

Składam serdeczne podziękowania Promotorowi
Pani dr hab. n. med. Agnieszce Pedrycz – Wieczorskiej
za życzliwość, cenne uwagi merytoryczne,
wszechstronną pomoc oraz poświęcony czas

Alicja Ciechan

**Ocena wpływu L-argininy na tor indukcji sygnału
do apoptozy wywołanej zmianami hormonalnymi
w hepatocytach wątroby ciężarnych samic szczura.**

**Praca na stopień doktora nauk medycznych
w dziedzinie biologii medycznej**

Promotor

Dr hab. n. med. Agnieszka Pedrycz – Wieczorska
Adiunkt w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii
z Pracownią Cytologii Doświadczalnej
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Lublin 2011

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP.....	5
1.1. ARGININA.....	5
1.2. TLENEK AZOTU.....	7
1.3. HEPATOCYTY. WĄTROBA PODCZAS CIAŻY.....	12
1.4. APOPTOZA.....	16
1.4.1. KASPAZA 3	20
1.4.2. KASPAZA 9	20
1.4.3. KASPAZA 12	22
1.4.4. KASPAZA 8	23
1.4.5. ZMIANY W MORFOLOGII KOMÓREK ULEGAJĄCYCH APOPTOZIE	23
1.4.6. METODY IDENTYFIKACJI APOPTOZY	25
2. CEL PRACY	29
3. MATERIAŁ	30
4. METODY	32
4.1. ZAPŁODNIENIE / CIAŻA.....	32
4.2. BADANIA MORFOLOGICZNE - MAKROSKOPOWE	32
4.3. BADANIA HISTOLOGICZNE W MIKROSKOPIE ŚWIETLNYM	32
4.4. INDEKS APOPTOZY.....	33
4.5. BADANIA IMMUNOHISTOCHEMICZNE.....	33
4.6. OCENA BADAŃ IMMUNOHISTOCHEMICZNYCH	34
4.7. OCENA STATYSTYCZNA.....	35
5. WYNIKI BADAŃ	36
5.1. OBSERWACJE ZACHOWANIA ZWIERZĄT.....	36
5.2. OCENA ZAPŁODNIENIA / CIAŻY.....	36
5.3. OCENA MAKROSKOPOWA WĄTROBY POBRANEJ DO BADAŃ.....	36
5.4. WYNIKI BADAŃ HISTOLOGICZNYCH – OCENA WĄTROBY W MIKROSKOPIE ŚWIETLNYM	37

5.5. INDEKS APOPTOZY (APOPTOTIC INDEX, AI)	46
5.6. WYNIKI BADAŃ IMMUNOHISTOCHEMICZNYCH	51
5.6.1. KASPAZA 3	51
5.6.2. KASPAZA 8	60
5.6.3. KASPAZA 9	70
5.6.4. KASPAZA 12	79
6. OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ - DYSKUSJA	89
7. WNIOSKI.....	105
8. STRESZCZENIE.....	106
9. ABSTRACT	112
10. LITERATURA	117
11. SPIS FOTOGRAFII	134
12. SPIS WYKRESÓW	137
13. SPIS TABEL	139

1. WSTĘP

Zainteresowanie wielu badaczy apoptozą – zaprogramowaną śmiercią komórki oraz procesami jej pobudzenia i hamowania wynika z potencjalnych możliwości leczenia wielu schorzeń.

L-arginina od dawna była stosowana w leczeniu jako lek hepatoprotekcyjny i antyasteniczny. Odkrycie, że tlenek azotu powstaje z argininy zmieniło spojrzenie na rolę argininy w wielu procesach fizjologicznych i patologicznych.

Ciąża predysponuje wątrobę do tzw. uszkodzeń samoistnych mogących powodować rozległe drobnokropelkowe stłuszczenie, żółtaczkę ciężarnych, czy inne zmiany towarzyszące w zatruciu ciążowym. Wiadomo również, że wątroba ulega uszkodzeniu w około połowie przypadków gestozy.

Nie do końca znana jest również natura tlenku azotu. Wiadomo, że w zależności od dawki może on chronić komórkę przed śmiercią lub też może tą śmierć indukować. Tlenek azotu działa różnie, zależnie od typu komórek i narządów.

