

Mediatori biochimici delle modificazioni cervicali nel parto pretermine

F. FACCHINETTI, S. PAGANELLI, P. VENTURINI, G. DANTE, L. PALAMÀ

RIASSUNTO: Mediatori biochimici delle modificazioni cervicali nel parto pretermine.

F. FACCHINETTI, S. PAGANELLI, P. VENTURINI, G. DANTE, L. PALAMÀ

Il parto pretermine (PPT) è un problema ancora irrisolto e la sua eziologia rimane in gran parte sconosciuta: la tendenza attuale è quella di ricercare mediatori biochimici specifici prodotti durante la fase prodromica del parto pretermine stesso. Tali fattori sono prevalentemente i mediatori della flogosi essendo il PPT causato in circa il 70% dei casi da un processo infiammatorio non solo su base infettiva.

Alti livelli di G-CSF, IL-1, IL-6, IL-8, fibronectina fetale, TNF- α nella cervice o vagina; elevati dosaggi plasmatici di IL-6, G-CSF, proteina C reattiva, TNF- α e alte concentrazioni di G-CSF, IL-1, IL-6 nel liquido amniotico, propongono queste singole molecole come mediatori d'infezione intrauterina nelle gravide in travaglio di parto prematuro, altri mediatori finali, quali α -feto proteina, fosfatasi alcalina, lactoferrina, relaxina sono indirettamente correlati ad uno stato infettivo.

Le interleuchine (IL) sono inoltre implicate nei processi che determinano la comparsa di ipercontrattilità uterina, e nei meccanismi che portano all'induzione delle modificazioni cervicali attraverso l'attivazione diretta della produzione di Ossido d'Azoto. Quest'ultimo è considerato il mediatore finale dei meccanismi che consentono il "ripening" cervicale. Il marcatore maggiormente attendibile è la fibronectina fetale, dosabile dopo le 20 settimane. Quando è presente in concentrazioni >50 mg/ml in cervice o vagina, è altamente predittiva di PPT nelle gestanti tra le 22 e 24 settimane.

SUMMARY: Biochemical mediators of the cervical modifications in the preterm birth.

F. FACCHINETTI, S. PAGANELLI, P. VENTURINI, G. DANTE, L. PALAMÀ

Preterm birth (PTB) is an unresolved problem and its etiology remains nearly unknown. The actual trend is finding specific biochemical mediators produced during the prodromic phase of the PTB. These factors are the mediators of the inflammation, because the PTB is given in about 70% of cases by an inflammatory process not only during an infection.

High levels of G-CSF, interleukin-1 (IL-1), IL-6, IL-8, fetal fibronectin, tumour necrosis factor- α (TNF- α) in cervix or vagina; elevated plasmatic levels of IL-6, G-CSF, C-reactive protein, TNF- α and high concentrations in amniotic fluid of G-CSF, IL-1, IL-6 propose these molecules as mediators of intrauterine infection in patients during preterm labour. Other final mediators: α -fetus protein, alkaline phosphatase, lactoferrin, relaxin, are indirectly correlated to an infections state.

Interleukin are also involved in the processes carrying out the uterine hypercontractility, and in the mechanisms bringing to the induction of the cervical modifications through the activation of the Nitric Oxide production (NO). NO is considered the final mediator of the mechanisms that allow the cervical ripening. The most reliable marker is the fetal fibronectin, measurable after 20 weeks. When it is present in concentrations > 50 mg/ml in cervix or vagina, it is highly predictive of PTB in the pregnant women between 22 and 24 weeks.

KEY WORDS: Parto pretermine - ossido d'azoto - interleuchine - prostaglandine.
Preterm birth - Nitric Oxide - Interleukin - prostaglandin.

Premessa

Il parto pretermine spontaneo (PPT) viene definito come la nascita prima della 37^a settimana di gestazione in funzione della comparsa di ipercontrattilità uterina associata alle modificazioni anatomo-strutturali della cervice uterina stessa (1).

In Inghilterra il 7% delle donne gravide partorisce

tra 25 e 37 settimane, le percentuali sulla sopravvivenza neonatale sono intorno all'88% per le donne che partoriscono dopo le 28 settimane, mentre calano drasticamente fino al 21% tra le 25 e 27 settimane di gestazione (2). Negli USA il PPT è responsabile del 70% delle morti neonatali e di circa la metà delle patologie neurologiche a lungo termine del bambino (3).

