

# Arginina i cytrulina a hypotrofia płodu – część I

## Arginine and cytruline versus fetus hypotrophy – part I

© GINEKOLOGIA I POŁOŻNICTWO 3 (9) 2008

Artykuł poglądowy/Review article

AGATA PARDEJ<sup>1</sup>, MARIAN GRYBOŚ<sup>2</sup>, JANUSZ KUBICKI<sup>3,4</sup>, WOJCIECH GUZIKOWSKI<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Opolskie Centrum Onkologii w Opolu

Dyrektor: lek. med. Wojciech Redelbach

<sup>2</sup> I Katedra i Klinika Ginekologii i Położnictwa AM we Wrocławiu

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Marian Gryboś

<sup>3</sup> Katedra i Zakład Położnictwa, Instytut Położnictwa, Państwowa Medyczna Wyższa Szkoła Zawodowa w Opolu

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Janusz Kubicki

<sup>4</sup> Instytut Fizjoterapii, Wydział Wychowania Fizycznego i Fizjoterapii, Politechnika Opolska

Kierownik: dr hab. n. med. Jan Szczegielniak

<sup>5</sup> Szpital Ginekologiczno-Położniczy i Noworodków w Opolu

Dyrektor: dr n. med. Wojciech Guzikowski

Adres do korespondencji/Address for correspondence

Opolskie Centrum Onkologii

ul. Katowicka 66a, 45-060 Opole, Poland

tel. 077 441 61 49; e-mail: pardej@onkologia.opole.pl

### Statystyka/Statistic

Liczba słów/Word count 2718/3092

Tabele/Tables 0

Ryciny/Figures 0

Piśmiennictwo/References 55

Received: 06.04.2008

Accepted: 24.06.2008

Published: 05.09.2008

### Streszczenie

W pracy przedstawiono znaczenie oraz stężenia aminokwasów: argininy i cytruliny a także rolę tlenu azotu w przypadkach hypotrofii płodu. Arginina jako źródło tlenu azotu od kilku lat jest stosowana w leczeniu wielu chorób. Terapia hypotrofii płodu (płody z niedoborem masy ciała w stosunku do masy należnej dla danego wieku ciążowego) za pomocą L-argininy jest stosowana, z dobrym skutkiem, przez coraz większą liczbę klinicystów, co będzie przedmiotem kolejnych publikacji.

**Słowa kluczowe:** arginina, cytrulina, hypotrofia płodu

### Summary

In this study the role and concentrations of aminoacids - arginine and citruline together with the role that nitrogen oxide play in fetus hypotrophy were presented. For many years, arginine being a source of nitrogen oxide, was used in treatment of several illnesses and ailments. The fetus hypotrophy therapy (fetus with body mass defficiency in proportion to body mass appropriate for the specific pregnancy age) with L-arginine is applied with good results by growing number of clinicians, what will be presented in the following studies.

**Key words:** arginine, citruline, fetus hypotrophy

## ARGININA

Pierwsze wzmianki o argininie pochodzą z 1886 roku. Nazwa „arginina” pochodzi od sposobu uzyskiwania tego aminokwasu w postaci soli srebrowej (argentum – srebro). Arginina to aminokwas białkowy, zasadowy i hydrofilowy. Jest częścią składową centrum aktywnego licznych enzymów i służy do rozpoznawania oraz przyłączania substratów o ładunku ujemnym i kofaktorów o charakterze anionu [1-5].

Stężenie argininy w osoczu krwi ludzi jest stosunkowo duże w porównaniu do innych aminokwasów i wynosi od 1,2 do 3 mg/100ml (75-95  $\mu\text{mol/l}$ ) [6]. Arginina musi być dostarczana w pożywieniu, gdyż jej endogenna synteza jest niewystarczająca do prawidłowego wzrostu. Dzielne zapotrzebowanie na argininę dla organizmów rosnących wynosi 1,8g. Do utrzymania zdrowia osoba dorosła powinna spożyć 30-60g białka lub jego równoważników w postaci wolnych aminokwasów dziennie. Taka dieta zawiera średnio od 3 do 6g argininy. Natomiast biologiczna dostępność egzogenicznej argininy wynosi około 60% [4,7]. Piśmiennictwo podaje, że nadmiar argininy może być niebezpieczny. Hyperargininemia spowodowana niedoborem enzymu – arginazy uniemożliwia tworzenie ornityny i syntezę mocznika. W zaburzeniu tym stężenie argininy w płynach ustrojowych jest wysokie. W hyperargininemii z objawów klinicznych na pierwszy plan wysuwają się zaburzenia trawienia oraz zwiększona pobudliwość nerwowa. Częste są objawy neurologiczne w postaci drgawek i zaburzonej koordynacji ruchowej, może także wystąpić śpiączka. Defekt ten leczy się poprzez ograniczenie do niezbędnego minimum podaży białka w diecie [4].

Arginina może być w organizmie człowieka syntetyzowana z cytruliny przy udziale dwóch cytoplazmatycznych enzymów syntetazy oraz liazy arginino-bursztynianowej. Jest to jednak proces energochłonny, gdyż w reakcji tej zużywane są dwie cząsteczki ATP. Arginina bierze udział w wielu reakcjach chemicznych w organizmie człowieka, między innymi służy, jako dawca grupy formamidowej w biosyntezie kreatyny. Uczestniczy w syntezie mocznika – głównego produktu końcowego katabolizmu azotu u ludzi. Ważnym szlakiem przemian argininy jest jej przekształcenie poprzez ornitynę w putrescynę, sperminę i spermidynę. Te dwie ostatnie substancje, zwane poliaminami biorą udział w różnorodnych procesach fizjologicznych związanych z proliferacją i wzrostem komórkowym. Spermidyna i spermina są nośnikami ładunków dodatnich, które wiążą się z innymi poliaminami, szczególnie z DNA i RNA. Poliaminy mają różnoraki wpływ na biosyntezę białek; działają zarówno hamująco, jak i pobudzająco na aktywność wielu enzymów włącznie z kinazami białek, czy topoizomerazami. Sugeruje się, że poliaminy są niezbędne do metabolizmu ssaków. Uważa się, że niedobór argininy jest przyczyną bezpłodności u mężczyzn [1,2,4,8].

## ARGININE

Arginine was mentioned for the first time in 1886. The word “arginine” comes from the way in which this aminoacid is obtained in form of silver salts (argentum - silver). Arginine is a protein aminoacid, alkaline and hydrophil. It is a part of an active center of several enzymes and is used to recognize and bind anion cofactors and substrates bearing negative charge [1-5].

The concentration of arginine in blood serum in humans is relatively high in comparison to their aminoacids and amounts from 1,2 to 3 mg/100ml (75-95  $\mu\text{mol/l}$ ) [6]. Arginine should be administered with food, as its endogenous synthesis is not sufficient to make the organism growth proper. Daily requirement for arginine of growing organisms is 1,8g. To stay healthy an adult should consume daily 30-60g of protein or its equivalent in form of free aminoacids. Such diet contains from 3 to 6g of arginine approximately. Whereas biological accessibility of exogenous arginine is approximately 60% [4,7]. Literature shows that excess of arginine can become dangerous. Hyperargininemia caused by the enzyme –arginase insufficiency, makes the urea synthesis production of ornitine impossible. In this disorder the arginine concentration in systemic fluids is high. In hyperargininemia among the clinical symptoms the most visible are the digestion disturbances and increased nervous agitation. The neurological symptoms are often observed in form of convulsions and disturbed motor activity, coma is also possible. This defect is treated by limiting the protein supply in diet to absolutely indispensable minimum. [4].