Nie znane są do tej pory zmiany jakich może dokonać tlenek azotu w wątrobie ciężarnych, chociaż NO w postaci L-argininy jest stosowany w patologii ciąży, m.in. w nadciśnieniu tętniczym indukowanym ciążą, czy w hypotrofii płodu.

Wyniki mojego doświadczenia mogą być pomocne w badaniach nad śmiercią komórki oraz nad wpływem NO na narządy ciężarnych.

1.1. ARGININA

L-arginina (kwas 2-amino-5-guanidynowalerianowy) została po raz pierwszy wyizolowana z kielków łubinu w 1886 roku, a w 1895 roku jej obecność stwierdzono również w tkankach zwierzęcych (Wu i wsp. 1998).

W 1904 roku zidentyfikowano w wątrobie enzym – arginazę, hydrolizującą argininę do ornityny i mocznika. Badania biochemiczne i fizjologiczne funkcji L-argininy w organizmie rozpoczęły się w latach 30-tych XX wieku. Wówczas udowodniono, że arginina wpływa na prawidłowe funkcjonowanie wątroby, gdzie odgrywa zasadniczą rolę w cyklu mocznikowym, istotnym dla usuwania z ustroju toksycznego amoniaku (Krebs i wsp. 1932, Jenkinson i wsp. 1996).

W latach 1930 – 1940 wykazano, że arginina jest substratem w syntezie kreatyny, prekursora wskaźnika funkcjonowania nerek – kreatyniny (Wys i wsp. 2000).

W latach 1950 – 1970 przeprowadzone badania wykazały, że L-arginina jest niezbędnym aminokwasem do prawidłowego rozwoju młodych organizmów, a organizmy dorosłe są w stanie syntetyzować ją endogennie. Zauważono także, że zarówno u dzieci, jak i u dorosłych jest ona niezbędnym aminokwasem do prawidłowego funkcjonowania organizmu i musi być dostarczana wraz z pożywieniem oraz ma szczególne znaczenie w przypadku urazów, czy stanów chorobowych, m.in. w przypadku niewydolności nerek (Flynn i wsp. 2002, Wu i wsp. 2000).

Wątroba i nerki są głównymi narządami odpowiadającymi za powstawanie L-argininy w organizmie. W 1981 roku w badaniach na szczurach wykazano, że jelito cienkie jest głównym źródłem cytruliny, potrzebnej do syntezy endogennej argininy (Windmueller 1981).

Arginina od dawna jest stosowana w leczeniu jako lek hepatoprotekcyjny i antyasteniczny w takich przypadkach klinicznych jak: zaburzenia czynności wątroby związane z nieprawidłowym przebiegiem cyklu mocznikowego, zatrucie ustroju amoniakiem, stany asteniczne, niedożywienie, czy alkalozja hipochloremiczna. Mechanizm jej działania w tych przypadkach polega na stymulacji cyklu mocznikowego i w efekcie usuwaniu toksycznego amoniaku (Kostka-Trąbka 2002).

Odkrycie w 1988 roku, że tlenek azotu (NO) powstaje z argininy i działa rozkurczowo na naczynia, zmieniło spojrzenie na rolę argininy w wielu procesach fizjologicznych i patologicznych oraz spowodowało wzrost zainteresowania znaczeniem tego aminokwasu (Palmer i wsp. 1988). Wykazano, że arginina przy udziale tlenu i enzymu – syntazy tlenku azotu przechodzi w cytrulinę z wytworzeniem w tej reakcji tlenku azotu (Moncada i wsp. 1993).

Najważniejszym źródłem argininy do syntezy NO w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych jest pozakomórkowa arginina, obecna w osoczu. Natomiast wewnątrzkomórkowy cykl przemian cytrulina → NO, nazywany również cyklem arginina - cytrulina pełni rolę wspomagającą (Husson i wsp. 2003).

