

**Agnieszka Pedrycz, Piotr Siermontowski, Dorota Kaczerska**

dr hab. med. Agnieszka Pedrycz  
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii  
z Pracownią Cytologii Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie.  
ul. Radziwiłłowska 11 20-080, Lublin  
e-mail: apw4@wp.pl

dr med. Piotr Siermontowski  
Zakład Medycyny Morskiej i Hiperbarycznej Wojskowy Instytut Medyczny  
ul. Grudzińskiego 4 81-103 Gdynia 3 skr. poczt. 18  
tel./fax. 58/6262405 tel./fax. MON 2624056  
e-mail: nurdok@tlen.pl

mgr inż. Dorota Kaczerska  
Zakład Dietetyki Ogólnej, Katedra Żywienia Klinicznego, Gdański Uniwersytet Medyczny  
ul. M. Skłodowskiej-Curie 3a 80-210 Gdańsk  
tel./fax. 58/3492723,  
e-mail: dorotakaczerska@gumed.edu.pl

## **HISTOLOGICZNA OCENA WPLYWU TLENKU AZOTU NA NERKI SZCZURA**

*Celem pracy była histologiczna ocena nerek szczura poddanego działaniu egzogenego tlenku azotu.*

*Szczury użyte w niniejszej pracy zostały podzielone na 2 równe grupy. Zwierzęta z grupy doświadczalnej otrzymywały L-argininę - 40mg/kg masy ciała per os, co drugi dzień przez 2 tygodnie i zostały dekapitowane po 3 tygodniach doświadczenia. Szczury z grupy kontrolnej dostawały 2ml wody destylowanej per os co drugi dzień i zostały dekapitowane po 3 tygodniach doświadczenia.*

*Z wycinków nerek pobranych do analizy robiono preparaty, które barwiono Hematoksyliną i Eozyną. Preparaty oglądano pod mikroskopem świetlnym i opisano. Obliczono również indeks apoptozy, a wyniki badań poddano ocenie statystycznej*

*Badania wykazały, że L-arginina jako prekursor egzogenego tlenku azotu podana samicom szczura w dawce uważanej za bezpieczną dla matki i płodu, wywołuje nasiloną apoptozę komórek nabłonka nerek, obserwowaną pod mikroskopem świetlnym i potwierdzoną istotnym statystycznie wzrostem indeksu apoptozy.*

**Słowa kluczowe:** tlenek azotu, nerki, szczur, mikroskop świetlny.

## **HISTOLOGICAL EVALUATION OF INFLUENCE OF NITRIC OXIDE ON RAT'S KIDNEYS**

*The aim of the study was to prepare histological evaluation of rat's kidneys exposed to exogenous nitric oxide.*

*Rats used in the research were divided into 2 even groups. The animals in the experimental group received L-Arginine - 40mg/kg of the body weight, per os, every other*

day for 2 weeks and were decapitated after 3 weeks of the experiment. The rats in the control groups received 2ml of distilled water, per os, every other day and were decapitated after 3 weeks following the experiment commencement.

The preparations for analysis were made on the basis of kidney segments stained with haematoxylin and eosin. They were then studied with an optic microscope and characterised. Also, an apoptosis index was calculated and the research results were subjected to statistical evaluation.

The study results showed that L-arginine served to rat females as a precursor to exogenous nitric oxide, in a dosage thought to be safe for the mother and foetus, induced intensified apoptosis of the renal epithelial cells, as it was observed with the use of an optic microscope and confirmed by a statistically significant increase in the apoptosis index value.

**Key words:** nitric oxide, kidneys, rat, optic microscope.

## **ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ОКИСИ АЗОТА В ПОЧКАХ**

### **КРЫС**

Целем данного исследования была гистологическая оценка почек крыс получавших экзогенный оксид азота.

Крысы, используемые в этом эксперименте, были разделены на две равные группы. Животные из экспериментальной группы получали L-аргинин - 40mg/kg массы тела перорально через день в течение 2 недель и были обезглавлены после 3 недель эксперимента. Крысы из контрольной группы получали 2 мл дистиллированной воды перорально через день в течение 2 недель и были обезглавлены после 3 недель эксперимента.

Из образца почечной ткани взятой для анализа были изготовлены препараты, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Препараты рассматривались под световым микроскопом и были описаны. Был также рассчитан индекс реализации апоптоза и результаты были подвергнуты статистическому анализу.

Исследования показали, что L-аргинин в качестве прекурсора оксида азота при экзогенным введении самкам крыс в безопасней дозе для матери и плода вызывает тяжелый апоптоз в эпителиальных клетках почек, наблюдаемый под световым микроскопом и подтверждено статистически существенным ростом индекса апоптоза.