Arginine can be synthesized in human body from citrulline with the participation of two cytoplasmatic enzymes – synthetase and arginine – succinate lyase. It is though an energy-consuming process, since in the reaction two ATP particles are involved. Arginine participates in several chemical reactions in human body; it serves among other things as a donor of formamide group in course of creatine biosynthesis. It also participates in urea synthesis – the main product of final nitrogen catabolism in humans. The important arginine conversion tract is its transformation from ornitine to putrescine, spermine and spermidyne. The last two substances, called polyamines participate in various physiological processes connected with proliferation and cell growth. Spermidyne and spermine are carriers of positive charges, which bind with another polyamines, especially with DNA and RNA. Polyamines have various influence on proteins' biosynthesis; they act at this same time as inhibitors and they stimulate the activity of several enzymes including proteins kinases or topoizomers. It is suggested that polyamines are indispensable for the mammals metabolism. It is also stated that arginine insufficiency is the cause of males infertility [1,2,4,8].

Antagonistą argininy występującą u roślin strączkowych jest kanawanina i jej homolog – produkt przemiany materii w bakteriach. Związki te hamują transport argininy przez błony komórkowe i mogą zostać wbudowane do białek w miejsce argininy zaburzając w ten sposób ich funkcję [1]. Transport aminokwasów przez błony komórkowe odbywa się na zasadzie aktywnego transportu skojarzonego z przenoszeniem jonów sodu i udziałem ATP oraz swoistego dla danych grup aminokwasowych przENOŚnika. Może się on odbywać zgodnie lub wbrew gradientowi stężeń transportowanego aminokwasu. Aminokwasy zasadowe: lizyna i arginina mają swoje białko przENOŚnikowe [4,8,9].

Arginina stymuluje wydzielanie hormonu wzrostu, który działa za pośrednictwem insulinopodobnego czynnika wzrostu (IGF I i IGF II) zwanego somatomedyną. Hormon wzrostu wydzielany jest epizodycznie i ma krótki – około 20 minutowy okres półtrwania. Działanie hormonu wzrostu polega na przyspieszeniu syntezy białek, hamowaniu utleniania glukozy oraz stymulowaniu lipolizy w tkance tłuszczowej z oszczędzaniem glukozy i aminokwasów. Efektem biologicznym somatotropiny jest przyrost masy mięśniowej, tkanki chrzęstnej i kostnej. W warunkach fizjologicznych na wzrost wydzielania hormonu wzrostu wpływają: sen, wysiłek fizyczny, wzrost aminokwasów po posiłku oraz hypoglikemia. Somatomedyna I pochodzi głównie z wątroby, ale wytwarzana jest także w innych tkankach, z tym że w macicy jej synteza nie zależy od hormonu wzrostu. IGF II produkowany jest głównie w okresie płodowym, a jego synteza słabo zależy od somatotropiny. Dowiedziono, że IGF I jest czynnikiem stymulującym syntezę tlenu azotu w śródbłonku naczyń. Zaobserwowano wzrost cholesterolu i triglicerydów w przypadkach niedoboru hormonu wzrostu i tym samym, przy obniżonej produkcji tlenu azotu. Wyżej wymienione zmiany prowadzą w konsekwencji do rozwoju zmian miażdżycowych, a potem do nadciśnienia. IGF I nasila także działanie gonadotropin i zwiększa produkcję hormonów jajnika [10-13].

Arginina jest jedynym endogennym, fizjologicznym donorem tlenu azotu (NO).

### Tlenek azotu

Tlenek azotu jest wytwarzany w reakcji katalizowanej przez (NOS) – syntazę tlenu azotu w obecności reduktazy fosforanu dinukleotydu nikotynowego adeniny (NADPH) i tlenu. W reakcji tej powstaje także cytrulina. Zarówno obecność tlenu, jak i NADPH biorących udział w syntezie tlenu azotu oraz podobieństwo sekwencji cDNA C-końcowej połowy NOS wskazują na pokrewieństwo syntazy tlenu azotu do enzymów grupy cytochromu P450. W tej części enzymu znajdują się dwa miejsca wiążące flawiny i jedno dla NADPH. Znane są 3 izoformy syntazy tlenu azotu, przy czym dwie z nich: eNOS-śródbłonkowa i nNOS-neuronalna, są stale obecne w organizmie.

Kanawanine and its homologue – the metabolism product in bacteria, is the arginine antagonist present in leguminous plants. These products inhibit arginine transfer over the cell membranes and can be incorporated into proteins particles' replacing arginine and disturbing in such a way their function [1]. The aminoacids transfer over the cell membranes is an active transport associated with the transfer of sodium ions, ATP participation and specific for the special aminoacids carrier. It can take place in accordance to or against the concentrations' gradient of the transferred aminoacid. Alkaline aminoacids: lizyne and arginine have their own transfer protein [4,8,9].

Arginine stimulates growth hormone secretion, which acts through similar to insulin growth factor (IGF I i IGF II) - somatomedine. The growth factor is secreted in episodes and its half-life is short - approximately 20 minutes. The growth factor activity consists in acceleration of the proteins synthesis, glucose oxidizing inhibition and lipolysis stimulation in fatty tissue followed with glucose and aminoacids economizing. The biological effect of somatotropine activity is growth of the cartilage, bones and body mass. Such factors as: sleep, physical effort, enhancement of aminoacids level after meal and hypoglycemia, have influence on the growth factor secretion enhancement in physiological conditions. Somatomedine I is derived mainly from liver, though it is also produced in another tissues, but its synthesis in uterus is not connected with the growth factor. IGF II is produced mainly in fetus period, and its synthesis weekly depends on somatotropine. It has been proved that IGF I is a factor stimulating nitrogen oxide synthesis in vessels' endothelium. Increase in cholesterol and triglycerides level has been observed in case of growth factor insufficiency which is connected with nitrogen oxide production decrease. The above mentioned changes lead in consequence to atherosclerosis development, and further to hypertension. IGF I enhances gonadotrophines activity and increases ovary hormones production [10-13].

Arginine is the only endogenous, physiological donor of nitrogen oxide (NO).

### Nitrogen oxide

Nitrogen oxide is produced in a chemical reaction catalysed by (NOS) – nitrogen oxide synthase in the presence of (NADPH) and oxygen. Citrulline is also a product of this chemical reaction. Presence of oxygen and nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate (NADPH) participating in the nitrogen oxide synthesis and resemblance of the cDNA sequence of C-terminated half of NOS, indicate the relationship of nitrogen oxide synthase to enzymes of P450 cytochrome group. There are two sites binding flavines and one for NADPH in this particular enzyme location. So far 3 nitrogen oxide synthase isoforms are known; two of them: eNOS – endothelium NOS and nNOS-neuron NOS, are constantly present in organism.