Odkrycie szlaku metabolicznego arginina → NO ujawniło nowe, szerokie możliwości terapeutycznego zastosowania argininy. Wiadomo bowiem, że w przypadku wielu chorób, występują istotne niedobory NO, stąd też prowadzone są od wielu lat badania nad możliwościami zastosowania L-argininy w takich schorzeniach, m. in. jak:

- nadciśnienie tętnicze,
- patologie ciąży związane z nadciśnieniem tętniczym (Kostka-Trąbka 2002),
- hypotrofia płodu (Pardej i wsp. 2009),

- choroba niedokrwienna, niewydolność krążenia,
- miażdżycy tętnic kończyn dolnych (Boger i wsp 2001, Tousoulis i wsp. 2002, Kostka-Trąbka 2002),
- jaskra,
- udary mózgowe, zakrzepy naczyniowe,
- zaburzenia czynności wątroby związane z nieprawidłowym przebiegiem cyklu mocznikowego i zatrucia amoniakiem (Wu i wsp. 2000, Flynn i wsp. 2002),
- hipercholesterolemia, miażdżycy (Gryglewski 1990, Rang i wsp. 2000),
- nadciśnienie płucne (Giaid i wsp.1995),
- cukrzyca (Elliot i wsp.1993),
- przewlekła niewydolność nerek (Vallance i wsp.1992).

Ostatnio wzrosło także zainteresowanie rolą argininy w nowotworach, gdyż aminokwas ten okazał się niezbędny do wzrostu komórek nowotworowych (Graboń 2006).

1.2. TLENEK AZOTU

Tlenek azotu jest silnie dyfundującym i reaktywnym związkiem odgrywającym dużą rolę w wielu procesach fizjologicznych i patologicznych (Krzyżowska 2005).

Tlenek azotu jako związek chemiczny został odkryty w 1770 roku przez Josepha Priestleya (Maleck i wsp. 2005), a w 1977 roku Freid Murand w badaniach nad biochemią NO stwierdził, że jest on aktywnym metabolitem takich związków rozszerzających naczynia krwionośne jak nitrogliceryna i nitroprusydek sodu (Marsh i wsp. 2000).

W 1977 roku Katsuki i wsp. prowadząc badania nad działaniem nitrogliceryny i nitroprusydku sodu stwierdzili, że NO aktywuje cyklazę guanylową – enzym, który produkuje cykliczny GMP (cGMP)- cząsteczkę będącą wtórnym przekaźnikiem, znaną od 1963 roku (Katsuki i wsp. 1977).

W 1980 roku Robert Furchgott i John V. Zawadzki prowadząc badania nad mechanizmami rozszerzania naczyń krwionośnych pod wpływem różnych substancji zauważyli, że śródbłonek naczyń jest nie tylko mechaniczną barierą oddzielającą krew od pozostałych struktur ściany naczyniowej ale decyduje także o napięciu mięśni gładkich, dzięki czemu wpływa zarówno na przepływ krwi przez narządy, jak i na ciśnienie tętnicze (Marsh i wsp. 2000, Przybylski 2001).

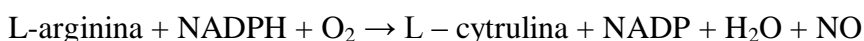
Czynnik wytwarzany przez komórki śródbłonka i rozszerzający naczynia został wówczas nazwany EDRF (endothelium derived relaxing factor) (Furchgott 1999, De Berrazueta 1999).

W 1987 roku Luis Ignarro i Salvador Moncada zidentyfikowali NO jako śródbłonkowy czynnik relaksujący, działający na mięśnie gładkie układu krwionośnego (Ignarro i wsp. 1987, Marsh 2000).

W 1992 roku czasopismo Nature przyznało temu związkowi tytuł cząsteczki roku a za odkrycie roli tlenu azotu w regulacji napięcia mięśni gładkich ścian naczyń krwionośnych oraz za pracę nad ciągiem przemian metabolicznych L-arginina → NO profesorowie Robert Furchgott, Louis J. Ignarro i Ferid Murad otrzymali w 1998 roku Nagrodę Nobla (De Berrazueta 1999).

Początkowo zdolność do syntezy NO wykazano w komórkach śródbłonka i w makrofagach. Dziś wiadomo, że wiele komórek organizmu wykorzystuje L-argininę do syntezy tlenu azotu, który spełnia wiele istotnych funkcji w podstawowych procesach życiowych organizmu człowieka (Ścibor 2004). Stwierdzono, że NO produkowany jest m.in. przez: hepatocyty (Ignarro 1989), zakończenia nerwowe i niektóre neurony (Garthwaite i wsp. 2005), neutrofile, monocyty, mastocyty, płytki krwi (Rytlewski i wsp. 2001).