Le cause di PPT spontaneo sono molteplici, spesso non del tutto chiare e cambiano in relazione all'epoca gestazionale e al peso del nascituro.

Nell'80% dei casi le nascite prima di 30 settimane oppure i feti inferiori a 1000 gr di peso indipendente-

mente dall'epoca gestazionale, sono associati a diagnosi istologica di chorionamnioite o al riscontro diretto di microrganismi nella placenta e nelle membrane (4).

Essendo il processo infiammatorio il risultato di un processo infettivo, molti mediatori dell'infiammazione sono stati chiamati in causa e sono state ricercate e individuate alcune sostanze prodotte nella flogosi in funzione del rischio di PPT.

Alti livelli di G-CSF, IL-1, IL-6, IL-8, fibronectina fetale, TNF- α nella cervice o vagina; elevati dosaggi plasmatici di IL-6, G-CSF, proteina C reattiva, TNF- α e alte concentrazioni di G-CSF, IL-1, IL-6 nel liquido amniotico, propongono queste singole molecole come markers di infezione intrauterina nelle gravidie in travaglio di parto prematuro (5). In aggiunta a queste sostanze esistono altri markers indirettamente correlati ad uno stato infettivo quali α -feto proteina, fosfatasi alcalina, lactoferrina, relaxina (6).

A causa dell'elevato numero di marcatori presenti e della difficoltà nel loro dosaggio, la tendenza comune è quella di isolare sostanze altamente specifiche facilmente reperibili e dosabili. Tra queste le sostanze maggiormente implicate nella predizione del PPT sono: G-CSF, ferritina e proteina C reattiva nel siero (7, 8).

Anche le interleuchine (IL) hanno un ruolo determinante come è stato dimostrato da alcuni autori attraverso il dosaggio sierico di IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 e IL-2r. In questo caso solo IL-6 e IL-2r, con una sensibilità e specificità rispettivamente del 60% e 70% solo per IL-6 (9), sono clinicamente predittive entro le 48 ore dall'inizio dei sintomi e prima delle 34 settimane; inoltre sono predittive del fallimento della terapia tocolitica (10). Cambiando substrato di campionamento si osserva che, dosando IL-1, IL-6, IL-8 nell'essudato vaginale, le concentrazioni sono significativamente superiori rispetto a quelle riscontrate nel plasma, senza tuttavia raggiungere una specificità e sensibilità clinicamente predittiva per minaccia di PPT (11).

Attualmente il marcatore maggiormente attendibile nella minaccia di PPT risulta essere la fibronectina fetale, una proteina prodotta dalle membrane fetali e dal trofoblasto che agisce come collante tra membrane e decidua. Prima delle 20 settimane generalmente non è dosabile a livello della vagina o della cervice. In una serie di studi si è dimostrato come la fibronectina fetale, quando è presente in concentrazioni >50 mg/ml nella cervice o nella vagina, sia altamente predittiva di PPT nelle gestanti tra le 22 e 24 settimane (12, 13).

A differenza di altri marcatori (fosfatasi alcalina, ferritina, fibronectina, prot. C reattiva), che sono rappresentativi solo del segnale di minaccia di PPT in atto, le IL sono anche implicate nei processi determinanti la comparsa di ipercontrattilità uterina e delle modificazioni cervicali mediante l'attivazione diretta della produzione di Ossido d'Azoto (NO).

Meccanismo d'azione dell'NO

L'NO endogeno è un gas sintetizzato a partire dalla L-arginina attraverso l'azione svolta dalla NO sintetasi (NOS) (14). Questo enzima catalizza la idrossilazione della L-arginina ad N-idrossi-L-arginina che viene convertita in L-citrullina ed NO. L'NO viene rapidamente ossidato a nitriti (NO₂⁻) e nitrati (NO₃⁻), i quali costituiscono i prodotti finali stabili di questa via metabolica e sono facilmente dosabili nel siero e nelle urine (15). L'NO libero nel circolo sanguigno presenta un'altissima affinità per l'emoglobina e viene rapidamente inattivato da essa con formazione di nitrosil-emoglobina e metaemoglobina.