Enzymy te generują tlenek azotu w niskim stężeniu, rzędu pikomoli. Izoforma eNOS występuje w śródbłonku, w tkance nerwowej i w płytkach krwi. Jest wytwarzana ze stałą szybkością. Aktywność tych dwóch enzymów, a tym samym powstawanie tlenku azotu są stymulowane przez jony wapnia związane z kalmoduliną. Aktywny kompleks kalmodulina – wapń wiąże się z różnymi enzymami oraz przenośnikami błonowymi modyfikując ich aktywność. Są wśród nich: kinaza białkowa, cyklaza guanylowa, a także syntaza tlenku azotu. Czynniki podwyższające stężenie wapnia w cytosolu, wywołujące także skurcz komórki mięśniowej, równocześnie zwiększają syntezę tlenku azotu. Acetylocholina, substancja P, trombina, histamina działają rozkurczająco na mięśnie gładkie naczyń krwionośnych, gdyż pod wpływem tych związków komórki śródbłonka uwalniają tlenek azotu.

Komórki śródbłonka są pobudzane do produkcji tlenku azotu przez wiele czynników, wśród których najważniejsze to rozciąganie ściany naczynia przez pulsacyjne przemieszczanie się strumienia krwi. Stwierdzono także, że regulatorem ekspresji eNOS są estrogeny i statyny [4,14-17].

Trzecią izoformą enzymu jest syntaza indukowana – iNOS. Jest to enzym niezależny od jonów wapnia. Induktorem tej syntazy są cytokiny, endotoksyny, czynnik martwicy nowotworów. Enzym ten ulega ekspresji w różnych komórkach zwłaszcza w makrofagach, neutrocytach, hepatocytach w czasie infekcji i w stanach zapalnych. Pod wpływem tej syntazy produkowane są duże ilości tlenku azotu i jej działanie utrzymuje się kilka dni, co w efekcie prowadzi do uszkodzenia tkanek. Ta izoforma syntazy różni się także od pozostałych izoform wrażliwością i podatnością na hamujące działanie inhibitorów NOS. Endogenny inhibitor syntazy tlenku azotu tj. asymetryczną dimetyloargininę (ADMA) odkrył w moczu pacjentów z niewydolnością nerek i nadciśnieniem tętniczym w 1991 roku Vallance.

Niewydolne nerki akumulują nadmiar ADMA, czego skutkiem jest zablokowanie syntezy tlenku azotu. Zaobserwowano także wzrost syntezy tego inhibitora u pacjentów z miażdżycą naczyń. Stwierdzono również, że długotrwałe stosowanie cyklosporyny zmniejsza produkcję NO prawdopodobnie na drodze hamowania ekspresji indukowanej syntazy tlenku azotu na poziomie mRNA oraz generację wolnych rodników, które unieczynniają zarówno tlenek azotu, jak i prostacyclinę [8,9,15,18,19].

### Działanie tlenku azotu

Tlenek azotu – gaz wolnorodnikowy – jest cząstką wysoce reaktywną i zanika w czasie krótszym niż kilka sekund (6-8 sekund). Może się jednak wiązać z żelazem hemu i cysteiną hemoglobiny i glutationu, co wydłuża czas jego trwania do kilku godzin. Dyfunduje swobodnie przez błony komórkowe i jest utleniany do azotynu oraz azotanu. Powstający w komórkach

The above enzymes generate nitrogen oxide in low concentration, counted in picomoles. Isoform eNOS is found in endothelium, in nervous tissue and in blood platelets. It is produced with a constant speed. The activity of these two enzymes, connected with nitrogen oxide production is stimulated by calcium ions bound to kalmoduline. The active complex kalmoduline - calcium binds with various enzymes and membrane transfer factors modifying their activity. Protein kinase, guanyl cyclase, and nitrogen oxide synthase are among them. The factors enhancing calcium concentration in cytosol, causing also spasm of muscle cell, simultaneously enhance nitrogen oxide synthesis. Acetylcholine, P substance, thrombin, histamine act relaxing on blood vessels smooth muscles, since under influence of these substances the endothelium cells release nitrogen oxide.

Many factors stimulate endothelium cells to nitrogen oxide production, among which the most important is vessels' wall stretching caused by pulsation relocation of the blood stream. It has been also stated, that estrogens and statines regulate eNOS expression. [4,14-17].

Inducted syntase - iNOS is the third enzyme isoform. This enzyme does not depend on calcium ions. Cytokines, endotoxines, cancer necrosis factor are its inductors. This enzyme undergoes expression in various cells, especially in makrophages, neutrocytes, hepatocytes in course of infection and in inflammation This syntase induces large amounts of nitrogen oxide production; its activity lasts over several days, leading to tissues damage. Synthase izoform differs from the other izoforms in sensitivity and susceptibility to inhibiting activity of NOS inhibitors. In 1991 Vallance discovered in urine of patients with kidneys insufficiency and hypertension an endogenous inhibitor of nitrogen oxide syntase - asymmetric dimethylarginine (ADMA) .

Kidneys with insufficiency cumulate excess of ADMA, leading to nitrogen oxide synthesis blockage. Also enhancement of synthesis of this inhibitor in patients with vessels' atheromatosis has been observed. It has also been stated that cyclosporine administration over the long term decreases NO production, probably by inhibition of expression of nitrogen oxide inducted syntase (level mRNA) and free radicals generation which neutralize both nitrogen oxide and prostacycline [8,9,15,18,19].

### Nitrogen oxide activity

Nitrogen oxide – free radical gas – is a highly reactive particle, diminishing over period of time shorter than few minutes (6-8 seconds). It binds though with hem iron, hemoglobin and glutathione cysteine, which prolongs its time duration to several hours. It diffuses freely over cell membranes and is oxidized to nitrite and nitrate. Nitrogen oxide created in endothelium cells penetrates to smooth muscles cells, where it activates guanosine monophosphate cyclase GMP. At the end of

śródbłonka tlenek azotu przenika do komórek mięśni gładkich, gdzie aktywuje cytosolową cyklazę guanilową GMP. W efekcie reakcji katalizowanej przez ten enzym powstaje cykliczny monofosforan guanozyny (cGMP). Jest to specjalistyczny przekaźnik, zaangażowany w relaksację mięśni gładkich, agregację płytek krwi i przetwarzanie bodźców wzrokowych. Uważany jest bardziej za wtórny przekaźnik bodźców nerwowych niż hormonalnych. Cykliczny GMP zmniejsza stężenie wapnia w cytosolu i powoduje rozkurcz komórek mięśniowych. Cykliczny GMP jest stosunkowo szybko rozkładany przez enzym fosfodiesterazę '5. Silnym wybiórczym inhibitorem fosfodiesterazy swoistej dla cGMP jest sildenafil (lek stosowany w leczeniu zaburzeń wzroku), który po doustnym podaniu wydłuża utrzymywanie się wysokiego stężenia cGMP, co prowadzi w efekcie do rozkurczu naczyń krwionośnych [20].