**Ключевые слова:** оксид азота, почки, крыса, световой микроскоп.

## WSTĘP

L-arginina, kwas 2-amino 5-guanidynopentanowy, została wyekstrahowana z nasion łubinu w XIX wieku. [12]. W 1910 r. opisano jej strukturę chemiczną. W latach pięćdziesiątych XX wieku zauważono, że arginina jest aminokwasem endogennym (non- Essentials) i wytwarzana jest w każdym zdrowym organizmie w wystarczającej ilości. U osób chorych i dzieci, jej produkcja spada i pojawia się konieczność suplementacji z podawanymi pokarmami. Arginina występuje szczególnie w nabiale, wołowinie, wieprzowinie, drobiu, rybach, orzechach, zbożach, soi i słoneczniku [8].

L-arginina stosowana jest jako lek w wielu schorzeniach związanych z niedoborem tlenu azotu. Należą do nich: nadciśnienie tętnicze samoistne, indukowane ciążą, płucne, miażdżyca tętnic kończyn dolnych, choroba Raynauda, hipercholesterolemia, stabilna choroba niedokrwienna serca, niewydolność krążenia, jaskra, cukrzyca, przewlekła niewydolność nerek,

Tlenek azotu, który powstaje w śródbłonku naczyń łożyskowych reguluje przepływ krwi przez łożysko. Jedną z hipotez rozwoju nadciśnienia indukowanego ciążą jest pojawiające się zaburzenie w układzie L-arginina-NO. Niedobór NO prowadzi do pojawienia się nieprawidłowości łożyska, co uważa się za przyczynę stanu przedrzucawkowego [7].

Jednym z zagadnień nadal do końca niewyjaśnionych jest wpływ leków podawanych w trakcie ciąży fizjologicznej i w tak zwanym „zatruciu ciążowym”, czyli gestozie na narządy matki. Nie mogą one być toksyczne ani dla rozwijającego się płodu ani dla matki. Jednym z leków bezpiecznie stosowanym podczas ciąży, zapobiegającym rozwojowi nadciśnienia jest donor egzogennej tlenu azotu – L-arginina. Podawana na oddziałach patologii ciąży nie wywołuje laboratoryjnie i klinicznie uchwytanych skutków ubocznych niebezpiecznych dla matki i płodu. Czy jednak na poziomie komórkowym, gdzie zaczyna się większość patologii układowych nie powoduje L-arginina odwracalnych lub/i nieodwracalnych zmian, wpływających na sprawność narządów podczas ciąży lub w przyszłości?

Celem obecnej pracy była analiza histologicznych obrazów nerek samic szczura, poddanych działaniu L-argininy w dawce zbliżonej do stosowanej w położnictwie. Wycinki narządów barwione standardową przeglądową metodą z użyciem zasadochłonnej Hematoksyliny i kwasochłonnej Eozyny oglądano pod mikroskopem świetlnym i opisano porównując do obrazów z grupy kontrolnej.

## MATERIAŁ I METODY

W pracy użyto samice szczurów białych szczepu Wistar, o początkowej masie ciała 200-250g, w wieku od 3,5 do 4 miesięcy.

Samice dobrano losowo zgodnie z zasadą jednoczasowości grup kontrolnych i badanych.

Zwierzęta podzielono na 2 równoliczne grupy – po 8 samic w każdej. I grupa – samice, którym podawano *per os* 40 mg/ kg m.c. L-argininy co drugi dzień, przez 2 tygodnie i dekapitowano po 3 tygodniach trwania doświadczenia. II grupa – kontrolna, samice, którym podawano *per os* ok. 2 ml wody destylowanej co drugi dzień, przez 2 tygodnie i dekapitowano po 3 tygodniach trwania doświadczenia.

Pobrane do badań histopatologicznych wycinki lewej nerki szczurów utrwalono w 10% formalinie zbuforowanej do pH 7,4 (buforem fosforanowym) i po odwodnieniu we wzrastających stężeniach etanolu (40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99,9%) prześwietlano w ksylenie i zatapiano w parafinie.