Esistono tre isoforme di NOS: (16)

- 1) NOS-costitutiva (cNOS): espressa nelle cellule endoteliali dove è responsabile della sintesi basale di basse concentrazioni di NO che modulano il tono vascolare locale.
- 2) NOS-neuronale (nNOS): si trova nelle cellule neuronali del sistema nervoso centrale e periferico dove funziona da neurotrasmettitore del sistema nervoso inibitorio non adrenergico e non colinergico (17).
- 3) NOS-inducibile (iNOS): prodotta da macrofagi, fibroblasti, miocellule lisce produce quantità di NO notevolmente superiori rispetto alla cNOS. Questa isoforma è inattiva e la sua induzione è regolata da fattori di trascrizione, principalmente dal fattore nucleare kB (NF-kB), i quali vengono attivati dalle citochine, sostanze ossidanti e LPS (18). L'induzione della i-NOS comporta trascrizione genica dell'enzima con produzione di NO alcune ore dopo l'esposizione, con effetto che può persistere per alcuni giorni (19).

L'NO prodotto diffonde nelle cellule muscolari lisce dei vasi sanguigni e dell'utero dove si lega al gruppo eme della guanilatociclastasi attivandola (20). Ne consegue un aumento del cGMP il quale, come secondo messaggero, attiva kinasi proteiche. Queste, catalizzando la fosforilazione di proteine intracellulari, agiscono inibendo il rilascio intracellulare di Ca e il flusso attraverso i canali del Ca, rilassando la cellula muscolare liscia a livello di vasi, utero, bronchi (21).

Attualmente, la convinzione comune è quella che l'NO agisca come agonista rilassante sul miometrio nello stesso modo in cui agisce a livello delle altre cellule muscolari lisce. Tuttavia molti autori suggeriscono che elevate concentrazioni di cGMP non siano necessarie o insufficienti per giustificare l'azione dell'NO sul miometrio (22, 23).

Nella gravidanza fisiologica l'NO viene prodotto nell'utero e serve a mantenerlo quiescente (24). Nel primo trimestre di gravidanza, a livello del trofoblasto, è stata notata la presenza di alti livelli di iNOS che gradualmente diminuiscono verso la fine della

gravidanza (25).

Nella cervice uterina, contrariamente a quanto accade nell'utero, l'attivazione della iNOS dopo stimolo infiammatorio, porta ad un rapido incremento dell'NO che modula il rimodellamento cervicale determinando un vistoso incremento di acido ialuronico, di acqua e un decremento del collagene. L'evidenza del ruolo dell'NO nel "softening" cervicale è supportata da modelli sperimentali tramite la somministrazione di donatori di NO come isosorbide mononitrato (IMN) (26) e di sodio nitroprussiato (SNP) (27) applicati in vagina o nella cervice. Dopo la loro applicazione, a livello istologico si osserva che le fibre collagene appaiono ampiamente spaziate e si riscontra la presenza di vescicole pinocitotiche che indicano la presenza di attività digestiva dei fibroblasti.

L'apoptosi cellulare indotta dall'NO sulla cervice si esplica anche mediante l'azione adiuvante svolta dalle metalloproteinasi, in particolare della MMP-9 e da altri enzimi proteolitici che dissociano le fibre collagene inducendo il processo del "softening" cervicale (28). La MMP-9 è una proteina enzimatica che viene prodotta dai macrofagi e regola la composizione della matrice cellulare. L'NO e il peptide natriuretico, entrambi usando il cGMP come secondo messaggero, dimostrano un'azione antifibrotica attraverso l'inibizione della sintesi di collagene e l'attivazione della MMP-9 (29).

È stato effettuato uno studio caso-controllo (30) che si propone di verificare in quale misura l'NO cervicale possa essere associato all'insorgenza di PPT.

Sono stati misurati i nitriti/nitrati (NO_x) nelle secrezioni cervicali di 16 pazienti nullipare tra le 26 e 31 settimane di gestazione che presentavano cervice raccorciata ($22,1 \pm 5,2$ mm) e contrazioni uterine. I controlli sono stati effettuati su sedici donne asintomatiche ad una equivalente epoca gestazionale (cervice $42,2 \pm 9,3$ mm) e su 20 donne a termine con gravidanza fisiologica non complicata.