Leki rozszerzające naczynia tętnicze np. nitrogliceryna są metabolizowane z wytworzeniem tlenu azotu, który powoduje relaksację mięśni gładkich [3,5,21,22]. Tlenek azotu zmniejsza napięcie ściany naczyniowej poprzez rozkurcz mięśniówki gładkiej, zwłaszcza tętnicze oporowych, a rozszerzając naczynia krwionośne, tym samym obniża ciśnienie tętnicze krwi. Tlenek azotu hamuje proliferację i migrację komórek mięśniowych, a także agregację płytek krwi. Natomiast wpływ tlenu azotu na zmniejszenie adhezji płytek krwi i leukocytów do śródbłonka jest wynikiem zahamowania ekspresji adhezyn i integryn na powierzchni endotelium. Tlenek azotu pobudza funkcje fagocytarne makrofagów oraz fibrylizę. Ponadto tlenek azotu uczestniczy w przekazywaniu sygnałów wewnątrz komórki i między komórkami. Wszystko to przemawia za tym, że tlenek azotu jest niezbędny do prawidłowego funkcjonowania śródbłonka naczyniowego [16,18,23].

Tlenek azotu zaliczany jest do grupy wolnych rodników – pochodnych tlenowych. Może on reagować z innymi rodnikami tlenowymi np. anionorodnikiem nadadtlenkowym  $O_2^-$ . Do najważniejszych czynników uszkadzających błony komórkowe należą wolne rodniki. Głównym źródłem wolnych rodników w organizmie jest tlen. Małe ilości wolnych rodników występują fizjologicznie. Najbardziej wrażliwe na ich działanie są lipidy błon komórkowych i kwasy nukleinowe, a także białka i węglowodany.

W organizmie istnieje system obrony antyoksydacyjnej złożony z licznych czynników o właściwościach przeciw-utleniających. Sprawują one kontrolę nad produkcją wolnych rodników, neutralizują je lub naprawiają uszkodzenia nimi wywołane. Jeśli dojdzie do nasilonej ekspozycji na działanie oksydantów lub zostanie obniżona zdolność antyoksydacyjna wtedy dochodzi do stresu oksydacyjnego. Wytwarzany w większych ilościach w stresie oksydacyjnym anion nadadtlenkowy łączy się z NO w wyniku czego powstaje jon nadadtlenoazotynowy ONOO<sup>-</sup>. Nadadtlenoazotynowy wywołuje zmiany w białkach cytoszkieletu komórek śródbłonka,

reaction catalyzed by this enzyme, cyclic guanosine monophosphate is produced (cGMP). It is a specific transferring factor, involved in smooth muscles relaxation, blood platelets aggregation and visual stimulus processing. It is rather viewed as a secondary carrier of nervous than hormonal stimuli. Cyclic GMP decreases calcium concentration in cytosol and causes relaxation of muscle cells. Cyclic GMP is rather quickly decomposed by enzyme- fosfodiesteraze '5. A strong and selective inhibitor of phosphodiesterase, specific for cGMP is sildenafil (a medication administered in erection disorders therapy), which after oral administration extends time of high cGMP concentration, which in effect leads to blood vessels' relaxation [20].

Medications like nitroglycerine, dilating arterial vessels, are metabolized with nitrogen oxide production, which leads to smooth muscles relaxation [3,5,21,22]. Nitrogen oxide decreases tension of vessel wall through relaxation of smooth muscular coat, especially of resistant arterioles and by dilating blood vessels, it decreases arterial blood pressure. Nitrogen oxide inhibits proliferation and migration of muscle cells, and aggregation of blood platelets. Whereas influence of nitrogen oxide on decrease of blood platelets and leucocytes adhesion into endothelium is the result of inhibition of adhesines and integrines expression on the endothelium surface. Nitrogen oxide stimulates fibrinolysis and phagocytosis of macrophages. Additionally nitrogen oxide participates in transferring signals inside cell and between cells. It all makes nitrogen oxide indispensable for the proper functioning of endothelium [16,18,23].

Nitrogen oxide belongs to the group of free radicals – oxygen derivatives. It can react with other oxygen radicals such as superoxide anion radical  $O_2^-$ . Free radicals belong to the most important factors damaging cell membranes. The main source of free radicals in organism is oxygen. Small amounts of physiological free radicals can occur in organism. Cell membranes' lipids, nucleic acids, proteins and carbohydrates appear to be the most sensitive to free radicals activity.

There is a system of anti oxidizing defence in organism, built-up of several factors, showing anti – oxidizing properties. They control the production of free radicals, neutralize them and restore the damages. An oxidation stress is a consequence of an intensified exposure to oxidizing factors or of a decreased anti-oxidizing abilities. Produced in oxidation stress, in significant amounts superoxide anion, binds to NO, what results in superoxide nitric ion (ONOO<sup>-</sup>) synthesis. Superoxide nitrite causes changes in proteins of endothelium cells cytoskeleton, inhibits prostacycline syntase activity leading to decrease in prostacycline production. What is even more interesting, it has been proved that even superoxide nitrite inactivation with  $\alpha$  tocopherol does not decrease the threat, since during the reaction nitrogen dioxide is created which nitrates proteins leading to nitration stress. Nitration stress occurs in chronic inflammations and in anaemia/reper-

hamuje aktywność syntazy prostacyklinowej, a więc obniża wytwarzanie prostacykliny. Co ciekawe, udowodniono że nawet inaktywacja nadtlenuazotyenu a tokoferolem nie zmniejsza zagrożenia bowiem w reakcji tej powstaje dwutlenek azotu, który nitruje białka, powodując stres nitrozacyjny. Stres nitrozacyjny ma miejsce w przewlekłych stanach zapalnych oraz w stanach niedokrwienia/reperfuzji. Niestety okazało się, że stres ten jest nie mniej szkodliwy niż stres oksydacyjny. Jedynie g tokoferol wiążąc się nieodwracalnie z nadtlenu-azotynami zapobiega powstawaniu stresu nitrozacyjnego [24,25].

Wzrost syntezy tlenu azotu obserwowano w przebiegu wielu stanów patologicznych, między innymi w infekcjach bakteryjnych, wirusowych i chorobach układu nerwowego. Uważa się, że tlenek azotu odgrywa istotną rolę w patogenezie wstrząsu septycznego. **Podejrzewa się również, że tlenek azotu łącznie z innym wolnym rodnikiem – nadtlenuazotynem, bierze udział w powstawaniu wielu patologii okresu noworodkowego, takich jak: retinopatia wcześniacza, przetrwałe nadciśnienie płucne, martwicze zapalenie jelit** [23,26]. W eksperymentach na zwierzętach udowodniono, iż endogeny tlenek azotu jest włączany w mechanizmy zarówno pro- jak i anty-oksydacyjne [27,28]. Wielu badaczy uważa, że skaza krwotoczna w przebiegu mocznicy spowodowana jest dysfunkcją śródbłonna naczyń krwionośnych, który produkuje w nadmiarze prostacyklinę i tlenek azotu hamując w ten sposób czynność płytek krwi [29].

## CYTRULINA

Cytrulina jest to aminokwas niebiałkowy, który dostarczany jest z kilku źródeł.

- Jednym z nich jest omówiona wcześniej reakcja powstawania tlenu azotu z argininy przy udziale syntazy tlenu azotu.
- Druga możliwość to powstawanie cytruliny z ornityny w cyklu mocznikowym.
- Trzecia droga – to wykorzystanie asymetrycznej dimetyloargininy, jako substratu w reakcji.