Endogennie tlenek azotu produkowany jest z L-argininy przy udziale enzymu – syntazy tlenu azotu (NOS) w reakcji:



Syntezę NO w komórkach limituje dostępność wewnątrzkomórkowej argininy i kofaktorów reakcji. NO może również powstawać w organizmie w wyniku redukcji azotynów i jest to droga syntezy niezależna od działania NOS. Dziennie zdrowy człowiek może wytworzyć około 1 mmol endogennego tlenu azotu (Tong i wsp. 2004).

Podział NOS określa trzy typy izoenzymów kodowanych przez różne geny:

- neuronalna NOS (nNOS, typ I NOS),
- indukowana (iNOS, typ II NOS),
- śródbłonkowa (eNOS, typ III NOS).

Enzymy te różnią się masą cząsteczkową, lokalizacją w komórce i wymaganiami co do kofaktorów. Ich ekspresja podlega odmiennej regulacji (Boucher i wsp. 1999, Alderton i wsp. 2001).

Izoenzymy nNOS i eNOS są konstytutywnie wytwarzane tylko w niektórych komórkach organizmu, m.in. w neuronach, płytkach, komórkach śródbłonna naczyń, miocytach, natomiast iNOS jest enzymem indukowanym w większości komórek (Morris 1999, Mungrue i wsp. 2003).

Regulacja aktywności nNOS i eNOS odbywa się na poziomie aktywacji. Są one zależne od kompleksów kalmodulina-jony wapnia (Rytlewski i wsp. 2001). Endogenne i egzogenne substancje, które zwiększają stężenie jonów wapnia w komórkach (np. bradykinina, acetylocholina, histamina, serotonina, trombina, czynnik aktywujący płytki krwi i inne) aktywują syntezę NO (Raghavan i wsp. 2004, Alderton i wsp. 2001, Moncada i wsp. 1991).

Indukowalne izoformy syntazy NO (iNOS) występują zarówno w cytozolu, jak i błonach wielu komórek m.in. makrofagów, neutrofilów, komórek Kupfera, hepatocytów, astrocytów, również w komórkach śródbłonna i mięśniówki gładkiej naczyń krwionośnych. Regulacja ich aktywności odbywa się przede wszystkim na poziomie ekspresji ich genów. Izoformy te związane są z enzymem kalmoduliną i nie wymagają do swej aktywności jonów wapnia. Ich ekspresję indukują cytokiny (TNF- α , IL-1) oraz endotoksyny (lipopolisacharydy bakteryjne) (Lee i wsp. 2003, Mungrue i wsp. 2003, Rytlewski 2001, Morris 1999).

Izoformy konstytucjonalne są stale obecne w komórkach. Katalizowana przez nie synteza tlenku azotu jest krótkotrwała i pulsacyjna, doprowadzająca do powstania niskich stężeń NO. Izoformy indukowalne nie są obecne w komórkach dopóki nie nastąpi ekspresja ich genów. Synteza NO odbywa się przez długi czas w dużych stężeniach. Aktywność tych izoform trwa do czasu dostępności L-argininy (Stuehr i wsp. 1985).

Mitochondria same potrafią produkować NO za pomocą izoenzymu mtNOS zlokalizowanego w wewnętrznej błonie białkowo-lipidowej oraz aktywowanego przez jony wapnia. NO wiążąc się z enzymem, oksydazą cytochromu c wpływa na regulację oddychania mitochondrialnego obniżając jego intensywność (Giulivi i wsp. 2006).