## INTRODUCTION

L-arginine, a 2-amino 5-guadininopentanoic acid, was first isolated from lupine seeds in the 19<sup>th</sup> c. [12]. Its chemical structure was identified in 1910. In the 1950s it was concluded that arginine is an endogenous amino acid (non-essentials), produced in every healthy organism in sufficient quantities. Its production in ill persons and children is lower and requires supplementation through the diet. The main sources of arginine include dairy products, beef, pork, poultry, fish, nuts, different kinds of corn, soy and sunflower seeds [8]. L-arginine is used as medicine in treating conditions related to nitric oxide deficiency, such as: pregnancy induced hypertension, pulmonary hypertension, atheromatosis of the lower extremities, Raynaud's disease, hypercholesterolemia, stable ischaemic heart disease, circulatory failure, glaucoma, and chronic renal failure.

Nitric oxide, produced in endothelial vessels of the placenta, regulates blood flow through the placenta. One of the hypotheses concerned with pregnancy induced hypertension relates to a dysfunction in the structure L-arginine-NO. NO deficiency leads to the occurrence of certain irregularities in the placenta, which is believed to be the cause of preeclampsia [7].

One of the unresolved issues concerns the impact of the medication taken during physiological pregnancy and the so-called 'pregnancy poisoning', i.e. gestosis, on the mother's internal organs. Those medicines cannot be toxic to the developing foetus or the mother. One of the medicines safely administered to pregnant women to prevent hypertension advancement is L-arginine – donor of exogenous nitric oxide. It was observed that L-arginine administered at pregnancy pathology wards does not cause any side effects detectable in the lab and clinical tests that would be dangerous to the mother and the foetus. However, the question is whether on the cellular level, where most of the systemic pathologies begin, L-arginine induces any reversible or/and irreversible changes affecting organ efficiency during the pregnancy or in the future life?

The objective of the current study was to analyse histological images of female rat kidneys under subjected to the influence of L-arginine in the dosage similar to that applied in obstetrics. Organ segments stained with the application of the standard review method involving the use of basophilic haematoxylin and acidophilic eosin were analysed with an optic microscope and characterised by comparing them to the images received from the control group.

## MATERIAL AND METHODS

The research was conducted on the strain of white female Wistar rats with initial body mass of 200-250g, aged from 3.5 to 4 months.

The females were selected randomly in accordance with the simultaneity principle of experimental and control groups.

The animals were divided into 2 even groups – 8 females each. In the 1<sup>st</sup> group – the females were administered L-arginine in the dose of 40 mg/ kg, *per os*, every other day for two weeks, and were decapitated after 3 weeks of the experiment. In the 2<sup>nd</sup> group – the control group, the females were administered 2ml of distilled water, *per os*, every other day for two weeks, and were decapitated after 3 weeks of the experiment.

The specimens collected for histological examination from the rats' left kidneys were fixed in 10% formalin buffered to pH 7.4 (phosphatic buffer), then dehydrated in a graded ethanol (40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99.9%), subjected to xylene and embedded in paraffin.

Bloczki parafinowe krojono przy użyciu mikrotomu na skrawki o grubości 5  $\mu\text{m}$ , które następnie umieszczano na szkiełku podstawowym i po odparafinowaniu barwiono Hematoksyliną i Eozyną.

Zabarwione preparaty oglądano pod mikroskopem świetlnym. Opisywano komórki nabłonka kanalików nerkowych krętych I i II rzędowych w nerce. Zwrócono szczególną uwagę na cechy apoptozy widoczne na preparatach. Dokumentacji fotograficznej dokonano przy użyciu aparatu fotograficznego do zdjęć mikroskopowych – JenaVal Contrast Carl Zeiss. Wyniki badań przedstawiono w formie opisowej.

Do określenia ilościowego stopnia nasilenia apoptozy w preparatach pochodzących z badanych narządów (nerki) posłużono się indeksem apoptozy (AI, Apoptotic Index). Badano po 3 preparaty pochodzące od każdego osobnika. Ciemno wybarwione hematoksyliną jądra komórkowe o zmniejszonym obwodzie i średnicy, uznano za jądra piknotyczne, będące jednym z wykładników zachodzącej w komórce apoptozy. Na preparatach barwionych Hematoksyliną i Eozyną powiększonych ok. 1000x (pow. liniowe: 985x, pow. kwadratowe: ok. 1mln x) liczono ilość piknotycznych jąder w 100 obserwowanych komórkach w preparatach nerki w badanej doświadczalnej grupie i porównywano z odpowiadającą jej grupą kontrolną. Wyniki przedstawiono w %. Podczas liczenia posługiwano się mikroskopem projekcyjnym (MP3 Nr 1185, PZO Poland). Brano pod uwagę jedynie komórki nabłonka kanalików w nerce. Wyniki badań poddano analizie statystycznej.

#### WYNIKI BADAŃ

W grupie kontrolnej obraz mikroskopowy nerek był zbliżony do opisów podręcznikowych

Kanaliki nerkowe charakteryzowały się wyraźnie widocznym, pustym światłem, bez patologicznych złogów (Rys. 1).

