudnoći i porođaju svakako treba napomenuti da rezultati istraživanja provedenih na animalnim modelima daju tek smjernice za istraživanja koja treba provesti na humanim tkivima. Zaista, vrlo oprezno na temelju rezultata eksperimenata provedenih na životinjama možemo zaključivati o djelovanju NO-a u izuzetno složenim stanjima kao što su i trudnoća i porođaj. Međutim, rezultati dosadašnjih istraživanja i na humanim tkivima upućuju na to da bi ovaj spoj mogao imati važnu ulogu tijekom trudnoće i porođaja. Provedena vlastita istraživanja su pokazala razmjerno rasap vrijednosti ukupne koncentracije metabolita NO-a (raspon vrijednosti od 5,99 do 16,17 $\mu\text{mol/L}$) u nadtalogu homogenata ročnih posteljica (slika 3). Navedena mjerenja izvršena su Griessovom reakcijom i dio su naših istraživanja vezanih uz ulogu NO kao važne signalne molekule u patološkoj trudnoći.

Patološka stanja u trudnoći i NO

Istraživanja na životinjama pokazala su da zbog poremećaja u trudnoći, nakupljeni makrofazi u deciduali, potaknuti interferonom γ , pojačano stvaraju NO. Interferon γ izlučuju aktivirani pomagački limfociti tipa Th_1 , što je posljedica suviše jake

imunodne reakcije na embrio. U takvih životinja zabilježeni su česti rani spontani pobačaji. Rezultati ovih istraživanja prvi put su pokazali da je povećana količina interferona γ u decidui štetna za preživljavanje embrija.²⁹

Pretpostavlja se da dušikov oksid koji stvaraju miociti uterusa ima važnu ulogu u trudnoći, ali i pri porođaju jer nadzire kontraktilnost maternice, dok je NO koji stvaraju endotelne stanice krvnih žila važan u etiopatogenezi preeklampsije. Sistemski vazospazam koji se pojavljuje u preeklampsiji najvjerojatniji je uzrok kliničkih manifestacija bolesti.^{49,50} Poremećaji u stvaranju endotelnog NO-a krvnih žila kao snažne vazodilatacijske tvari mogao bi imati važnu ulogu u nastanku preeklampsije.⁵¹ U prilog toj pretpostavci su istraživanja u kojima je dokazano da primjena inhibitora NO sintetaze, na primjer, N(ω -ga)-nitro-L-arginin metil estera (L-NAME) na skotnim štakoricama dovodi do pojave stanja sličnog preeklampsiji.⁵² U ovaca pak dolazi do povišenja doplerskog S/D omjera u pupčanoj arteriji, a agonist NOS, L-arginin, poništava učinak L-NAME, smanjuje povišeni krvni tlak, i s vremenom se fetalna masa povećava.⁵³ Morfološke promjene u posteljicama eksperimentalnih životinja, tretiranih s L-NAME, mogu se usporediti s promjenama u ljudskoj placenti kod preeklampsije (prisutna je vakuolizacija gigantskih stanica, degeneracija i smanjenje broja stanica, suženje interviloznih prostora i fetalnih krvnih žila, edem u stromi).⁴⁶ Navedeni rezultati istraživanja upućuju na mogućnost da je vazokonstrikcija, kao posljedica smanjenog stvaranja NO-a, jedan od mogućih uzroka preeklampsije.⁵¹ Neki istraživači su pak pokazali da je ekspresija eNOS, dakle i stvaranje NO-a značajno povećano u fetoplacentarnoj cirkulaciji pacijentica s preeklampsijom sa zastojem ili bez zastoja fetalnog rasta (prema *engl.* intrauterine growth retardation, IUGR).⁴⁶ Moguće je da je povećano stvaranje NO-a prilagodba na povećani vaskularni otpor, slabu perfuziju i nastalu hipoksiju. S druge strane, smanjeno stvaranje NO-a u cirkulaciji može biti posljedica oštećenja ili disfunkcije endotela, smanjene raspoloživosti supstrata L-arginina ili povećane količine endogenih inhibitora enzima NO sintetaze.⁴⁶ Nadalje, u kulturi stanica trofoblasta posteljice, ekspresija iNOS u žena s preeklampsijom je snižena, dok je ekspresija eNOS povišena u odnosu na posteljice zdravih žena.⁴⁹