Mechanizm działania NO polega na aktywacji cyklazy guanylowej, która przekształca GTP do cGMP oraz S-nitrozylacji białek. cGMP aktywuje zależne od siebie fosfodiesterazy i kinazy oraz kanały jonowe (Raghavan i wsp. 2004, Moncada i wsp. 1991). S-nitrozylacja białek polega na połączeniu powstałego w wyniku utleniania tlenku azotu, reaktywnego jonu nitrozoniowego z grupą sulfhydrylową cysteiny, jednego z aminokwasów budujących białka. W ten sposób powstają białka zwane

S-nitrozotiolami. Są to głównie S-nitrozoalbumina, S-nitrozohemoglobina, S-nitrozoglutation. Ze względu na swoją stabilność pełnią one funkcje magazynowania i transportowania tlenu azotu w organizmie. Utlenianie tioli prowadzi do zmniejszenia puli naturalnych antyoksydantów, np. glutationu. S-nitrozoalbumina i S-nitrozoglutation wykazują zdolność rozszerzania naczyń krwionośnych i hamowania agregacji płytek krwi. S-nitrozoglutation spełnia również istotną rolę w przekazywaniu sygnałów i obronie komórek przed atakiem patogenów (Foster i wsp. 2003).

Tlenek azotu posiada 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 (Laskowska 2007).

W niektórych komórkach NO może sprzyjać indukcji apoptozy (efekt pro-apoptotyczny), w innych może hamować apoptozę (efekt anty-apoptotyczny). Efekt końcowy NO zależy od stopnia produkcji związku oraz jego oddziaływania z innymi cząstkami, takimi jak: tione, białka, reaktywne formy tlenu.

Długotrwała produkcja NO działa jako czynnik indukujący apoptozę poprzez uwalnianie cutochromu c z mitochondriów i aktywację kaspaz, wzrost ekspresji białka p-53, aktywację kinaz aktywowanych stresem oraz spadek ekspresji anty-apoptotycznego białka Bcl-2.

W niskim bądź fizjologicznym stężeniu NO chroni przed apoptozą poprzez uruchomienie szlaków zależnych od cyklicznego guanozyno- 5' – monofosforanu (cGMP), wiążących się z aktywacją m.in. kinazy białkowej G (PKG), wzrostem ekspresji anty-apoptotycznych białek Bcl-2 i białek szoku cieplnego oraz poprzez bezpośrednią S-nitrozylację enzymów efektorowych apoptozy- kaspaz (Krzyżowska 2005).

Tlenek azotu działając na układ krążenia wywołuje rozszerzenie naczyń krwionośnych, hamuje agregację trombocytów i ich adhezję do śródbłonna. W układzie nerwowym pełni funkcję regulatora miejscowego przepływu krwi oraz wielu procesów. NO działa p-zapalnie poprzez produkcję prostaglandyn. Bierze udział w odpowiedzi immunologicznej, obronie przeciwbakteryjnej i przeciwwirusowej. Wykazano także, że NO aktywuje układ fibrynolityczny, prawdopodobnie przez zahamowanie uwalniania aktywatora plazminogenu z płytek krwi (Rosselli i wsp. 1998).

Od chwili wykrycia przez Gustafssona, że NO występuje również w powietrzu wydychanym, bardzo wzrosło zainteresowanie rolą tego związku w chorobach układu

oddechowego (Bates i wsp. 2003). NO w obrębie układu oddechowego rozszerza mięśnie gładkie oskrzeli oraz wywiera wpływ na wydzielanie śluzu i czynność aparatu rzęskowego. Dodatkowo obniżenie napięcia mięśni gładkich naczyń krwionośnych poprawia natlenowanie płuc. Wyniki wielośrodkowych badań nad zastosowaniem inhalacji NO u chorych noworodków wskazują na wyraźną poprawę wentylacji płuc i perfuzji. Odnotowano także spadek umieralności noworodków i zmniejszenie występowania przewlekłej obturacyjnej choroby płuc (Kostka-Trąbka 2002).

Nadprodukcji endogennego NO przypisuje się udział w patogenezie wielu chorób, m.in. chorób zwyrodnieniowych układu nerwowego, chorób autoimmunologicznych, zapaleń, nowotworów. Niedobór NO towarzyszy m.in. nadciśnieniu tętniczemu, hipercholesterolemii, preeklampsji (Rytlewski i wsp. 2001).

W przeprowadzanych badaniach wykryto, że wytwarzanie NO jest zmniejszone u chorych z nadciśnieniem indukowanym ciążą w stosunku do ciężarnych z prawidłowym ciśnieniem krwi. Nie uzyskano jednak jednoznacznego potwierdzenia zmiany jego stężenia we krwi (Kharfi i wsp. 2003).