Kanaliki kręte I rzędowe, proksymalne (kanaliki główne) ułożone były w miarę regularnie. Ścianę ich budował nabłonek jednowarstwowy sześcienny zbudowany z komórek, których ściany nie były wyraźne. Cytoplazma komórek w barwieniu H+E była różowa, kwasochłonna (Rys.1). Jądra komórek w liczbie 4-5 na przekroju wybarwione Hematoksyliną na fioletowo były okrągłe, ułożone regularnie po środku komórek.

Światło kanalików było gwiazdkowate, przysłonięte rąbkiem szczoteczkowym.

Kanaliki kręte II rzędu, dystalne (wstawki) posiadały regularne, okrągłe lub owalne światło. Kanalik wyścielał nabłonek jednowarstwowy sześcienny. Komórki nabłonka, na przekroju 5-6, miały słabo zaznaczone granice.

Ogniskowo w komórkach kanalików nerkowych grup kontrolnych były widoczne ciemniejsze jądra o nieco zmniejszonym obwodzie, mogące odpowiadać jądom piknotycznym, charakterystycznym dla komórek apoptotycznych. Również w świetle niektórych kanalików można było zauważyć nagie jądro. Zjawiska te były jednak incydentalne, zauważalne tylko u niektórych osobników, a w obliczeniach statystycznych mieściły się w granicach błędów obliczeń.

The paraffin blocks were cut with the use of the 5 µm microtome and placed on microscope slides; after deparaffinization, they were stained with haematoxylin and eosin.

The stained preparations were examined with an optic microscope, with the characterization of the epithelial cells of the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> convoluted tubules of the kidneys. Special attention was paid to the features suggesting apoptosis. The photographic documentation was prepared using the Jenaval Contrast Carl Zeiss for microscope images. The results were presented in a descriptive form.

The quantitative evaluation of the level of intensification of apoptosis in the preparations from the examined organs (kidneys) was carried out by applying Apoptotic Index (AI). Each time, 3 preparations from each specimen were examined. The cell nuclei, dark-stained with the use of haematoxylin, and characterised by reduced circumferences and diameters were recognized as pyknotic nuclei, which is one of the signs of apoptosis occurring in a cell. The haematoxylin and eosin stained kidney preparations magnified ca. 1000 times (linear surfaces: x985, square surfaces: ca. x1million) were used in the calculation of the number of pyknotic nuclei in 100 observed cells of the specimen taken from the experimental group and compared with the corresponding number of cells in the specimen from the control group. The results were represented in percentage values. The calculations were conducted with the use of a projection microscope (MP3 No. 1185, PZO Poland). The analysed cells included only the epithelial cells of renal tubules. The results were subjected to statistical analysis.

#### **RESEARCH RESULTS**

The microscope image of kidneys from the control group was similar to the descriptions provided in medical textbooks.

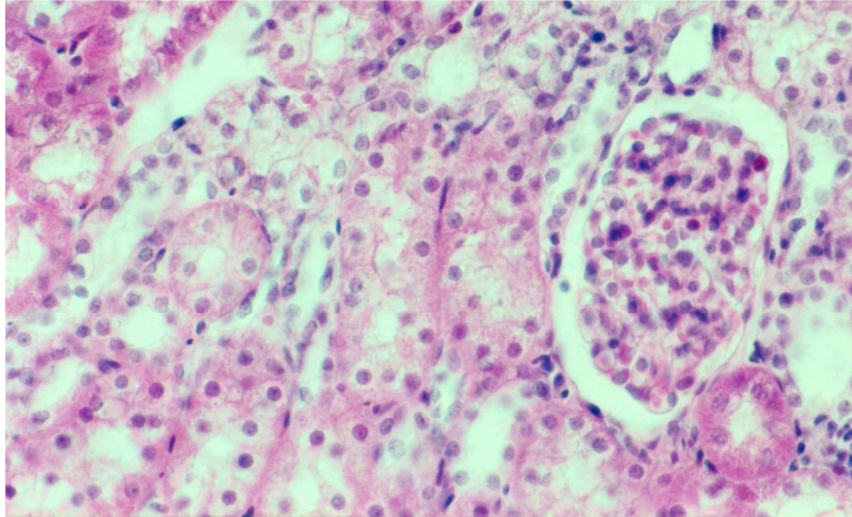
The kidney tubules were characterised by a clearly visible empty lumen, with no pathological deposits. (Fig. 1)

The 1<sup>st</sup> convoluted proximal tubules (main tubules) were arranged in a regular way. Their walls were built of a one-layer epithelium of cuboidal cells, the walls of which were not clearly visible. The cell cytoplasm with H+E stain was pink, acidophilic. (Fig.1). The total count of 4-5 cell nuclei in the examined section, stained violet with haematoxylin, were round and regularly positioned in the focal positions of the cells.