Cytrulina często występuje w stanie wolnym [2,4]. Stężenie, jakie aminokwas ten osiąga w osoczu krwi ludzi jest znacznie niższe niż argininy i wynosi około 0,5 mg/100ml (30-50  $\mu\text{mol/l}$ ) [6]. Bardzo rzadko występuje zaburzenie w metabolizmie cytruliny, które objawia się wysokim stężeniem tego aminokwasu we krwi i moczu. Choroba ta spowodowana jest spadkiem lub całkowitym brakiem syntetazy arginino-bursztynianowej i prawdopodobnie jest dziedziczona, jako cecha recesywna. W zaburzeniu tym poza wysokim poziomem cytruliny można stwierdzić raczej niskie stężenia argininy [4]. Ponieważ cytrulina powstaje w ekwimolarnych ilościach w reakcji syntezy tlenu azotu z argininy to fakt ten może być wykorzystany w pośredniej metodzie oznaczania tlenu azotu. Uważa się, że dobrym parametrem odzwierciedlającym produkcję

fusion. Unfortunately this stress is not less harmful than oxidation stress. Only  $\alpha$  tocopherol binds irreversibly with superoxide nitrites preventing developing of the nitration stress. [24,25].

Increase of the nitrogen oxide synthesis was observed in course of several pathologies, including bacterial and viral infections and in disorders of the nervous system. It has been acknowledged that nitrogen oxide plays vital role in septic shock pathogenesis. **It is also suspected that nitrogen oxide together with another free radical-superoxide nitrite, participates in neonatal pathologies such as; premature retinopathy, persistent pulmonary hypertension, necrotic intestine inflammation** [23,26]. In experiments in animals it has been proved that endogenous nitrogen oxide is included into pro- as well as into anti - oxidizing mechanisms. [27,28]. Many research workers think that haemorrhagic diathesis in course of uremia is a result of disfunction of blood vessels endothelium which produces excess of prostacycline and nitrogen oxide, inhibiting in this way blood platelets activity. [29].

## CITRULINE

Citruline is a non protein aminoacid, which is derived from several sources.

- One of them is described above reaction of nitrogen oxide synthesis from arginine with the participation of nitrogen oxide synthase.
- The second possibility is creation of cytruline from ornitine in course of urea cycle.
- The third tract - is the use of asymmetric dimethylarginine, as a substrate in the reaction.

Citruline often occurs in free state [2,4]. The concentration which the aminoacid reaches in human blood serum is considerably lower than that of arginine and amounts around 0,5 mg/100ml (30-50  $\mu\text{mol/l}$ ) [6]. Disorders in citruline metabolism are rare; they result in high aminoacid concentration in blood and urine. The illness is caused by decrease or total lack of arginine-succinate synthetase and is probably inherited as recessive trait. In this disorder besides high level of citruline, rather low level of arginine is observed. [4]. Since in course of synthesis of nitrogen oxide from arginine, citruline is created in equimolar amounts, this fact can be utilized in indirect method of nitrogen oxide determination. It is acknowledged that coefficient of citruline to arginine concentration in blood is a good parameter reflecting nitrogen oxide production in organism. [2,4,5].

tlenku azotu w organizmie jest wartość współczynnika stężenia cytruliny do argininy we krwi [2,4,5].

## ARGININA I CYTRULINA A HYPOTROFIA PŁODU

Hypotrofia płodu oznacza niedobór masy ciała płodu w stosunku do masy należnej dla danego wieku ciążowego. Termin ten jest coraz częściej zastępowany określeniem: wewnątrzmaciczne zahamowanie (opóźnienie) wzrastania płodu IUGR (Intrauterine Growth Retardation). Według innej definicji wewnątrzmaciczna hypotrofia płodu to zaburzenie wzrostu płodu poniżej 10 percentyla lub wzrost mniejszy niż dwa odchylenia standardowe poniżej średniej dla danego okresu ciąży [30].

Podjęto próby ustalenia poziomu stężeń aminokwasów we krwi kobiet ciężarnych zarówno w ciąży prawidłowej, jak i powikłanej. Dotyczy to również takich aminokwasów, jak arginina, czy cytrulina. Zainteresowanie wzbudza też poziom wyżej wymienionych aminokwasów we krwi płodu w czasie ciąży powikłanej. W tych przypadkach jednak, trudność, ze względów etycznych, stanowi uzyskanie wyników z grupy kontrolnej. Piśmiennictwo podaje różne wartości stężeń argininy i cytruliny w surowicy krwi zdrowych kobiet ciężarnych od zbliżonych do wartości spotykanych u nieciężarnych do znacznie obniżonych. Przykładowo dla 30 tygodnia ciąży stwierdzono następujące stężenia L-argininy: 101 do 115  $\mu\text{mol/l}$ , a L-cytruliny od 27.4 do 29.8  $\mu\text{mol/l}$  w chromatografii cieczowej. Zdecydowanie niższe wartości argininy w surowicy krwi odnotowano w innych badaniach, gdzie w II trymestrze oznaczono argininę na poziomie  $37 \pm 3.3 \mu\text{mol/l}$  [30,31,32].

Jeszcze inaczej przedstawia się rzecz w ciąży powikłanej hypotrofią płodu. Według jednego z badaczy powikłanie to charakteryzuje się wyższym niż w ciąży prawidłowej stężeniem argininy. W tych przypadkach w II trymestrze ciąży oznaczono argininę na poziomie  $50.83 \pm 6.36 \mu\text{mol/l}$  i był to istotny wzrost tego aminokwasu w stosunku do grupy kontrolnej [30].

Zbadano także stężenia argininy we krwi płodu. Stwierdzono, że poziom argininy jest wyższy od stężeń oznaczanych w tym samym czasie we krwi matki, przy czym różnica jest wyraźna w ciąży prawidłowej i trochę mniejsza w przypadku hypotrofii płodu. Stężenie argininy we krwi 33 tygodniowego płodu znajdowano w zakresie od 24 do 124  $\mu\text{mol/l}$ , średnio:  $59 \pm 27$ , a cytruliny poniżej 20  $\mu\text{mol/l}$ , średnio- ślad [33]. Dość podobne stężenia argininy we krwi pępowinowej płodu w II trymestrze ciąży prawidłowej i powikłanej hypotrofią uzyskali inni autorzy. Tak samo, jak w poprzedniej pracy stwierdzono mniejszą różnicę między stężeniem argininy we krwi ciężarnej a stężeniem we krwi płodu w przypadkach hypotrofii. W badaniach tych nie oznaczano cytruliny, a wykorzystywaną metodą oznaczeń była chromatografia jonowymienna [30].

## ARGININE AND CITRULINE VERSUS FETUS HYPOTROPHY

Fetus hypotrophy determines fetus body mass deficiency in proportion to body mass due to appropriate pregnancy age. This term is replaced recently with a description: IUGR (Intrauterine Growth Retardation). According to another definition, intrauterine fetus hypotrophy is a disorder of fetus growth under 10 percenthyl or growth smaller than two standard deviations below the mean value for the defined pregnancy period. [30].