U žena s prijetecim prijevremenim porođajem i prijevremenim prsnućem ovoja ukupna koncentracija nitrata i nitrita u vaginalnom sekretu značajno je veća nego u uzorku vaginalnog sekreta žena s donošenim trudnoćama. Valja pretpostaviti da bi se određivanjem koncentracije metabolita NO-a u vaginalnom sekretu mogao predvidjeti prijevremeni porođaj.⁵⁴

U odnosu na normalne ročne posteljice, mRNA eNOS u posteljici trudnica s IUGR-om i dijabetesom, ali ne i s hipertenzijom, značajno je povišena.³⁷ Međutim, neki autori ne nalaze povećanu ukupnu ekspresiju NOS u posteljici žena s gestacijskim, odnosno negestacijskim dijabetesom.⁵⁵

Rezultati naših preliminarnih istraživanja, u kojima smo određivali koncentraciju metabolita NO-a, nitrata i nitrita, u natalogu homogenata tkiva posteljice neposredno nakon porođaja, pokazuju povišenu koncentraciju metabolita NO-a u uzorcima tkiva posteljice žena s patološkom trudnoćom (IUGR, H-gestoza), u odnosu na zdrave trudnice (slika 3). Ovi su nalazi u skladu s rezultatima Rossmanitha i sur.³⁷ odnosno van Wijka i sur.⁵⁰

Mogućnosti terapije donorima NO-a odnosno inhibitorima NOS

Pokazano je da je sazrijevanje vrata maternice, kao važan preduvjet za nastanak produktivnih trudova, značajno smanjeno u ženki eksperimentalnih životinja tretiranih donorima NO-a (Na-nitroprusidom i molsidominom), odnosno prostaglandinom E₂. U navedenom istraživanju primjena inhibitora NOS

(L-NAME), kao i inhibitora sinteze prostaglandina (indometacina), značajno je povećala zrelost vrata maternice.⁵⁶ Također je pokazano da dušikov oksid i prostaglandini mogu neovisno kontrolirati omekšanje vrata maternice, djelujući paralelno i/ili sinergistički. Progesteron također ima važnu ulogu u omekšanju vrata maternice, no čini se da je način djelovanja progesterona znatno složeniji. Između ostalog, izgleda da je posredovan i NO-om.⁵⁶ U kliničkim istraživanjima vaginalna primjena donora NO-a, izosorbid dinitrata (ISMN), potiče omekšanje vrata maternice u žena s namjernim prekidom trudnoće. Premda je učinak na omekšanje vrata maternice ISMN (40 ili 80 mg) u odnosu na prostaglandin gemoprost (1 mg) jednak, ISMN je pokazao manje nuspojave (primjerice, ISMN ne uzrokuje bol u abdomenu ni kontrakcije miometrija), a učinak na smekšanje vrata maternice je jednak.⁵⁷ Također je pokazano da donori NO-a, primijenjeni lokalno, postižu visoke koncentracije na mjestu primjene, a niske koncentracije u serumu, tako da ne postoje uobičajene sistemske nuspojave lijekova te skupine, kao što su pad tlaka, tahikardija i glavobolja. Nepoželjna posljedica terapijske primjene ISMN-a pri izvođenju namjernog prekida trudnoće je relaksacija miometrija, što može uzrokovati povećani gubitak krvi. Istraživanja su, međutim, pokazala da nema značajnije razlike u gubitku krvi između žena tretiranih gemoprostom ili ISMN-om.⁵⁷ Donori NO-a u obliku gela, kao što je 2%-tni nitroprusidni gel, uzrokuju brzo i jako omekšanje vrata maternice, bez dodatnih nuspojava, te ga neki autori preporučuju pri prekidu trudnoće u prvom tromjesječju.⁵⁸

U brojnim radovima opisana je sposobnost egzogenog NO-a da potakne uterinu relaksaciju.^{12,39,43} Relaksacija mišićja maternice od presudne je važnosti za održavanje trudnoće i sprječavanje prijevremenog porođaja. Donori NO-a izazivaju relaksaciju maternice i inhibiraju kontrakcije *in vivo*. Pokazano je da nitroglicerol relaksira maternicu i ubrzava ekstrakciju zastale posteljice. U kontroliranoj studiji, primjenom nitroglicerina, u statistički značajnom broju žena uspio se zaustaviti prijevremeni porođaj i produljiti trudnoća.¹⁹ Djelovanje još jednog donora NO-a, glicerilnitrata (GTN-a), u obliku flastera, ispitivano je u žena s prijetecim prijevremenim porođajem. Nije pokazana statistički značajna razlika u sprječavanju prijevremenog porođaja u žena tretiranih GTN-om u odnosu na žene tretirane ritodrinom. Srednje produljenje trudnoće također je bilo slično.⁴⁷ Neki su, pak, autori zabilježili produljenje trudnoće pri primjeni GTN-a i do 34 dana (median 28 dana).⁵⁹ U 10 žena s prijetecim prijevremenim porođajem i 10 žena s blagom preeklampsijom u 30. tjednu gestacije, primjena glicerilnitrata značajno je snizila krvni tlak, i to statistički značajno više u skupini s preeklampsijom. Indeks pulzatilnosti arterije uterine i arterije umbilikalis značajno se snizio u obje skupine.⁶⁰ I rezultati istraživanja o djelovanju donora NO-a na placenciju i rast djeteta, provedenih na ograničenom broju trudnoća s IUGR-a, ali bez kontrolnih skupina obećavaju.⁶¹