The lumen of the tubules was stellate, obscured with the brush border.

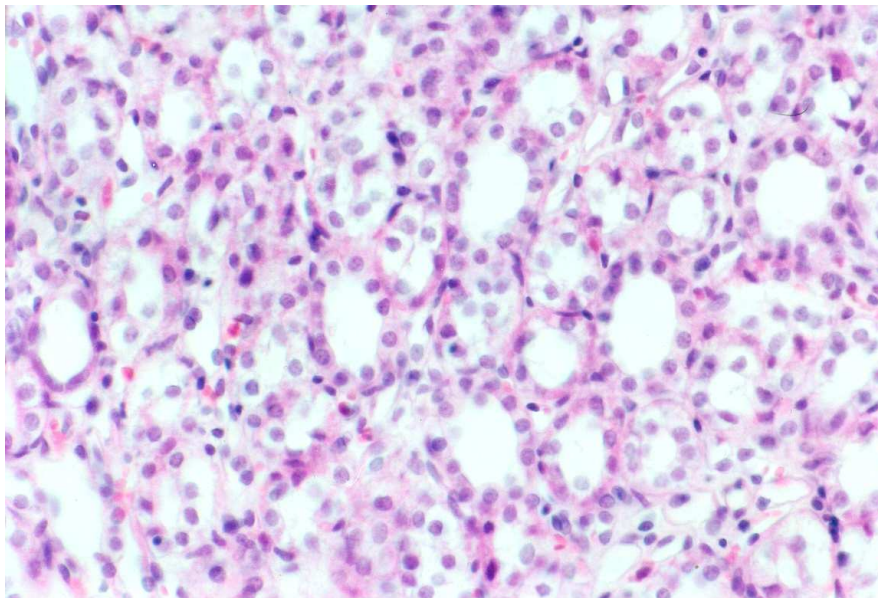
The 2<sup>nd</sup> convoluted distal tubules were characterised by a regular, round or oval lumen. The tubules were lined with a one-layer epithelium of cuboidal cells. The boundaries of the epithelial cells (5-6 in the section) were faint.

In the focal areas of the renal tubule cells from the control group there were visible darker nuclei with slightly reduced diameters, which could correspond to the pyknotic nuclei characteristic of apoptotic cells. Also, it was possible to observe naked nuclei in the lumen of some tubules. However, this phenomenon was incidental, noticeable only in some specimens, which situated them within the statistical error.



Rys. 1. Grupa kontrolna. Fragment nerki samicy szczura. Prawidłowe kanaliki nerkowe, o pustym świetle. Cytoplazma komórek nabłonka kanalików różowa, jądra okrągłe, w centrum komórek ułożone regularnie, fioletowe. Widocznych kilka pyknotycznych jąder. Na fotografii widać również kłębek nerkowy z nieco powiększoną przestrzenią moczową. Barwienie H+E. Pow. 400x.

Obraz kanalików nerkowych samic z grupy doświadczalnej nieznacznie różnił się od obrazu nerek samic z grupy kontrolnej. Zmiany w kanalikach nerkowych były ogniskowe i segmentalne. Dotyczyły one pojedynczych kanalików, a nawet komórek (Rys. 2). Światło niektórych kanalików było poszerzone, innych zwężone, z obecnymi w nim nagimi pyknotycznymi jądrami. W cytoplazmie komórek kanalików nerkowych widoczne były ciemne o zmniejszonym obwodzie pyknotyczne jądra. Cytoplazma niektórych komórek była przejaśniała.



Rys. 2. Grupa doświadczalna. Fragment nerki samicy szczura, której podano L-argininę. Widoczne grupy zniszczonych kanalików nerkowych oraz ciemno zabarwione pyknotyczne jądra o nieregularnym kształcie. Widoczne niewielkie przekrwienie. Barwienie H+E. Pow. 200x.