Risultati preliminari indicano che in donne con minaccia di PPT è presente un incremento di NO_x cervicali a sua volta associato all'accorciamento. Contrariamente non esiste alcuna differenza significativa dei NO_x plasmatici tra i casi e i controlli.

Questi dati supportano l'ipotesi che il precoce "ripening" cervicale sia associato ad un'attivazione locale, e non sistemica, dell'NO.

Meccanismo d'azione delle citochine

Le citochine sono proteine ormonali espresse sia nella immunità naturale (innata) che in quella specifica (acquisita) (31); la loro secrezione è un fenomeno di breve durata ed auto limitato. Esse non sono accumulate come molecole preformate ma vengono

ottenute tramite la sintesi "de novo" dei geni corrispondenti, ed iniziano la loro attività legandosi a recettori specifici presenti sulla superficie della cellula bersaglio (32).

Il TNF è il principale mediatore della risposta contro i batteri Gram negativi. Le più importanti azioni biologiche del TNF sono l'induzione dell'espressione di nuovi recettori di superficie (adesine) sulle cellule endoteliali vasali e la secrezione di interleuchine (IL), in particolare, IL-1, IL-6 e IL-8 da parte dei fagociti mononucleati (33).

L'IL-1, la cui forma maggiormente circolante è sottoforma di IL- β , presenta caratteristiche biochimiche simili al TNF e viene prodotta dai fagociti anche in risposta al contatto con linfociti CD4+. A differenza del TNF l'IL-1 non produce danno tissutale direttamente ma potenzia l'azione del TNF stesso in maniera ridondante (34).

L'IL-8 è la componente meglio caratterizzata del gruppo delle chemochine le quali hanno in comune la capacità di stimolare la motilità dei leucociti (chemocinesi) e la loro migrazione (chemotassi).

Per quanto riguarda le relazioni che possono correlare processo infettivo, flogosi e citochine in funzione della minaccia di PPT, sono stati eseguiti numerosi studi su modelli sperimentali e trials clinici.

Nei modelli sperimentali pretermine condotti dosando IL-1 negli omogeneizzati di Chorion, decidua e placenta provenienti da cotiledoni placentari isolati e perfusi per 10 ore con lipopolisaccaride (LPS), sono state riscontrate concentrazioni di IL-1 nel chorion nettamente superiori a quelle presenti nella decidua e nel tessuto placentare. Tuttavia nei modelli a termine l'infusione di LPS induce la formazione di elevati livelli di IL-1 solo nella decidua, mentre si riduce a livello placentare (35). Infine confrontando i modelli pretermine con quelli a termine si evince un significativo aumento di IL-1 solo nei primi, confermando che tale citochina ha un evidente ruolo (autocrino o paracrino) nella regolazione di entrambi.

Il dosaggio di IL-6, IL-8 e TNF- α su campioni ottenuti dal segmento uterino inferiore durante taglio cesareo non elettivo in pazienti con minaccia di PPT e suddivisi in base alla dilatazione cervicale (<2 cm, 2-4 cm, >4 cm), ha evidenziato una elevata concentrazione di TNF- α in tutti i gruppi, senza rilevare alcuna differenza significativa entro i 3 campionamenti eseguiti. IL-6, IL-8 sono significativamente più elevate tra i 2 cm e 4 cm di dilatazione rispetto al gruppo con dilatazione inferiore a 2 cm (67,7 e 125,8 verso 17,6, e 22,2 pg/mg rispettivamente). IL-6 e IL-8 mostrano innalzamenti vistosi per dilatazioni cervicali superiori ai 4 cm (297,2 e 468,6 pg/mg) (36).

Quindi, a livello della cervice uterina, la caduta di progesterone nella gravidanza a termine e la somministrazione di LPS nei modelli pretermine, determina

la chemiotassi di macrofagi, monociti e linfociti che liberano citochine (IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α).

Tali citochine agiscono secondo un meccanismo autocrino e paracrino il quale, da un lato porta alla degranolazione mastocitaria con rilascio di MMP-9 e altri enzimi proteolitici agenti direttamente sul collagene cervicale, e dall'altro lato attivano la ciclossigenasi II (COXII) e la iNOS. L'attivazione della COXII determina a sua volta la produzione di prostaglandina E2 (PGE2) locale che agisce direttamente aumentando la permeabilità endoteliale facilitando il passaggio dei leucociti (37).