Premda rezultati provedenih istraživanja upućuju na važnost daljnjih kliničkih istraživanja primjene donora NO-a, odnosno inhibitora sinteze NO-a, nužno je naglasiti da bi kritička primjena raznih gore spomenutih lijekova s još uvijek neproverenim nuspojavama mogla biti opasna i pogubna u rizičnih trudnica.

LITERATURA

1. Palmer RMJ. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium derived relaxing factor. *Nature* 1987;327:524–6.
2. Ariggard E. Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *Lancet* 1994; 343:1199–206.
3. Furchort RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J.* 1989;3:2007–18.

4. Ignarro LJ, Wood KS, Fukuto JM. Continuous basal formation of endothelium-derived relaxing factor and muscle-derived relaxing factor, both of which are nitric oxide. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991;17:S229–33.
5. Cannon RO. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clin Chem* 1998;44:1809–19.
6. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthesis in mammals. *Biochem J* 1994;298:249–58.
7. Suzuki N, Sakamoto A, Ogawa R. Effect of L-canavanine, an inhibitor of inducible nitric oxide synthase, on myocardial dysfunction during septic shock. *J Nippon Med Sch* 2002;15:69, 13–18.
8. Peters K, Unger RE, Brunner J, Kirkpatrick CJ. Molecular basis of endothelial dysfunction in sepsis. *Cardiovascular Res* 2003;60(1):49–57.
9. Ganz P, Vita JA. Testing endothelial vasomotor function: nitric oxide, a multipotent molecule. *Circulation* 2003;108:2049–53.
10. Kojda G, Patzner M, Hacker A, Noack E. Nitric oxide inhibits vascular bioactivation of glyceryl trinitrate: a novel mechanism to explain preferential venodilation of organic nitrates. *Mol Pharm* 1998;53(3):547–54.
11. Moncada S, Higgs A, Furchgott R. XIV international union of pharmacology nomenclature in nitric oxide research. *Pharmacol Rev* 1999;49:137–42.
12. Vallance P, Collier J. Forthrightly review biology and clinical relevance of nitric oxide. *BMJ* 1994;309:453–7.
13. Ignarro LJ. Endothelium-Derived Relaxing Factor. U: *Encyclopedia of Human Biology* 1991;3:371–6.
14. Gow AJ, Luchsinger BP, Pawloski JR, Singel DJ, Stamler JS. The oxyhemoglobin reaction of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci* 1999;96:9027–32.
15. Bohle SD. Pathophysiological chemistry of nitric oxide and its oxygenation by-products. *Cur Opin Chem Biol* 1998;2:194–200.
16. Salvemini D, Currie MG, Mollace V. Nitric oxide-mediated cyclooxygenase activation—a key event in the antiplatelet effects of nitrovasodilators. *J Clin Invest* 1996;97:2562–8.
17. Boykin JV. The nitric oxide connection: hyperbaric oxygen therapy, becaplermin, and diabetic ulcer management. *Adv Skin Wound Care* 2000;13:169–74.
18. Nathan C. Inducible nitric oxide synthase: What difference does it make? *J Clin Invest* 1997;100:2417–23.
19. Bansal RK, Goldsmith PC, He Y, Zaloudek CJ, Ecker JL, Riemer RK. A decline in myometrial nitric oxide synthase expression is associated with labor and delivery. *J Clin Invest* 1997;99:2502–8.
20. Bird IM, Sullivan JA, Di T, Cale JM, Zhang L, Zheng J, Magness RR. Pregnancy-dependent changes in cell signaling underlie changes in differential control of vasodilator production in uterine artery endothelial cells. *Endocrinol* 2000;141(3):1107–17.
21. Shaamash AH, Elsnasay ED, Makhloof AM, Zakhari MM, Ibrahim OA, El-dien HM. Maternal and fetal serum nitric oxide (NO) concentrations in normal pregnancy, preeclampsia and eclampsia. *Int J Gyn Obst* 2000;68(3):207–14.
