تاثیر N-nitro-L-arginine methyl ester (L- NAME) بر ضخامت و تعداد سلول‌های عضله صاف حلقوی پیلور جنین موش صحرایی

معصومه ثقه الاسلام.M.Sc [۱*]، تابنده شریعتی .Ph.D [۲]، بهنام الدین جامعی .Ph.D [۳]

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کاشمر، گروه آناتومی
۲. دانشگاه علوم پزشکی ایران، مرکز علوم پایه، گروه آناتومی
۳. دانشگاه علوم پزشکی ایران، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی

* آدرس مکاتبه: کاشمر، صندوق پستی: ۱۶۱، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کاشمر
پست الکترونیک: Email: anita49b@yahoo.com

چکیده

دریافت مقاله: ۸۴/۳/۱، پذیرش مقاله: ۸۴/۱۰/۱۲

* **هدف:** بررسی اثر ماده مهار کننده نیتریک اکساید بر ضخامت و تعداد سلول‌های عضله صاف حلقوی پیلور جنین موش صحرایی

* **مواد و روش‌ها:** اثرات کمبود سنتز NO به صورت استفاده از ماده مهار کننده سنتز NO، N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) در دوران بارداری موش‌های صحرایی بر لایه عضلانی پیلور جنین آنها مورد بررسی قرار داده شد. به این ترتیب که محلول L-NAME در نرمال سالین به مقدار ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه و به موش‌های صحرایی باردار نژاد Sprague-Dawley در یک هفته وسط (گروه دو) و یک هفته آخر (گروه یک) بارداری به صورت داخل صفاقی تزریق شد. جنین‌ها روز ۲۱ بارداری از رحم بیرون آورده و معده ودوازدهه از بدن آنها خارج شد. متعاقب آن مراحل ثبوت و پاساژ بافتی وتهیه مقاطع ۵ میکرونی، رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون و پاپ نیکولا انجام شد و سپس لام‌ها در زیر میکروسکوپ نوری از لحاظ ضخامت لایه عضلانی به وسیله عدسی مدرج خطی و تعداد سلول‌های آن به وسیله عدسی شطرنجیEye-piece مورد بررسی قرار گرفتند. برای تجزیه وتحلیل آماری اطلاعات به دست آمده از روش آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون چند دامنه دانکن استفاده شد.

* **یافته‌ها:** تجزیه وتحلیل آماری نتایج حاصل از مطالعات میکروسکوپی نشان داد که مصرف این مقدار ماده مهارکننده سنتز NO در جنین های گروه تجربی یک، که در هفته آخر جنینی در معرض این ماده قرار گرفته بودند، باعث بروز تغییرات معنی داری ($p<0.01$) از جمله هیپرتروفی وهیپرپلازی عضله صاف حلقوی پیلور در مقایسه با سایر گروه‌ها شد. در حالی که در گروه تجربی دو که در یک هفته وسط در معرض همین مقدار از L-NAME قرار گرفته بودند و همچنین در گروه‌های کنترل که فقط آب مقطر دریافت کرده بودند، نتایج به دست آمده این تغییرات را نشان نداد.

* **نتیجه گیری:** در اثر کاهش تولید NO در سلول اثر مهاری آن بر روی رشد سلول برداشته شده و باعث تکثیر بیش از حد (هیپرپلازی) و تجمع مواد درون سلول (هیپرتروفی) می شود. بنابراین کمبود NO در اواخر دوران بارداری مادران می‌تواند منجربه تنگی پیلور جنین شود.