Trials aimed at determination of the aminoacids concentration levels in blood of pregnant women both in normal and in high-risk pregnancy have been undertaken. It concerns also such aminoacids like arginine or citruline. Also the level of the above mentioned aminoacids in the fetus blood in high-risk pregnancy was under investigation. In such cases, because of the ethics, difficult is getting test results from the control group. Literature presents arginine and citruline concentration values in blood serum of pregnant healthy women which differ from values close to those which can be obtained in non pregnant women to significantly lower. For example: for the 30 ties week of pregnancy the following L-arginine concentrations has been stated: from 101 to 115  $\mu\text{mol/l}$ , and for L-citruline from 27.4 to 29.8  $\mu\text{mol/l}$  tested with liquid chromatography. Definitely lower arginine values in blood serum were determined in other tests in which arginine level of  $37 \pm 3.3 \mu\text{mol/l}$  was determined in II trimester of pregnancy. [30,31,32].

The problem is different in case of pregnancy complicated with fetus hypotrophy. According to one of the research workers the disorder is characterized by higher than it is observed in normal pregnancy, arginine concentration. In such cases in II trimester of pregnancy, arginine was determined at the level of  $50.83 \pm 6.36 \mu\text{mol/l}$  and that was a substantial increase of the aminoacid in reference to the control group. [30].

Arginine concentrations in fetus blood were also determined. It was stated that the arginine level is higher than the concentrations determined at this same time in mother blood, and that difference is more visible in case of normal pregnancy and less visible in case of the fetus hypotrophy. The blood arginine concentration of fetus 33 weeks old, was found within range from 24 to 124  $\mu\text{mol/l}$ , mean:  $59 \pm 27$ ; for citruline below 20  $\mu\text{mol/l}$ , mean- a trace [33]. Similar arginine concentrations in fetus umbilical blood tested in II trimester of normal and complicated with hypotrophy pregnancy were obtained by another authors. Just as in the previous study, smaller difference between arginine concentration determined in pregnant women blood and fetus blood in course of hypotrophy was stated. In the above assays citruline was not determined, and the applied method was ion-exchange chromatography [30].

Według doniesień innego zespołu badaczy stężenie podstawowych aminokwasów we krwi pępowinowej u małych płodów jest znacząco obniżone w porównaniu z płodami o masie odpowiadającej wiekowi ciąży. Taką redukcję stężeń aminokwasów zaobserwowano także w przypadku płodów hypoksemicznych. Jako przyczynę tych zmian autorzy pracy podają zmniejszony przepływ maciczo-łożyskowy i/lub obniżenie aktywnego transportu błonowego w łożysku. Stwierdzono także, że poziomy niektórych aminokwasów były obniżone ze względu na zmniejszenie ich utylizacji. Tak było w przypadku stężenia argininy – jej stężenie w grupie ciężarnych z nieprawidłowymi wynikami badań dopplerowskich było znacznie obniżone, przy czym zaobserwowano w tej grupie badanej wzrost stężenia cytruliny [33].

### Śródbłonek naczyniowy i uwalnianie tlenu azotu a arginina

Nabłonek pochodzenia mezenchymalnego, który wyściela światło naczyń krwionośnych, jam serca i naczyń chłonnych nazywany jest śródbłonkiem (*endothelium*). Śródbłonek naczyniowy jest nabłonkiem pokrywającym, a dodatkowo jego istotna rola polega na syntezie, magazynowaniu, uwalnianiu lub unieczynnianiu wielu aktywnych biologicznie substancji. Komórki śródbłonka syntezują między innymi substancje powodujące rozkurcz naczyń krwionośnych: prostacyclinę i tlenek azotu, a także substancje silnie pobudzające skurcze miocytów gładkich naczyń krwionośnych: tromboksan i endoteliny. Wzrost syntezy i uwalniania prostacykliny i tlenu azotu, przy równoczesnym obniżeniu syntezy endoteliny i tromboksanu obserwuje się m.in. pod wpływem działania estrogenów.

Wyniki wieloletnich badań naukowych wykazały niezbicie, że śródbłonek uczestniczy w różnych procesach biologicznych, takich jak: zapalenie i angiogeneza. Udział śródbłonka w hemostazie związany jest z wydzielaniem w sposób ciągły lub okresowo wielu substancji, w tym czynnika V i VIII, czynnika tkankowego, czynnika aktywującego płytki, interleukin, czynników wzrostu dla mięśniówki gładkiej naczyń, molekuł adhezyjnych. Niektóre z wyżej wymienionych substancji zostały uznane za markery aktywacji śródbłonka.

Zdrowy śródbłonek pełni więc wiele różnorodnych funkcji w organizmie utrzymując równowagę między przeciwstawnie działającymi mediatorami i z tego powodu został uznany za fenomen hemostazy [15,34].

Uważa się, że przedłużona i nasilona aktywacja śródbłonka prowadzi do poważnych zaburzeń jego funkcji włącznie z nieodwracalną utratą integralności komórek. Dysfunkcja śródbłonka może być spowodowana między innymi przez: cytokiny, bakterie i wirusy, stres oksydacyjny, hiperhomocysteinemię [15,35-37]. Jeśli za przyczynę uszkodzenia śródbłonka przyjąć niedobór tlenu azotu to znanych jest wiele czynników wpływających na zmniejszenie jego syntezy.

According to another research workers group the basic aminoacids concentration in umbilical blood in little fetuses is considerably lower in comparison to the fetus showing weight appropriate to the pregnancy age. Such decrease in the aminoacids concentration was observed also in case of hypoxemic fetuses. As the cause of the disorders the authors give lower uterine-placental flow and/or decrease of the active membrane transfer in placenta. It was also stated, that concentration levels of some of the aminoacids were lower due to their utilization decrease. It occurred in case of arginine – its concentration in pregnant women with abnormal Doppler tests results was considerably lowered; in this tested group increase of citruline concentration was additionally observed. [33].

### Vessel endothelium and nitrogen oxide release versus arginine

Mesenchymal endothelium, coating blood vessels lumen, cardiac cavity and lymphatic vessels is called *endothelium*. Vessel endothelium is a coating epithelium; additionally its significant role relies on synthesis, storing, releasing or neutralizing of several biologically active substances. The endothelium cells synthesize among the others substances relaxing blood vessels: prostacycline and nitrogen oxide as well as substances strongly stimulating spasms of smooth blood vessels myocytes: tromboksan and endothelin. Enhancement of synthesis together with prostacycline and nitrogen oxide release followed by simultaneous decrease of endotheline and tromboksan synthesis is observed (for example) in the presence of estrogens activity.

The results of long term scientific research showed that endothelium participates in many biological processes, such as: inflammation and angiogenesis. Endothelium participation in homeostasis is connected with permanent or occasional secretion of various substances, including factor V and VIII, tissue factor, platelets activating factor, interleukins, vessels smooth muscular coat growth factors, adhesive molecules. Some of the mentioned above substances were acknowledged as endothelium activating markers.

Healthy endothelium has many different body functions; since it maintains balance between inversely acting mediators is recognized as a homeostasis phenomenon. [15,34].