22. Fabregues F, Balasch J, Manau D, Creus M, Jimenez W. Circulating levels of nitric oxide in successful and unsuccessful implantation after in vitro fertilization and embryo transfer. Relationship to estradiol and progesterone. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000;79(7):546–69.
23. Barroso RP, Osuamke C, Nagamani M, Yallampalli C. Nitric oxide inhibits development of embryos and implantation in mice. *Mol Hum Reprod* 1998;4(5):503–7.
24. Igarashi S, Oyama N, Suzuki Y, Tanak T. Optimal levels of nitric oxide are crucial for implantation in mice. *Reprod Fert Dev* 1999;11(3):183–8.
25. Saxena D, Purohit SB, Kumer GP, Laloraya M. Increased appearance of inducible nitric oxide synthase in the uterus and embryo at implantation. *Nitric oxide* 2000;4:384–91.
26. Hunt JS, Petroff MG, Burnett TG. Uterine leukocytes: key players in pregnancy. *Sem Cell Devel Biol* 2000;11(2):127–37.
27. Burnett TG, Hunt JS. Nitric oxide synthase-2 and expression of perforin in uterine NK cells. *J Immunol* 2000;164(10):5245–50.
28. Haddad EK, Ducloux AJ, Anteckla E, Lapp WS, Baines MG. Role of interferon-gamma in the priming of decidual macrophages for nitric oxide production in early pregnancy. *Cell Immunol* 1997;181(1):68–75.
29. Hunt JS, Miller L, Roby KF, Huang J, Platt JS, Debrot BL. Female steroid hormones regulate production of pro-inflammatory molecules in uterine leukocytes. *J Reprod Immunol* 1997;35(2):87–99.
30. Buhimichi I, Ali M, Jain V, Chwalisz K, Garfield RE. Differential regulation of nitric oxide in the rat uterus and cervix during pregnancy and labour. *Hum Reprod* 1996;11(8):1755–66.
31. Ekerhovd E, Brannstrom M, Delbro D, Norstrom A. Nitric oxide mediated inhibition of contractile activity in the human uterine cervix. *Mol Hum Repr* 1998;4(9):915–20.
32. Kukor Z, Toth M. Ca(2+)-dependent and Ca(2+)-independent NO-synthesizing activities of human primordial placenta. *Acta Physiol Hung* 1994;82(4):313–9.
33. Kukor Z, Meszaros G, Hertelendy F, Toth M. Calcium-dependent nitric oxide synthesis is potentially stimulated by tetrahydrobiopterin in human primordial placenta. *Placenta* 1996;17(1):69–73.
34. Yoshiki N, Kubota T, Aso T. Expression and localization of inducible nitric oxide synthase in human non-pregnant and early pregnant endometrium. *Mol Hum Reprod* 2000;6(2):185–90.
35. Baylis SA, Strijbos PJ, Sandra A, Russel RJ, Rijhsinghani A, Charles JG, Weiner CP. Temporal expression of inducible nitric oxide synthase in mouse and human placenta. *Mol Hum Reprod* 1999;5(3):277–86.
36. Telfer JF, Irvine GA, Kohnen G, Campbell S, Cameron IT. Expression of endothelial and inducible nitric oxide synthase in non-pregnant and decidualized human endometrium. *Mol Hum Reprod* 1997;3(1):69–75.
37. Rossmannith WG, Hoffmeister U, Wolfahrt S, Kleine B, McLean M, Jacobs RA, Grossman AB. Expression and functional analysis of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in human placenta. *Mol Hum Reprod* 1999;5(5):487–94.
38. Yallampalli C, Dong YL. Estradiol-17 beta inhibits nitric oxide synthase (NOS)-II and stimulates NOS III gene expression in the rat uterus. *Biol Repr* 2000;63(1):34–41.
39. Bradley KK, Buxton ILO, Barber JE, McGaw T, Bradley ME. Nitric oxide relaxes human myometrium by a cGMP-independent mechanism. *Am J Physiol* 1998;275:1668–73.
40. Kassab S, Miller MT, Hester R, Novak J, Granger JP. Systemic hemodynamics and regional blood flow during chronic nitric oxide synthesis inhibition in pregnant rats. *Hypertension* 1998;31(1):315–20.
41. Ali M, Bumischi I, Chwalisz K, Garfield RE. Changes in expression of the nitric oxide synthase isoforms in rat uterus and cervix during pregnancy and parturition. *Mol Hum Reprod* 1997;3(11):995–1003.