کلیدواژگان: نیتریک اکساید، ماده سنتزکننده نیتریک اکساید، ماده مهار کننده سنتز نیتریک اکساید (ان- نیترو- ال- آرژینین متیل استر)، عضله صاف حلقوی پیلور

فصلنامه پزشکی یاخته، سال هشتم، شماره ۱، بهار ۸۵، صفحات ۶-۱

مقدمه

N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) یک ماده مهارکننده سنتز نیتریک اکساید (NO) است که با مهار کردن آنزیم سنتز کننده NO(NOS) در بدن مانع از آزاد شدن NO می‌شود (۱). NO در داخل بدن از اسید آمینه L-arginine به کمک آنزیم سنتزکننده NO ساخته می شود (۲) و در تعدادی از فرآیندهای فیزیولوژیک ، یک تنظیم کننده مهم است (۳). در بدن دو نوع ایزوفرم از این آنزیم موجود است: نوع ساختمانی (Constitutive) و القایی (Inducible) (۳، ۴، ۵، ۶). نوع ساختمانی درتونوسینه عروق (۲)، میانجی‌گری عصبی (۷) و تجمع پلاکتی (۸) نقش دارد. درحالی که نوع القایی آن در جریان التهاب بافتی و دفاع سلولی (۳) نقش دارد.

تعدادی از مهارکننده‌های آنزیم سنتزکننده NO نظیر L-NAME شناخته شده‌اند که از لحاظ ساختمانی آنالوگ L-arginine هستند و قادرند تا هر دو نوع ایزوفرم ساختمانی و القایی را مهار کنند (۳، ۹).

همچنین مشخص شده است در دوران بارداری میزان تولید NO افزایش می‌یابد و چون این مولکول یک وازودیلاتور مشتق ازعروق است و بر روی نوتروفیل‌ها، تجمع پلاکتی و تونوسیته عروق اثرات مهمی می‌گذارد، می‌تواند در تنظیم جریان خون و تبادل اکسیژن و مواد غذایی جفت دراین دوران موثر باشد (۱۰).

در سال‌های اخیر محققان گزارش کرده‌اند که در هفته سوم دوران بارداری موش‌های صحرایی، مهار NOS به وسیله L-NAME منجر به کاهش رشد داخل رحمی و تخریب اندام تحتانی جنین می‌شود (۱، ۱۰). همین‌طور می‌دانیم یکی از اختلالات دوران جنینی که از دو قرن گذشته مورد توجه بوده استنوزهیپرتروفیک پیلور کودکان (IHPS: Infantile Hypertrophic Pyloric Stenosis) است (۱۱) که لایه عضلانی حلقوی پیلور ضخیم شده و در نتیجه محتویات معده به داخل روده تخلیه نشده و برمی‌گردد (استفراغ جهنده) (۱۲، ۱۳).

محققان طی تحقیقاتی این طور احتمال داده‌اند که یکی از علل این مساله می‌تواند عدم سنتز نیتریک اکساید در ناحیه پیلور باشد (۱۱، ۱۴، ۱۵، ۱۶). در این تحقیق اثرات کمبود سنتز NO با استفاده از ماده مهارکننده سنتز نیتریک اکساید L-NAME دریک هفته وسط و پایانی دوران بارداری موش‌های صحرایی بر روی عضله حلقوی پیلور جنین موش صحرایی مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق ازتعداد ۲۰ سر موش صحرایی ماده نژاد Sprague-Dawley استفاده شد.

موش‌های بالغ دوتا سه ماهه و دارای وزن تقریبی ۱۸۰ تا ۲۲۰ گرم بودند و در حیوان خانه در دمای ۲۳ تا ۲۷ درجه سانتی‌گراد و دوره ۲۴ ساعته روشنایی – تاریکی نگهداری می‌شدند. رژیم غذایی آنها همانند سایر موش‌ها بود و محدودیتی اعمال نشد. موش‌های ماده با چنین شرایطی جهت انجام جفت‌گیری به نسبت ۲ به ۱ با موش‌های نر جفت شدند و صبح روز بعد در صورت مشاهده پلاک واژینال، آن روز به عنوان روز صفر حاملگی در نظر گرفته می‌شد. در این تحقیق ماده مصرفی (L-NAME) از شرکت مواد شیمیایی سیگما (Sigma) تهیه شد. این ماده روزانه به مقدار ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در یک میلی‌لیتر نرمال سالین استریل محلول و به روش داخل صفاقی تزریق می‌شد (۳، ۱۰). علت انتخاب این دوز بر پایه تحقیقات انجام شده قبلی بر روی این ماده در ارتباط با کاربرد آن در اختلالات التهابی روده و معده و اختلالات عروقی است. نمونه‌گیری به صورت تصادفی انجام شد. به این ترتیب که برای هر گروه، از ۵ سر موش صحرایی ماده استفاده شد و گروه‌ها شامل: گروه کنترل یک، تجربی یک، کنترل دو و تجربی دو بودند.