Meccanismo d'azione delle prostaglandine

Tutte le cellule, esclusi i globuli rossi, producono prostaglandine (PG) e i loro prodotti correlati. Nell'uomo il loro precursore più importante è l'acido arachidonico (AA) a sua volta sintetizzato a partire dall'acido linoleico (38). Le PG di tipo 1 sono prodotte a partire dall'acido eicosatrienoico, mentre quelle di tipo 2 dall'AA.

La prima tappa del metabolismo dell'AA è catalizzata dalla PG endoperossido sintetasi, meglio conosciuta come ciclossigenasi (COX), che agisce in maniera consecutiva e porta alla formazione di PGG2 e da questo alla formazione di PGH2 che rappresenta il precursore immediato di tutte le PG. Esistono due tipi di COX: COX-1 espressa costitutivamente e COX-2 indotta da citochine (39).

Nel miometrio i livelli di COX-1 non cambiano durante la gravidanza e il travaglio. Al contrario la produzione di citochine, soprattutto IL-1, durante il travaglio di parto, determina l'attivazione della COX-2 e una transitoria riduzione dell'attività della Prostaglandina Deidrogenasi (PGDH) (40). In seguito la caduta di PGDH nel corion può facilitare il passaggio di PGE2, generato dalle membrane fetali, al miometrio e alla cervice (41).

Poiché le PG giocano un ruolo diretto nella modificazione cervicale la loro concentrazione nella

cervice dovrebbe essere elevata durante il "ripening" cervicale oppure nella gravidanza a termine. Sorprendentemente l'analisi di PGE2 e PGF2 nel muco cervicale non mostra un loro aumento durante la fase di "ripening" cervicale o nella gravidanza a termine (42). È possibile che le PG possano venire prodotte in un tessuto adiacente e successivamente diffuse nella cervice. Infatti, durante la fase prodromica, la parte del sacco amniotico adiacente all'orifizio uterino interno (OUI) viene spinta verso di esso. A causa della protrusione in quest'ultimo, le membrane diventano esposte all'azione della flora batterica, inducendo una reazione infiammatoria della decidua e di altri tessuti adiacenti al sacco amniotico. In questo modo si spiegherebbe come le modificazioni cervicali, evocate dall'infiammazione durante la fase iniziale del periodo dilatatorio, siano relazionabili alle PG e citochine prodotte nell'adiacente decidua (43).

Conclusioni

La comprensione della fisiologia della cervice suggerisce che quest'ultima svolga un ruolo fondamentale sia nel mantenimento della gravidanza che nell'espletamento del parto. Le interazioni tra citochine, PG, ed NO costituiscono i processi biochimici che portano al processo del "ripening" cervicale a termine; di conseguenza una loro precoce attivazione conduce alla maturazione pretermine della cervice, costituendo il rischio principale di PPT.

L'obiettivo è quello di identificare la minaccia di PPT spontaneo utilizzando adeguatamente i markers implicati in questi meccanismi e inibire i processi infiammatori che li generano.

In termini di spunti per la ricerca l'attenzione andrà posta sui mediatori locali della maturazione cervicale piuttosto che sugli attivatori della contrattilità miometriale com'è stato fatto fino ad oggi, perché la comprensione di questi meccanismi sarà la chiave di volta per poter diminuire il parto pretermine.

Bibliografia

1. GIBB W., CHALLIS J.R.: *Mechanism of term and preterm birth*. J Obstet Gynecol Can, 24: 874-83, 2002.
2. BIBBY E., STEWART A.: *The epidemiology of preterm birth*. Neuro Endocrinol Lett, 25: Suppl. 1: 43-7, 2004.
3. HOCK M., FANAROFF A.A.: *Outcomes of children of extremely low birth weight and gestational age in the 1990's*. Herly Hum Dev, 53: 193-218, 1999.
4. GIBBS R.S., ROMERO R., HILLER S.L., ESHENBACH D.A., SWEET R.L.: *A review of premature birth and subclinical infection*. Am J Obstet and Gynecol, 166: 1515-28, 1992.
5. GOLDENBERG R.L., HANTH J.C., ANDREWS W.W.: *Intrauterine infection and preterm delivery*. N England Med, 342: 1500-7, 2000.
6. GOLDENBERG R.L., IAMS J.D., MERCER B.M., MEIS P.J., MOAWAD A.H., DAS A.: *The preterm prediction study: toward a multiple marker test for spontaneous preterm birth*. Am J Obstet and Gynecol, 185: 643-51, 2001.
7. LOCKWOOD C.J., KUCZYNSKI E.: *Markers of risk for preterm delivery*. J Perinat Med, 27: 5-20, 1999.
8. HYAGRIV N., et al.: *Serum biomarkers of spontaneous preterm*