It is acknowledged that prolonged and enhanced endothelium activation leads to severe disorders in its functioning, irreversible loss of cells integration including. Endothelium dysfunction among other things can be caused by: cytokines, bacteria and viruses, oxidizing stress, hyper homocysteinemy [15,35-37]. If deficiency of nitrogen oxide is recognized as the cause of the endothelium damage, then there are many known factors having influence on its synthesis inhibition. Deficiency of arginine – the substrate for nitrogen oxide synthesis can result from low arginine transfer factor activity, or increased decomposition of arginine by



Niedobór substratu do syntezy tlenku azotu tj. argininy może wynikać z niskiej aktywności czynnika transportującego argininę, albo zwiększonego rozkładu argininy przez enzym – arginazę. Inne przyczyny to zahamowanie enzymatycznej konwersji L-argininy w tlenek azotu spowodowane przez niską aktywność NOS wskutek obecności antagonistów tego enzymu lub wskutek zmniejszonej ekspresji genu NOS, czy zmniejszoną synteza samego białka enzymatycznego NOS. Niskie stężenie tlenku azotu może być też wynikiem zwiększonej jego degradacji w czasie stresu oksydacyjnego i obecności dużej ilości nadtlenu [16].

Wyniki wieloletnich badań naukowych sugerują, że nieprawidłowe działanie śródbłonna może mieć istotny udział w rozwoju między innymi: miażdżycy, choroby niedokrwiennej serca, nadciśnienia [15,39-44]. W związku z tym wydaje się, że dysfunkcję śródbłonna można zmniejszyć poprzez zastosowanie egzogennej L-argininy, jako donora tlenku azotu. Suplementacja L-argininą otwiera więc możliwości terapii pomocniczej w leczeniu wyżej wymienionych schorzeń, jak i wielu innych stanów chorobowych [11,18,38,45-48]. Dlatego podjęto także próby stosowania L-argininy w stanach niedokrwienia i niedotlenienia łożyska, w takich patologii ciąży, jak nadciśnienie indukowane ciążą (PIH), czy w hypotrofii płodu. Należy przy tym podkreślić, że zwłaszcza **leczenie wewnątrzmacicznej hypotrofii płodu argininą przyniosło dobre efekty kliniczne**. Po terapii tym aminokwasem obserwowano w znacznej liczbie przypadków całkowite wyleczenie w postaci wyrównania wewnątrzmacicznego wzrastania płodów i osiągnięcie masy ciała charakterystycznej dla płodów eutroficznych lub znaczny przyrost masy ciała płodów [49-55].

enzym arginase. Other causes: inhibition of enzymatic conversion of L-arginine into nitrogen oxide caused by low NOS activity – this can be a result of the presence of NOS antagonists, decreased NOS gene expression, or decreased synthesis of the enzymatic protein NOS itself. Low nitrogen oxide concentration can also be a result of its degradation enhancement in course of oxidizing stress and presence of significant amount of peroxides [16].

The scientific research results of many years suggest, that malfunctioning of endothelium can have significant share in development of such illnesses as among the others: atheromatosis, myocardial ischemia, hypertension [15,39-44]. In connection with this it is suggested that endothelium dysfunction can be decreased by exogenous L-arginine administration – the nitrogen oxide donor. L-arginine therapy brings many opportunities of supporting treatment in healing of the above mentioned illnesses, and many other diseases [11,18,38,45-48]. This is why an attempt was made to administrate L-arginine in ischemia and hypoxia of placenta, in such pregnancy pathologies as hypertension induced by pregnancy (PIH), or fetus hypertrophy. It should be underlined that, especially **treatment with arginine of inter uterine hypotrophy of fetus gave positive clinical effects**. After treatment with this aminoacid, total recovery was observed in considerable number of cases. Inter uterine fetus growth was compensated and the body mass characteristic for the eutrophic fetuses or significant growth of fetus body mass was observed. [49-55].

#### Piśmiennictwo / References:

1. **Kączkowski J.** Podstawy biochemii. Warszawa. PZWT 2004.
2. **Loscalzo J.** What we know and don't know about L-arginine and NO. *Circulation* 2000; 101:2126-2131.
3. **Moncada S, Higgs A.** The L-arginine-nitric oxide pathways. *N Engl J Med* 1993;329: 2002-2012.
4. **Murray RK, Grauner D, Mayes P.** Biochemia Harpera. Warszawa. PZWL 1998.
5. **Rytlewski K, Olszanecki R, Zdebski Z.** Badania kliniczne nad znaczeniem egzogennej L-argininy w przebiegu ciąży. W: Zdebski Z. (red.). Problemy współczesnej perinatologii. Kraków 2001:303-323.
6. **Pawelski P, Maj S.** Normy i diagnostyka chorób wewnętrznych. Warszawa. PZWL 1993.
7. **Paddon-Jones D, Borsheim E, Wolfe R.** Potential ergogenic effects of arginine and creatinine supplementation. *J Nutr* 2004; 134:2888S-2894S.
8. **Morris S:** Enzymes of arginine metabolism. *J Nutr* 2004; 134:2743S-2747S.
9. **Morris SM Jr.** Recent advances in arginine metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2004; 7:45-51.
10. **Boger R.** Role of nitric oxide in the haemodynamic effects of growth hormone. *Growth Horm IGF Res* 1998; 8:163-165.
11. **Giuliano D, Marfella R, Verazzo G, et al.** The vascular effects of L-arginine in humans: the role of endogenous insulin. *J Clin Invest* 1997; 99:433-438.
12. **Pawlikowski M.** Regulacja wydzielania hormonu wzrostu (GH) i insulino-podobnego czynnika wzrostowego I (IGF-I). *Endokrynologia Polska* 1999; 50:5-10.
13. **Evans L, Davies J, Goodfellow J, et al.** Endothelial dysfunction of hypopituitary adults with growth hormone deficiency. *Clin Endocrinol* 1999; 50(4):457-464.
14. **Sawicka B.** Rola śródbłonna naczyniowego w fizjologii układu hemostazy. Znaczenie diagnostyczne markerów jego uszkodzenia. *Magazyn Medyczny* 2002; 9:31-35.
15. **Malczewska-Malec M.** L-arginina w chorobach układu krążenia. *Czyniki Ryzyka* 1999; 2-3:4-12.
16. **Morris N, Sooranna S, Learmont J, et al.** Nitric oxide synthase activities in placental tissue from normotensive, pre-eclamptic and growth retarded pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol* 1995; 102:711-714.