به موش‌های باردار گروه کنترل‌یک، روزانه یک میلی‌لیتر نرمال سالین استریل به مدت ۷ روز از روز هشتم تا چهاردهم بارداری روزانه تزریق شد و موش‌های گروه تجربی یک، روزانه ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ماده L-NAME به مدت ۷ روز از روز هشتم تا چهاردهم بارداری دریافت کردند. به موش‌های گروه کنترل دو، روزانه یک میلی‌لیتر نرمال سالین استریل به مدت ۷ روز از روز چهاردهم تا بیستم بارداری تزریق شد و موش‌های گروه تجربی دو، روزانه ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ماده L-NAME به مدت ۷ روز از روز چهاردهم الی بیستم بارداری دریافت کردند.

نتایج شمارش تعداد جنین‌های به دست آمده از تمام گروه‌ها در پایان بارداری به قرار زیر است:

تعداد جنین‌های گروه کنترل یک ۳۱ عدد، تعداد جنین‌های گروه تجربی یک ۱۸ عدد، تعداد جنین‌های گروه کنترل دو ۳۰ عدد و تعداد جنین‌های گروه تجربی دو ۲۵ عدد.

در تمام گروه‌ها روز بیست و یکم (پایان دوره بارداری) موش‌های باردار با دوز Lethal اتر کشته شدند. جنین‌های استخراج شده با روش سزارین، پس از جدا کردن جفت‌ها و شستشو در محلول نرمال سالین به مدت دو ساعت در محلول فیکساتیو بوئن قرار گرفتند. سپس با برش عرضی روی شکم جنین‌ها معده و دوازدهه از بدن خارج شد و به مدت ۲۴ ساعت داخل محلول فیکساتیوبوئن قرار گرفت. پس از مرحله ثبوت بافتی، مراحل آماده‌سازی شامل آب‌گیری ، شفاف‌سازی ، قالب‌گیری بر روی نمونه‌ها انجام شد. سپس با استفاده از میکروتوم روتاری، برش‌های پنج میکرونی سریال تهیه و پس از انتقال بر روی لام‌های ژلاتینه به دو روش تری کروم ماسون و پاپ نیکولا رنگ‌آمیزی شد. در رنگ‌آمیزی اول بافت‌های هم‌بند و عضلانی و مخاطی رنگ‌های مجزا به خود می‌گیرند و از هم قابل افتراق هستند. در رنگ‌آمیزی دوم هسته سلول‌ها کاملا قابل مشاهده و شمارش می‌شوند. پس از رنگ‌آمیزی ارزیابی‌های مورفومتری به کمک دو نوع عدسی مشبک و خطی انجام گرفت. با توجه به اینکه مقاطع به دست آمده از پیلور جنین‌ها به صورت سریال برروی لام‌ها قرار داده و از هر پیلور در حدود ده لام ده سریالی تهیه شد، جهت شمارش از هر پیلور پنج لام انتخاب و از هر لام پنج مقطع به صورت یک در میان شمارش شد. به این ترتیب که به کمک عدسی مشبک تعداد سلول های لایه عضلانی صاف حلقوی پیلور در سطح مقطع ۱۰×۱۰در میدان دید میکروسکوپ شمارش و به کمک عدسی خطی ضخامت لایه عضلانی صاف حلقوی پیلور در واحد میکرون با بزرگنمایی عدسی ۱۰× و ۴۰× اندازه‌گیری شد.

کلیه داده‌ها ابتدا توسط نرم افزار SPSS مورد تجزیه واریانس قرار گرفتند، سپس میانگین‌ها با آزمون چند دامنه دانکن و تی‌تست غیر وابسته در سطح احتمال ۱درصد ($p<0/01$) مقایسه شدند.