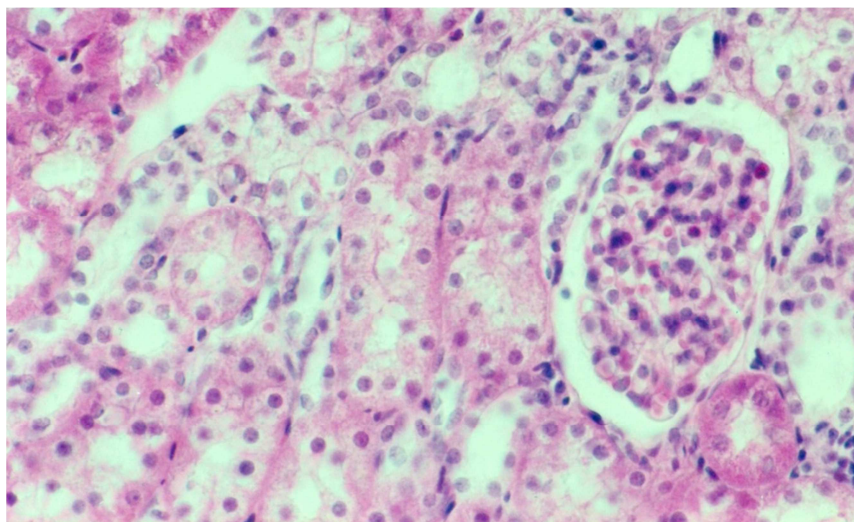


Fig. 1. Control group. The kidney segment from a female rat. Regular renal tubules with an empty lumen. Epithelial cells with pink cytoplasm, round nuclei positioned regularly in the focal area, violet. Visible several pyknotic nuclei. Also, a visible renal glomerulus with slightly enlarged urinary space. Staining H+E. Magnification x 400.

The image of the renal tubules from the experimental group was slightly different from the image of the kidneys harvested from the females in the control group. The changes in the tubules were focal and segmental. They concerned only single tubules or even single cells. (Fig. 2) Some tubules were characterised by a widened, while others by a narrowed lumen with present naked pyknotic nuclei. The cytoplasm of the tubular cells showed visible dark pyknotic nuclei of a reduced diameter. In some cells the cytoplasm was brightened.

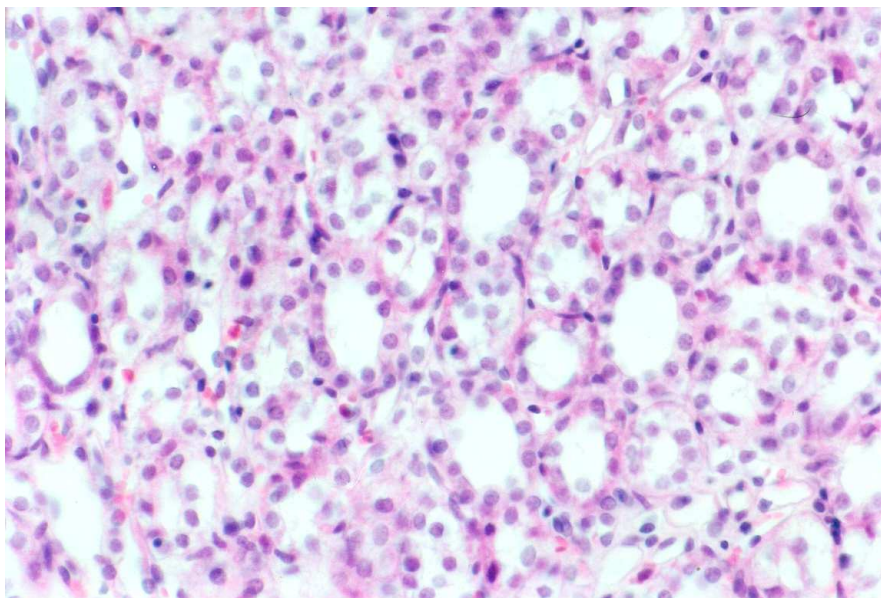


Fig. 2. Experimental group. The kidney segment from a female rat after the administration of L-arginine. Visible groups of destroyed renal tubules and dark-stained pyknotic nuclei of irregular shapes. Visible slight plethora. Staining H+E. Magnification x 200.



**INDEKS APOTOZY**

Istotne statystycznie różnice zauważono między grupami doświadczalną a kontrolną ( $p=0,00013$ )(TAB.NR1). W grupie doświadczalnej zauważono statystycznie istotny wzrost ilości komórek apoptotycznych w stosunku do kontroli. L-arginina wywołała apoptozę komórek nabłonka kanalików nerkowych.

Tabela 1.