- birth. Acta Obstet Gynecol Scand, 84: 545-46, 2005.
9. COLEMAN M.A., KEELAN J.A., MC COWAN L.M., TOWNED K.M., MITCHELL M.D.: *Predicting preterm delivery: comparison of cervicovaginal IL-1 β , IL-6, IL-8 with fetal fibronectin and cervical dilatation.* Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 95: 154-8, 2001.
 10. ALVAREZ DE LA ROSA M., REBOLLO J.F., CORDOCEO R., GONZALES A.G.: *Maternal serum interleukin 1,2,6,8 and interleukin-2 receptor levels in preterm labor and delivery.* Eur J Obstet Gynecol, 88: 57-60, 2000.
 11. GONZALES B.E., FERRER I., VALLS C., BONAS M., LAILLA J.M.: *The value of IL-8,6,1 in vaginal wash as predictors of preterm delivery.* Gynecol Obstet Invest, 59: 175-8, 2005.
 12. GOEPFERT A.R., GOLDENBERG R.L., MERCER B., MEIS P.J., MOAWAD A.H. et al.: *The preterm prediction study: patterns of cervicovaginal fetal fibronectin as predictors of spontaneous preterm delivery.* Am J Obstet and Gynecol, 177: 8-12, 1997.
 13. RAMSEY P.S., ANDREWS W.W.: *Biochemical predictors of preterm labor: fetal fibronectin and salivary estriol.* Clin Perinatol, 30: 701-33, 2003.
 14. MONCADA S.: *The L-arginine nitric oxide pathway.* N Engl J Med, 329: 2002-12, 1993.
 15. BREDT D.S., HWANG P.M., SNYDER S.H.: *Localization of nitric oxide indicating a neural role for nitric oxide.* Nature, 347: 768, 1990.
 16. MORRIS S., BILLIAR T.R.: *New insides into the regulation of inducible nitric oxide synthase.* Am J Physiol, 266: E829-39, 1994.
 17. BREDT D.S., HWANG P.M., SNYDER S.H.: *Localization of nitric oxide indicating a neural role for nitric oxide.* Nature, 347: 768, 1990.
 18. FORSTEMANN U., SCHMIDT H.W., POLLOCK J.S., SCHENG H., MITCHELL J.A., WARNER T.D., NAKANE M., MURAD F.: *Isoform of nitric oxide synthase: characterization and purification from different cell types.* Biochem Pharmacol, 42:1849, 1991.
 19. HOTCHKISS R.S., KARI I.E., PARKER J.L. et al.: *Inhibition of nitric oxide synthesis in septic shock.* Lancet, 339: 434-435, 1992.
 20. MURAD F.: *Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilatation.* Clin Invest, 78: 1-5, 1986.
 21. ELLIS I.L.: *Inhibition by L-NG-nitro-arginine of nonadrenergic-noncolinergic mediated relaxation of human isolated central and peripheral airway.* Am Rev Respir Dis, 147: 1543, 1992.
 22. BUXTON I.L., KAISER I.L., MALMQUIST N.A.: *Nitric oxide induced relaxation of labouring and non labouring human myometrium is not mediated by cGMP.* Br. J Pharmacol, 134: 206-14, 2001.
 23. CARVAJAL J.A., AGUAN K., THOMPSON L.P.: *Natriuretic peptide-induced relaxation of myometrium from the pregnant guinea pig is not mediated by guanylate cyclase activation.* J Pharmacol Exp Ther, 297: 181-88, 2002.
 24. TIBANI G.M., GIAMPIETRO F., LAMONACA M.: *The soluble Guanylate cyclase inhibitor methylene blue evokes preterm delivery and fetal growth restriction in a model.* In vivo, 15: 333-37, 2001.
 25. SAYAL L., NAG T.C., DAS C.: *Localization of nitric oxide synthase in human trophoblastic cells: role of NO in trophoblast proliferation and differentiation.* Am J Rep Imm, 43: 70-77, 2003.