یافته‌ها

بررسی های ماکروسکوپی

بررسی شکل ظاهری

شکل ظاهری جنین‌ها بلافاصله بعد از تولد بررسی شد و با توجه به اینکه جنین‌ها در روز بیست و یکم بارداری از رحم خارج شده بودند انتظار می‌رفت که مشخصات ظاهری یک نوزاد کامل موش صحرایی را داشته باشند. درگروه‌های کنترل یک و دو و گروه تجربی یک،

جنین‌های به دست آمده همگی سالم بودند و هیچ‌گونه ناهنجاری را نشان ندادند. اما در گروه تجربی دو، حدود ۲۸درصد از جنین‌ها دچار تخریب اندام تحتانی یک و یا دو طرفه بودند.

بررسی های میکروسکوپی

بررسی های کیفی

نتایج ارزیابی‌های کیفی مقاطع تهیه شده از پیلور جنین‌ها نشان می‌دهد که در گروه‌های کنترل یک و دو و تجربی یک آرایش سلولی عضله صاف حلقوی پیلور طبیعی بوده و هسته سلول‌ها همان‌طور که انتظار می‌رود دوکی شکل هستند (شکل ۱A، ۱B). در گروه تجربی دو، مقاطع به دست آمده از پیلور جنین‌هایی که ظاهرا سالم بودند و اختلالی را نشان نمی‌دادند همانند گروه‌های قبلی آرایش سلولی لایه عضلانی حلقوی پیلور طبیعی و هسته سلول‌ها دوکی بودند. ولی این مقاطع در جنین‌های دچار ناهنجاری ظاهری (تخریب اندام تحتانی) ظاهر طبیعی نداشت. آرایش و نظم سلولی لایه عضلانی حلقوی کاملا به هم خورده بود و سلول‌ها متورم و به دلیل هیپرتروفی، سلول‌ها دارای هسته‌های گرد بودند (شکل ۱C).

ارزیابی های مورفومتری

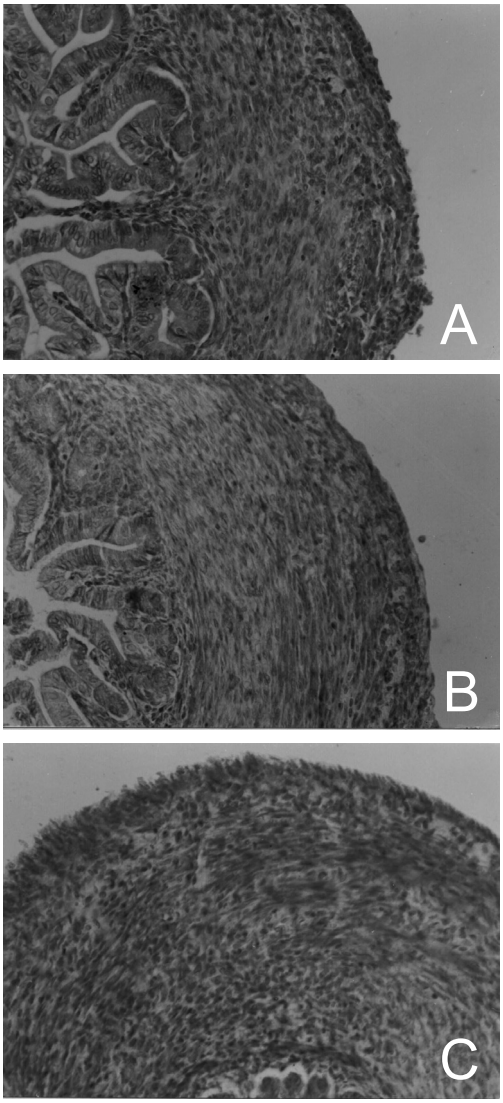
ضخامت عضله صاف حلقوی پیلور جنین

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که در گروه‌های مورد مطالعه ضخامت عضله صاف حلقوی پیلور جنین در گروه تجربی دو با میانگین ۸۷/۹۲±۱۳ میکرون به طور معنی‌داری بیشتر از سایر گروه‌ها است و ضخامت عضله صاف حلقوی پیلور جنین در گروه کنترل دو با میانگین ۷۳/۵±۵ میکرون بدون تفاوت معنی‌دار نسبت به سایر گروه‌ها دارای کمترین مقدار است (نمودار۱).