Średnia ilość komórek apoptotycznych w nerkach samic szczura Test ONE WAY ANOVA. ( $p$ =istotność statystyczna).

grupa	Średnia ilość komórek apoptotycznych na 100 badanych	Odchylenie standardowe	ONE WAY ANOVA
kontrolna	4,90	+/-2,28	$p=0,00013$
doświadczalna	9,60	+/-2,59	

**DYSKUSJA**

Tlenek azotu (NO) znany jest jako regulator wielu procesów zachodzących w organizmie [6]. Posiada on zdolność wywoływania apoptozy poprzez wolne rodniki tlenowe i szok tlenowy w komórce. Poznano korzystne i niekorzystne działanie NO w wielu chorobach na drodze hamowania lub też pobudzania programowanej śmierci komórki [3, 5]. Efekt działania NO jest zależny od dawki leku i rodzaju tkanki [2].

Niedobór endogennego NO przyczynia się do powstawaniu wielu stanów patologicznych: nadciśnienia tętniczego w przebiegu zatrucia ciążowego, miażdżycy tętnic i hipercholesterolemii [9]. Natomiast nadmiar endogennego tlenku azotu przyczynia się do rozwoju chorób autoimmunologicznych, nowotworów, miażdżycy, zapaleń i progresji chorób zwyrodnieniowych układu nerwowego. Jest więc to substancja o szerokim wachlarzu efektów działania, zarówno pozytywnych dla organizmu, jak też szkodliwych. Pozytywne efekty działania znalazły zastosowanie w podawaniu egzogenego tlenku azotu przy preeklampsji, chorobie wieńcowej, miażdżycy naczyń kończyn dolnych, a nawet niektórych nowotworach [1].

Nie jest do końca poznany wpływ NO na apoptozę. Wielu badaczy wykazało już działanie proapoptotyczne tlenku azotu, powodowane przez szok tlenowy przez niego wywołany [2]. Nadal jednak nie są poznane dokładne mechanizmy działania proapoptotycznego NO i jego korelacje z innymi substancjami aplikowanymi jako leki w wielu stanach chorobowych.

Są też liczne doniesienia o działaniu antyapoptotycznym tlenku azotu, m.in. na hepatocyty poddane ekspozycji przeciwciał anty-FAS lub pozbawione czynników wzrostu [4, 11].

W niniejszym doświadczeniu dawka L-argininy była zbliżona do tej, którą stosuje się u kobiet ciężarnych, w przypadku leczenia gestozy. Dawka ta powinna być więc bezpieczna dla matki i dla płodu (tzw. dawka wymiatająca wolne rodniki) [10].

Z przeprowadzonych w niniejszym doświadczeniu badań wynika jednak, iż L-arginina, jako dawca egzogenego tlenku azotu wydukowała sygnał do apoptozy w prawidłowych komórkach kanalików nerkowych, badanych samic szczura.

**APOPTOTIC INDEX**

The research results revealed the existence of certain statistically relevant differences between the experimental and the control group ( $p=0.00013$ )(TAB.NR1). The experimental group was characterised by a statistically significant increase in the number of apoptotic cells as compared to the control group. The administration of L-arginine induced apoptosis of the epithelial cells of renal tubules.

Table 1.

The average number of apoptotic cells in female rat kidneys, ONE WAY ANOVA test ( $p$ =statistical relevance).

<b>Group</b>	<b>The average number of apoptotic cells in 100 researched cells</b>	<b>Standard deviation</b>	<b>ONE WAY ANOVA</b>
<b>control</b>	4.90	+/-2.28	p=0.00013
<b>experimental</b>	9.60	+/-2.59	

**DISCUSSION**

Nitric oxide (NO) is known as a regulator of many processes occurring in the body [6]. It is characterised by the capacity of inducing apoptosis through free radicals and an oxidation process in a cell. Moreover, nitric oxide is known for having both a favourable and an unfavourable impact on numerous diseases through inhibiting or accelerating the programmed cell death [3, 5]. The effect of applying NO depends on the medication dosage and tissue type [2].

The deficiency of endogenous NO results in an occurrence of numerous pathological conditions: pregnancy induced hypertension, atheromatosis and hypercholesterolemia [9]. Its excess, on the other hand, leads to the development of autoimmune diseases, tumours, sclerosis, inflammations and progress of degenerative diseases of the nervous system. Thus, this is a substance with a vast array of effects, both positive and harmful for the organism. The positive effects have been obtained by administering exogenous nitric oxide in preeclampsia, coronary heart diseases, atheromatosis of the lower extremities, as well as in treating some tumours [1].

The impact of NO on apoptosis has not yet been completely explored. Numerous researchers have already demonstrated the pro-apoptotic activity of nitric oxide caused by the oxidation process induced by it [2]. Nevertheless, the precise mechanisms of NO's pro—apoptotic activity and its correlations with other substances applied as medicines to treat diseases, have not yet been recognised.