17. **Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG.** Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; 357:593-615.
18. **Mount Pf, Power DA.** Nitric oxide in the kidney; functions and regulation of synthesis. *Acta Physiol* 2006; 187:433-446.
19. **Lau T, Owen W.** Arginine, citrulline, and nitric oxide metabolism end stage renal disease patients. *J Clin Invest* 2000; 105:1217-1228.
20. **Lacassie H, Germain A, Valdes G, et al.** Management of Eisenmenger Syndrom in Pregnancy with sildenafil and L-arginine. *Obstet Gynecol* 2004;103:1118-1120.
21. **Chambers J, McGregor A.** Acute hyperhomocysteinemia and endothelial nitric oxide synthase. *Lancet* 1998;351:36-37.
22. **Wu G, Morris SM Jr.** Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* 1998; 336:1-17.
23. **Annae D, Sanquer S, Sebillle V, et al.** Compartmentalised inducible nitric-oxide synthase activity in septic shock. *Lancet* 2000; 355:1143-1158.
24. **Suchocka Z.** Antyoksydacyjny paradoks witaminy E. *Czynniki Rzyzka* 2003; 38/39:58-66.
25. **Kornacki J, Koźlik J, Dubiel M, i wsp.** Ocena stresu oksydacyjnego i jego korelacji z przepływami krwi w tętnicach macicznych u kobiet ze stanem przedzrzucaawkowym. *Gin Pol* 2004; 75, 9: 682-689.
26. **Pawłowska-Góral i wsp.** Całkowity potencjał antyoksydacyjny, metody pomiaru, przydatność kliniczna. *Diag Lab* 2003; 39:327-338.
27. **Frankiewicz-Józko A, Grudziński I.** Wpływ suplementacji L-argininą na zmiany peroksydacji lipidów w układzie wątroba/jelitka u trenowanych biegowo szczurów. *Żywnie człowieka i metabolizm* 2003; 3-4:1220-1223.
28. **Karolkiewicz J, Pyska M, i wsp.** Zaburzenia równowagi peroksydacyjno-antyoksydacyjnej we krwi ciężarnych z nadciśnieniem indukowanym ciążą. *Diag Lab* 2001; 37(sup.)2:152.
29. **Walkowiak B, Kwaszewska E, Koziolkiewicz W.** Skaza krwotoczna w przewlekłej niewydolności nerek. *Diag Lab* 2001; 2:171-181.
30. **Cetin I, Corbetta C, Sereni L.** Umbilical amino acid concentrations in normal and growth-retarded fetuses sampled in utero by cordocentesis. *J Obstet Gynecol* 1990; 162:253-261.
31. **Benedetto Ch, Marozio L, Neri I, et al.** Increased L-Citrulline/L-Arginine plasma ratio in severe preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2000; 96:395-399.
32. **Kamoun P, Droin V, Forestier F.** Free amino acids in human fetal plasma. *Clinica Chimica Acta* 1985; 150:227-230.
33. **Karsdorp V, van Vugt J, Jakobs C, et al.** Amino acids, glucose and lactate concentrations in umbilical cord blood in relation to umbilical artery flow patterns. *Eur J Obstet Gynecol Repr Biol* 1994; 57:117-122.
34. **Sawicka B.** Wpływ estrogenów na układ hemostazy i powikłania zakrzepowe. *Magazyn Medyczny* 2003; 4:39-44.
35. **Guzik TJ, Guzik TA, Jopek A, i wsp.** Patomechanizmy dysfunkcji śródbłonna naczyniowego w miażdżycy. *Czynniki Rzyzka* 2004; 1-2:8-22.
36. **Matras P, Solski J.** Homocysteina- znaczenie w ateros i tromboogenezie. *Magazyn Medyczny* 2003; 4:24-29.
37. **Uszyński W, Uszyński M.** Dwie hipotezy stanu przedzrzucaawkowego: hipoteza śródbłonna i hipoteza zapalna. *Gin Pol* 2003; 74, 3:237-244.
38. **Mierzyński R, Leszczyńska-Gorzela B.** Ocena produkcji tlenu azotu u pacjentek z ciążą powikłaną pre-eklampsją, nadciśnieniem w ciąży oraz ciążą niepowikłaną nadciśnieniem. XXVIII Kongres PTG w Bydgoszczy. 2003; supl.1:159.
39. **Noris M, Todeschini M, Cassis P.** L-arginine depletion in preeclampsia orients nitric oxide synthase toward oxidant species. *Hypertension* 2004; 43:614.
40. **Norris L, Higgins J, Darling M, et al.** Nitric Oxide in the Uteroplacental, Fetoplacental, and Peripheral Circulations in Preeclampsia. *Obstet Gynecol* 1999; 93:958-63.
41. **Adamkiewicz B.** Hiperhomocysteinemia a ryzyko udaru mózgu. *Aktualności Neurologiczne* 2003; 2-3:236-244.
42. **Cannon R, Schechter A, Panza J.** Effects of inhaled nitric oxide on regional blood flow are consistent with intravascular nitric oxidedelivery. *J Clin Invest* 2001; 108:279-287.
43. **Champion HC, Skaf MW, Hare JM.** Role of nitric oxide in the pathophysiology of heart failure. *Heart Fail Rev* 2003; 8:35-46.
44. **Pernow J, Bohm F, Beltrom E, et al.** L-arginine protects from ischemia-reperfusion induced endothelial dysfunction in humans in vivo. *J Appl Physiol* 2003; 95:2218-2222.
45. **Bleum A, Hathaway L, Mincemoyer R.** Oral L- arginine in patients with coronary artery disease on medical management. *Circulation* 2000; 101:2160-2164.
46. **Domagała B, Sanak M, Czachór R, i wsp.** Hiperhomocysteinemia i jej związek z miażdżycą tętnic. *Pol Arch Med Wew* 1997; 98:153-162.
47. **Lerman A, Burnett J, Higano S.** Long term L-arginine supplementation improves small-vessel coronary endothelial function in humans. *Circulation* 1998; 97:2123-2128.
48. **Maxwell AJ, Ho HK, Le ChQ.** L-arginine enhances aerobic exercise capacity in association with augmented nitric oxide production. *J Appl Physiol* 2001; 90:933-938.
49. **Germain A, Valdes G, Romanik M.** Evidence supporting a beneficial role for long-term L- Arginine supplementation in high-risk pregnancies. *Hypertension* 2004; 44: e1.
50. **Hladunewich M, Derby G, Lafayette R, et al.** Effect of L-arginine therapy on the glomerular injury of preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2006; 107:886-895.
51. **Kubicki J, Kowalczyk D, Chowaniec M, Mączka M.** Zastosowanie L-argininy, nośnika NO, w leczeniu zespołu wewnątrzmacicznego zahamowania wzrostu płodu w materiale Szpitala Ginekologiczno-Położniczego w Opolu. XXVIII Kongres PTG w Bydgoszczy, 2003; supl.1:120.
52. **Lampariello C, De Blasio A, Merenda A, et al.** Impiego dell'arginina nel ritardo di crescita asimmetrico(IUGR).Authors experience. *Minerva Ginecol* 1997; 49:577-81.
53. **Mierzyński R, Leszczyńska-Gorzela B.** Ocena stężeń argininy i cytruliny oraz wpływu podawania L-argininy na zachowanie się tych parametrów u pacjentek z ciążą powikłaną preeklampsją, nadciśnieniem w ciąży oraz ciążą niepowikłaną nadciśnieniem. XXVIII Kongres PTG w Bydgoszczy, 2003; supl.1:158.
54. **Neri I, Mazza V, Galass C, et al.** Effects of L-arginine on utero-placental circulation in growth-retarded fetuses. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1996; 75:208-212.
55. **Rogozewski M, Skrobarczyk J, Szuścik P, Grudziński J.** Zastosowanie tlenu azotu (NO) w leczeniu wybranych przypadków patologii ciąży. XXVIII Kongres PTG w Bydgoszczy, 2003; supl.1:217.