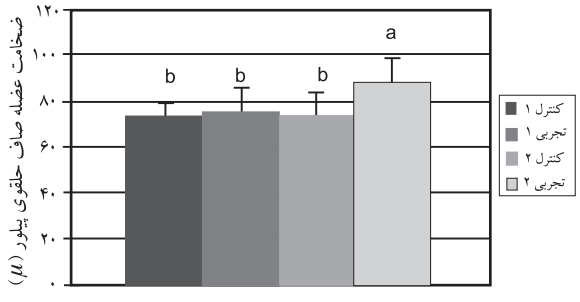
تعداد سلول‌های عضله صاف حلقوی پیلور جنین

در خصوص اندازه‌گیری این پارامتر باید گفت نتایج به دست آمده حاکی از آن است که در گروه‌های مورد مطالعه تعداد سلول‌های عضله صاف حلقوی پیلور جنین شمارش شده در واحد سطح نیز در گروه تجربی دو با میانگین ۴۵/۴±۵ سلول به طور معنی‌داری بیشتر از سایر گروه‌ها است و تعداد سلول‌های عضله صاف حلقوی پیلور جنین در گروه تجربی یک با میانگین ۳۴/۶±۲ سلول بدون تفاوت معنی‌دار نسبت به سایر گروه‌ها دارای کمترین مقدار است (نمودار۲).

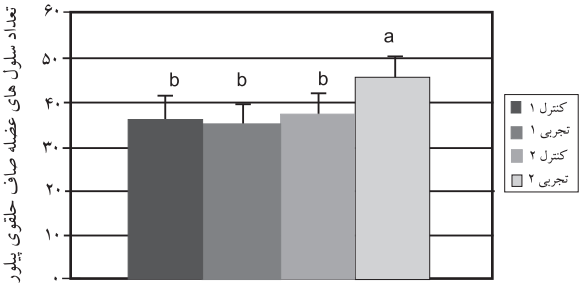
همان‌طور که مشاهده شد جنین‌های گروه تجربی دو در دو گروه تقسیم‌بندی شدند؛ یعنی جنین‌های طبیعی و جنین‌های دچار تخریب اندام تحتانی. بنابراین با یک مقایسه آماری درون گروهی می‌توان نتیجه گرفت که ضخامت و تعداد سلول‌های عضله صاف حلقوی پیلور جنین در گروه دچار تخریب اندام تحتانی به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه سالم افزایش یافته است (نمودار ۳، ۴).



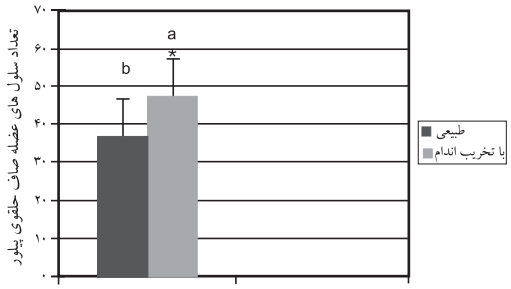
شکل ۱: مقطعی از پیلور گروه های کنترل یک و دو وتجربی یک (A,B) ، مقطعی از پیلور جنین دچار تخریب اندام تحتانی در گروه تجربی دو(C) .



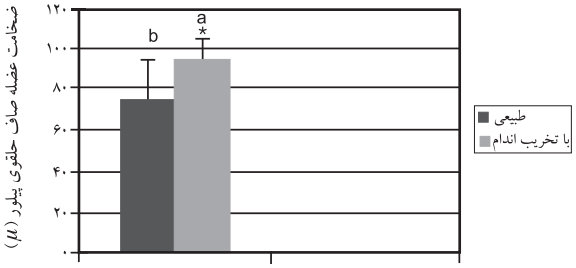
نمودار ۱: مقایسه میانگین ضخامت عضله صاف حلقوی پیلور جنین در گروه‌های مورد مطالعه. در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل در یک حرف مشترک هستند فاقد تفاوت آماری بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال $p<0/01$ می‌باشند.