42. Begum S, Yamasaki M, Mochizuki M. Urinary levels of nitric oxide metabolites in normal pregnancy and preeclampsia. *J Obst Gyn Res* 1996;22(6):551–9.
43. Kuenzli KA, Buxton ILO, Bradley ME. Nitric oxide regulation of monkey myometrial contractility. *Brit J Pharm* 1998;124:63–68.
44. Mirabile CP Jr, Massmann GA, Figueroa JP. Physiologic role of nitric oxide in the maintenance of uterine quiescence in nonpregnant and pregnant sheep. *Am J Obst Gyn* 2000;183(1):191–8.
45. Norman JE, Thomson AJ, Telfer JF, Young A, Greer IA, Cameron IT. Myometrial constitutive nitric oxide synthase expression is increased during human pregnancy. *Mol Hum Reprod* 1999;5(2):175–81.
46. 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.
47. Acevedo CH, Ahmed A. Hemoxygenase-1 inhibits human myometrial contractility via carbon monoxide and is upregulated by progesterone during pregnancy. *J Clin Invest* 1998;101(5):949–55.
48. Mackler AM, Green LM, Mc Millan PJ, Yellan SM. Distribution and activation of uterine mononuclear phagocytes in peripartum endometrium and myometrium of the mouse. *Biol Repr* 2000;62(5):1193–200.
49. Napolitano M, Miceli F, Calce A, Vacca A, Gulino A, Apa R. Expression and relationship between endothelin-1 messenger ribonucleic acid (mRNA) and inducible/endothelial nitric oxide synthase mRNA isoforms from normal and preeclamptic placentas. *J Clin End & Metab* 2000;85(6):2318–23.
50. van Wijk MJ, Kublickiene K, Boer K, VanBarel E. Vascular function in preeclampsia. *Cardio Res* 2000;47(1):38–48.
51. Anonymous. Nitric oxide in the pathophysiology and treatment of preeclampsia. *Geburt Frauenheil* 2000;60(1):1–10.
52. Osawa H. Study on the morphological changes in the placenta of rats administered nitric oxide synthase inhibitor. *Acta Obst Gyn Jap* 1996;48(9):813–20.
53. Giles W, Falconer J, Read M, Leitch I. Ovine fetal umbilical artery Doppler systolic diastolic ratios and nitric oxide synthase. *Obst & Gyn* 1997;89(1):53–6.
54. Nakatsuka M, Habara T, Kamada Y, Tada K, Kudo T. Elevation of total nitrite and nitrate concentration in vaginal secretions as a predictor of premature delivery. *Am J Obst & Gyn* 2000;182(3):644–5.
55. di Iulio JL, Gude NM, King RG, Rand MJ, Brennecke SP. Human placental nitric oxide synthase activity is not altered in diabetes. *Clin Sci* 1999;97(1):123–8.
56. Shi L, Shi S-Q, Saade GR, Chwalisz K, Garfield R. Studies of cervical ripening in pregnant rats: effects of various treatments. *Mol Hum Repr* 2000;6(4):382–9.
57. Thomson AJ. Randomised trial of nitric oxide donor versus prostaglandin for cervical ripening before first-trimester termination of pregnancy. *Lancet* 1998;352(9134):1093–6.
58. Facchinetti F, Piccinini F, Volpe A. Chemical ripening of the cervix with intracervical application of sodium nitroprusside: a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2000;15(10):2224–7.
59. Lees C, Campbell S, Jauniaux E, Brown R, Ramsay B, Gibb D, Moncada S, Martin JF. Arrest of preterm labour and prolongation of gestation with glyceryl trinitrate, a nitric oxide donor. *Lancet* 1994;343:1325–6.
60. Luzzi G, Caserta G, Iammarino G, Clerici G, Di Renzo GC. Nitric oxide donors in pregnancy: fetomaternal hemodynamic effects induced in mild pre-eclampsia and threatened preterm labour. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1999;14(2):101–9.
61. Lampariello C, de Blasio A, Merenda A, Graziano E, Michalopoulou A, Bruno P. Use of arginine in intrauterine growth retardation (IUGR). *Mi-nerva Ginecol* 1997;49(12):577–81.