 26. EKEROVD E., WYDEGARD B., BRANSTROM M., MATTSBY-BALTZER I., NORSTROM A.: *Nitric oxide induced cervical ripening in the human: involvement of cyclic guanosine monophosphate, PGF2 and PGE2.* Am J Obstet Gynecol, 186: 745-50, 2002.
 27. FACCHINETTI F., PICCININI F., VOLPE A.: *Chemical ripening of the cervix with intracervical application of sodium nitroprusside: a randomized controlled trial.* Hum Reprod, 15: 2224-7, 2000.
 28. PICCININI F., FANO R.A., VOLPE A., FACCHINETTI F.: *Ripening of the cervix with sodium nitroprussiate in non pregnant women.* J Soc Gynecol Invest, 10: 348-42, 2003.
 29. CHAKRABORTI S., MANDAL M.: *Regulation of matrix metalloproteinases: an overview.* Mol Cell Biochem, 253: 269-85, 2003.
 30. FACCHINETTI F., VENTURINI P., BLASI I., GIANNELLA L.: *Changes in the cervical competence in preterm labour.* Int. J. Obstet. Gynecol, 112: 23-27, 2005.
 31. ARAI K., MIYAJIMA A., MIYATAKE S., ARAI N., YOKOTA T.: *Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses.* Ann Rev of Biochemistry, 59: 783-836, 1990.
 32. DEGROOTE D.: *Cytokine measurement in serum or plasma of patient samples: Getting around the pitfalls.* Imm Lett, 56: 138-9, 1997.
 33. DINARELLO C.A.: *Role of interleukin-1 in infectious diseases.* Immunological Rev, 127: 119-46, 1992.
 34. COHEN M., COHEN S.: *Cytokine function. A study in biological diversity.* Am J Clin Pathol, 105: 598-98, 1996.
 35. HULEIHEL M., AMASH A., SAPIR O., MAOR E., LEVY S., KATZ S., DUKLER D., MYATT L., HOLCBERG G.: *Lipopolysaccharide induces the expression of IL-1 α distinctly in different compartments of term and preterm placentae.* Eur Cytokine Netw, 15: 30-6, 2004.
 36. WINKER M., KEMP B., FISCHER D.C., MAUL H., HLUBEK M., RATH W.: *Tissue concentrations of cytokines in the lower uterine segment during parturition.* J Perinat Med, 29: 519-27, 2001.
 37. CHWALISZ K., GARFIELD R.E.: *New molecular challenges in the induction of cervical ripening.* Hum Reprod, 13: 245-48, 1998.
 38. NEEDLEMAN P., TURK J., JAKSCHIK B.A., MORRISON A.R., LEFKOWITH J.B.: *Arachidonic acid metabolism.* Ann Rev Biochem, 55: 69-102, 1986.
 39. JOHNSON M., CAREY F., MCMILLIAN R.M.: *Alternative pathways of arachidonate metabolism: prostaglandins, thromboxane and leukotrienes.* Essays Biochem, 19: 40-141, 1983.
 40. GIANNULIAS D., PATEL F.A., HOLLOWAY S.J. et al.: *Differential changes in 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase and prostaglandin H synthetase in human pregnant myometrium.* J Clin Endocrinol Metab, 87: 1345-52, 2002.
 41. SCHOOF E., GIRSTL M. et al.: *Course of placental 11 β HsteroidDH type 2 and 15-PGDH mRNA expression during human gestation.* Eur J Endocrinol, 145: 187-92, 2001.
 42. TOTH M., REHNSTROM J., FUCHS A.R.: *Prostaglandins E and F in cervical mucus of pregnant women.* Am J Perinat, 6: 142-44, 1989.
 43. HERTELENDY F., ZAKAR T.: *Prostaglandins and the myometrium and cervix.* Prostagl and Leukotr Ess Fat Acids, 70: 207-22, 2004.