نمودار ۲: مقایسه میانگین تعداد سلول‌های عضله صاف حلقوی پیلور جنین در گروه‌های مورد مطالعه. در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل در یک حرف مشترک هستند فاقد تفاوت آماری بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال $p<0/01$ می‌باشند.



نمودار ۳: مقایسه میانگین تعداد سلول‌های عضله صاف حلقوی پیلور در جنین‌های طبیعی و دچار تخریب اندام تحتانی ($p<0/01$*).



نمودار ۴: مقایسه میانگین ضخامت سلول‌های عضله صاف حلقوی پیلور در جنین‌های طبیعی و دچار تخریب اندام تحتانی ($p<0/01$*).

بحث

در این تحقیق مشاهده شد که تجویز ماده مهارکننده تولید نیتریک اکساید (L-NAME) در هفته آخر دوران بارداری موش‌های صحرایی سبب ایجاد ناهنجاری اندام تحتانی به صورت نکروز بافتی اندام و اختلالات بافتی نظیر افزایش در تعداد و ضخامت سلول‌های لایه عضلانی حلقوی پیلور در جنین آن‌ها می‌شود.

این نتایج در ارتباط با توانایی L-NAME در مهار تولید نیتریک اکساید در بدن و همچنین وابسته به زمان مصرف آن است. زیرا همان‌طور که مشاهده شد در صورتی که L-NAME در هفته وسط بارداری به موش‌ها تزریق شود این علایم در جنین بروز نمی‌کند ولی در صورت مصرف آن در هفته پایانی بارداری در تعدادی از جنین‌ها علایم ماکروسکوپی و میکروسکوپی همراه با هم دیده می‌شوند.

همانطور که می‌دانیم L-NAME فعالیت انواع NOS ساختمانی را به طور واضحی مهار می‌کند و می‌دانیم که یکی از انواع این آنزیم‌ها (نوع ۳) که به آن NOS نوع اندوتلیالی یا eNOS می‌گویند در اندوتلیوم عروق خونی واقع شده است (۱۷). بنابراین در صورت مهار فعالیت این نوع آنزیم سنتز کننده NO، نیتریک اکساید به میزان کافی در بافت تولید نمی‌شود و در نتیجه کار خود را که شل کردن عضله صاف عروق خونی و جلوگیری از تجمع پلاکتی است به درستی انجام نمی‌دهد. عوارض این کمبود تولید NO در بدن جنین می‌تواند به صورت کاهش رشد داخل رحمی و نکروز اندام تحتانی بروز کند (۳، ۴، ۱۰).

مهم‌ترین نتیجه به دست آمده از این تحقیق تغییرات بافتی عضله صاف حلقوی پیلور به صورت افزایش در ضخامت و تعداد سلول‌های آن در جنین‌های در معرض ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ماده L-NAME در هفته آخر بارداری در مقایسه با سایر گروه‌ها است. در بخش یافته‌ها دیدیم که پیلور جنین‌هایی از این گروه (تجربی دو) تغییرات بافتی را به صورت میکروسکوپی نشان می‌دهند که دچار تخریب اندام تحتانی شده‌اند. برای توجیه آن باید گفت که ما می‌دانیم در مجرای معدی-روده‌ای، عضلات اسفنکتری و غیر اسفنکتری انقباضات تونیک خود را تحت کنترل شبکه عصبی میانتریک انجام می‌دهند و در این شبکه عصبی وجود NOS نوع نورونال (نوع یک) ثابت شده است (۱۸). همچنین مشخص شده است در سراسر روده موش صحرایی از معده تا انتهای کولون NOS در داخل شبکه میانتریک توزیع یافته است (۱۹) و به عنوان واسطه در شل شدن مری، معده، روده، کولون و پیلور عمل می‌کند. یکی دیگر از اثرات NO بر روی سلول عضله صاف جلوگیری از تکثیر آن است. به این صورت که بر روی فاز G1 سیکل سلولی اثر مهاری دارد و مانع از رشد و زیاد شدن عضله صاف می‌شود (۲۰). همچنین طی مطالعه‌ای که برروی بیماران دچار استنوزهیپرتروفیک پیلور انجام شده است در بررسی میکروسکوپ الکترونی سلول عضله صاف حلقوی پیلور دچار هیپرتروفی شده بود وتراکم زیادی از گلیکوژن ورتیکولوم آندوپلاسمیک خشن(rER)متسع شده درون سلول مشاهده شد (۲۱). با توجه به این مطالب می‌توان استنباط کرد در اثر فقدان و یا کمبود NO در سلول، اثر مهاری آن بر روی رشد سلول برداشته شده و باعث تکثیر بیش از حد (هیپرپلازی) و تجمع مواد درون سلول (هیپرتروفی) می‌شود. بنابراین منطقی است که در صورت مهار سنتز NO در بدن جنین، دستگاه گوارش نیز تحت تاثیر قرار گیرد و علایمی نظیر افزایش در تعداد سلول‌ها و ضخامت لایه عضلانی حلقوی پیلور را نشان دهد.