Also, as it was frequently reported, nitric oxide reveals a certain anti-apoptotic activity, for instance, on hepatocytes exposed to anti-FAS antibodies or deprived of growth factors [4, 11].

In the current experiment, the dose of L-arginine was approximated to that used in the case of pregnant women in gestosis treatment. Therefore, it should be considered safe for the mother and the foetus (the so-called dose sweeping out the free radicals) [10].

Indeks apoptozy wzrósł w komórkach nabłonka kanalików nerkowych istotnie statystycznie w stosunku do kontroli. Również ogniskowe zmiany oglądane w kanalikach nerkowych pod mikroskopem świetlnym i elektronowym świadczyły jakościowo i ilościowo o wzmożonej apoptozie.

Tlenek azotu egzogenny stosowany jest dość powszechnie w leczeniu. Jednak w świetle niniejszych badań należałoby wziąć pod rozwagę przede wszystkim dawkę podawanego prekursora NO i rozpatrzyć ewentualne niekorzystne działanie na potomstwo.

Opisane zmiany w nerkach w niniejszej pracy dotyczą dorosłych samic szczura, poddanych działaniu L-argininy. Celowym byłaby ocena nerek ciężarnych samic szczura, którym podano L-argininę. Z pewnością będzie to obiektem zainteresowań następných badań autorów.

Yet, the conducted experiment showed that L-arginine administered as a donor of exogenous nitric oxide induced a signal for apoptosis in regular cells of the renal tubules of the examined female rats.

The increase in the apoptosis index in the epithelial cells of the renal tubules was statistically relevant in relation to the control group. Also, the focal changes observed in the renal tubules with the use of an optic and electron microscope revealed an intensified apoptosis both in the quantitative and qualitative evaluation.

Exogenous nitric oxide is quite frequently applied in various medical treatments. However, in the light of the presented research, the factors that should be considered first of all before such treatment commencement include the dosage of an NO precursor and analysis of the possible negative impact on the offspring.

The characterised changes occurring in kidneys, concerned adult rat females subjected to the influence of L-arginine. The presented study will certainly be of interest to successive research authors.

**LITERATURA/ BIBLIOGRAPHY**

1. Brüne B., von Knethen A., Sandau K.B.: Nitric oxide (NO): an effector of apoptosis Cell Death&Differentiation vol.6 , 10 :969-975, 1999.
2. Eu JP., Liu L., Zeng M., Stamler JS.: An apoptotic model for nitrosative stress. Biochemistry. 2000, 39: 1040-7.
3. Kaźmierczuk A. HSP 27 antyoksydacyjne właściwości, które chronią komórki nerwowe przed uszkodzeniem i zapobiegają wielu chorobom neurodegeneracyjnym. Postep. Hig. Med.vDośw. 2010,64:273-283.
4. Kim Y.M., Talanian R.V., Billiar T.R.: Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. J.Biol.Chem. dec 5;272(49):31138-48, 1997.
5. Laskowska E.: Małe białka szoku termicznego-rola w apoptozie, karcynogenezie i chorobach związanych z agregacją białek . Postępy Boch., 2007, 53: 19-26.
6. Maleck WH., Piper SN., Koetter K.: Joseph Priestley, nitrous oxide and oxygen. Anaesthesist. 2005,54: 395-6,.
7. Mignini L.E., Villar J., Khan K.S.: Mapping the theories of pre-eclampsia: the need for systematic reviews of mechanisms of the disease. Am.J.Obstet.Gynecol. 194:317-21, 2006.
8. Pui Y, Fisher H.: Factorial supplementation with arginine and glycine on nitrogen retention and body weight gain in the traumatized rat. J Nutr 109:240-246, 1979.
9. Rytlewski K., Zdebski Z.: Nitric oxide - one of the mechanisms that prevent changes that occur during pregnancy.. Gin Pol. 72: 738-743, 2001.
10. Rytlewski K., Olszanecki R., Korbut R., Zdebski Z.: Effects of prolonged oral supplementation with l-arginine on blood pressure and nitric oxide synthesis in preeclampsia: Eur J Clin Invest. 2005, 35: 32-7.
11. Torok N.J., Higuchi H., Bronk S., Gores G.J.: Nitric Oxide Inhibits Apoptosis Downstream of Cytochrome c Release by Nitrosylating Caspase 9. Cancer Research 62: 1648 , 2002.
12. Winterstein E: Ernst Schulze: Biography and bibliography (with portrait). Biochemical Bulletin vol.II , N 5: 1-21 ,1912.