دررابطه با علت تاثیر این ماده در یک هفته آخر بارداری در مقایسه با هفته وسط بارداری باید به تکامل جنین موش صحرایی اشاره کرد. همان‌طور که می‌دانیم تا پایان روز چهاردهم بارداری ناحیه پیلور معده و اسفنکتر پیلور در محل اتصال دئودنوم به معده قابل مشاهده است. بنابراین این ناحیه در بدن جنین کاملا تکوین یافته است (۲۲). از طرفی

اندام‌های تحتانی جنین نیز تا پایان هفته سوم کاملا رشد کرده و به اندازه طبیعی خود می‌رسند و پس از این مدت در صورتی که تحت تاثیر مداوم ماده‌ای قرار گیرند، می‌توانند دست‌خوش تغییرات سلولی همچون افزایش یا کاهش در تعداد و حجم سلول‌ها شوند. در واقع باید گفت که تغییراتی نظیر هیپرتروفی و هیپرپلازی سلول و یا نکروز یک بافت، پدیده‌هایی ثانویه هستند و باید شکل اولیه یک بافت کامل شده باشد تا بعدا بتواند تحت اثر یک عامل خارجی (تراتوژن) دچار این تغییرات بشود (Disruption).

در خصوص ارتباط این تحقیق با تنگی پیلور هیپرتروفیک کودکان باید گفت این بیماری یک اختلال شایع مجرای معدی-روده ای در نوزادان انسان است و علامت اصلی آن تنگ شدن دریچه خروجی معده به علت هیپرتروفی و هیپرپلازی عضله صاف حلقوی پیلور است و علی‌رغم اینکه این اختلال بیشتر از دو قرن است که به عنوان بیماری شناخته شده است (۱۱) مکانیسم فیزیولوژیک آن به خوبی شناخته نشده و هنوز محققین به دنبال پیدا کردن علل به وجود آورنده آن هستند. اخیرا پیوری و کوسافوکا نشان دادند که درعضله پیلور بیماران IHPS، بیان ژن کدکننده NOS کاهش می‌یابد (۱۵، ۱۶، ۲۱).

نتیجه‌گیری

می‌توان استنباط کرد کمبود تولید NO در اعصاب داخلی لایه عضلانی حلقوی اسفنکتر پیلور می‌تواند دلیلی برای شل نشدن این اسفنکتر در کودکان دچار IHPS باشد که البته با انجام تحقیقات بیشتر برروی تغییرات اولتراستراکچرال اعصاب NANC بعد از تزریق L-NAME و یا Follow-up زنان باردار دچار فقر غذایی خصوصا پروتیین از نظر درصد بروز تولد نوزادان دچار هیپرتروفی پیلور در آنها بهتر می‌توان به این نتیجه رسید.

References

1. Porsti I, Poakkari I. Nitric oxide- based possibilities for pharmacotheropy. Annals of medicine 1995; 27: 407-420
2. Palmer RMJ, Ferrige AC, Moncada S: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium – derived relaxing Factor. Nature 1987; 327: 524-526
3. Voelker CA, Miller MJS, Zhang XJ, Childress SE, Clark DA, Pierce MR: Perenatal nitric oxide synthase inhibition retards neonatal growth by inducing hypertrophic pyloric stenosis in rats. Pediater Res 1995; 38: 768-774.
4. Pierce RL, Pierce MR, Liu H, Kadowitz PJ, Miller MJS: Limb redution defects afrer prenatal inhibition of nitric oxide synthase in rats. Pediater Res 1995; 38(6): 905-911
5. Zhang H, Snead C, Catravas JD: Nitric 0xide differentially regulates induction of type II nitric oxide synthase in rat vascular smooth muscle cells versus macrophages. Arterioscler Thromb Vasc Bio 2001; 21: 529-535
6. Wang MX, Murrell DF, Szaba C, Warren RF, Sarris M, Murrell GAC: Nitric oxide in skeletal muscle: Inhibition of Nitric Oxide Synthase Inhibitis Waking Speed in Rats. Nitric Oxide Biology and Chemistry 2001; 5(3): 219-232
7. Bredt DS, Hwang PM, Synder SH: "Localization of Nitric Oxide synthase indiciating a neural role for nitric oxide. Nature 1990; 347: 768-770
8. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S, Characterization of the L Aginine: nitric oxide path way in human platelets. Br J Pharmacol 1990; 101: 740-752
9. Rees DD, Palmer RMJ, Schulz R, Hodson HF, Moncada S: Characterization of three inhibitors of endothelial NOS in vitro and in vivo. Br J Pharmocol 1990; 101: 740-752
10. Diket AL, Pierce MR, Mushi UK, Voelker CA, Childress SE, Greenberg SS, Zhang XJ, Clark DA, Miller MJS: Nitric Oxide inhibition causes intrauterine growth retardation and hind – limb disruptions in rats. Am J Obstet Gynecol 1994; 171: 1243-1250
11. Hays MA, Glodenbery IS: The problems of infantile pyloric sterosis. Int Abst Surg 1975; 104:105-138
12. Spicer RD: Infantile hypertrophic pyloric stenosis, a review. Br J Surg 1982; 69: 128-135
13. Abel RM, Bishop AE, Dore CJ, Spitz L, Polak JM: A Quantitative Study of the Morphological and Histochemical Changes within the Nerves and Muscle in Infantile Hypertrophic Pyloric Stenosis. J Pediatr Surg 1998; 33: 682-687
14. Ishiguchi T, Takahashi T, Iton H, Owyang C: Nitrergic and purinergic regulation of the rat Pylorus. AM J Physiol Gastrointest Liver Phisiol 2000; 279(4): G740-70
15. KusaFuka T, Puri P: Altered messenger RNA expression of the neuronal nitric oxide synthase gene in infantile hypertrophic pyloric stenosis. Pediater Sury Int 1997; 12: 576-579
16. Takaharu O, Prem P: Smooth Muscle Cell Hypertrophy versus Hyperplasia in Infantile Hypertrophic

Pyloric Stenosis. Pediatr Res 1999; 45(6): 853-857
17. Body SC, Hartingan RM, Shernan SK, Forkmanek V, Hurford WE: Nitric Oxide Delivery, Measurement and Clinical Application. J Cardio–thoracic and Vaseular Anesthesia 1995; 99(6): 724-763
18. Brandt CT, Granham A, Tam PKH: Densities of Nitric Oxide Synthesizing Nerves in Smooth Muscles of Human gut During Fetal Development. J Pediater Surg 1997; 32: 1314-17
19. Belai A, Schmidt HW, Hoyle CHV, Hassall CJS, Saffrey MJ: Colocalization of nitric oxide synthase and NADPH – diaphorase in the myenteric plexus of the rat gut. Neurosci Lett 1990; 143: 60-64
20. Rajabrata S, Clintonwebb R: Does Nitric Oxide Regulate smooth muscle cell proliferation? J Vas Res 1998; 35: 135-142
21. Ohshiro K, Puri P: Pathogenesis of infantile hypertrophic pyloric stenosis: recent progress. Pediatr Surg Int 1998; 13: 243-252
22. Kaufman M.H. The Atlas of Mouse Development. By academic press limited. 1992