Ponadto stwierdzono, że istotnym czynnikiem zmniejszającym aktywność NO jest podwyższone stężenie inhibitorów jego syntazy obserwowane w surowicach ciężarnych (Vallance i wsp. 1994).

Liczne badania wskazują, że przyczyną wewnątrzmacicznej hypotrofii płodu jest dysfunkcja śródbłonna naczyniowego związana ze zmniejszoną syntezą tlenu azotu. W warunkach fizjologicznych tlenek azotu poprawia krążenia łożyskowe poprzez m.in. rozkurcz naczyń krwionośnych i zapobieganie agregacji płytek krwi, a w konsekwencji zwiększa dotlenienie oraz odżywienie płodu. Dlatego też wielu badaczy uważa za uzasadnione podawanie egzogennej argininy, jako donora tlenu azotu w przypadkach wewnątrzmacicznej hypotrofii płodu. Ponadto arginina zwiększa wydzielanie hormonu wzrostu (Pardej i wsp. 2009).

Stwierdzono także, że NO wytwarzany jest nie tylko przez komórki śródbłonna naczyń, ale również przez myometrium oraz w znaczących ilościach przez trofoblast (Ramsay i wsp. 1996).

Obecnie pacjentkom podawana jest L-arginina jako substrat egzogenego NO w celu poprawy stanu chorych w schorzeniach takich jak, m.in. nadciśnienie indukowane ciążą, hypotrofia płodu.

Wykazano również możliwy wpływ NO na zapobieganie porodowi przedwczesnemu. Działanie to tłumaczone jest wpływem na relaksację mięśni gładkich,

zapobieganiem skurczom macicy oraz wpływem na krążenie maczyno-płodowe. Wykazano poprawę wskaźników przepływu w tętnicy pępowinowej oraz środkowej mózgu u płodu, co może świadczyć o poprawie dystrybucji przepływu w obrębie łożyska i układzie krążenia płodu (Rytlewski i wsp. 2008).

Wpływ NO na śmierć komórki nadal nie jest do końca wyjaśniony. W zależności od dawki może on chronić komórkę przed śmiercią lub może indukować śmierć. Działa on również zależnie od typu komórek i narządów.

W niniejszym doświadczeniu przebadano proces apoptozy zachodzący w hepatocytach wątroby ciężarnych samic szczura, powstały w wyniku działania L-argininy jako prekursora tlenu azotu. Dawka L-argininy była zbliżona do tej, którą stosuje się u kobiet ciężarnych, w przypadku leczenia gestozy.

1.3. HEPATOCYTY. WĄTROBA PODCZAS CIĄŻY.

Wątroba jest jednym z głównych organów warunkujących utrzymanie homeostazy. Pełni wiele funkcji, spośród których najważniejszymi są: detoksykacja ksenobiotyków i produktów metabolizmu organizmu, w tym różnych hormonów, współdziała w regulacji białek, lipidów i węglowodanów, synteza białek przekaźnikowych oraz układu krzepnięcia, współdziała w procesie odpowiedzi immunologicznej (Kusters i wsp. 2006).

Wątroba jest największym, nieparzystym narządem jamy brzusznej i jednocześnie największym gruczołem naszego organizmu. Zbudowana jest z łącznotkankowego zrębu podtrzymującego liczne naczynia krwionośne, limfatyczne i nerwy, oraz z miększu składającego się z komórek wątrobowych (hepatocytów), komórek Browicza-Kupffera oraz komórek tłuszczowych okołozatokowych (Ito). Wątroba cechuje się kilkoma unikalnymi właściwościami (Zdziarski 2007):

- możliwościami regeneracyjnymi,
- podwójnym unaczynieniem,
- jednolitą homogeną strukturą zapewniającą sprawne działanie całego narządu przy wyłączeniu części miększu z fizjologicznej aktywności,
- udziałem w procesach zapalnych, głównie jako element odpowiedzi nieswoistej (ostra faza, dopełniacz, białka szoku cieplnego).

Charakterystyczne cechy hepatocytów wynikają z następujących właściwości:

- zdolności proliferacyjnej,
- zdolności adhezyjnej,
- autonomii umożliwiającej pełnienie swoich funkcji także poza wątrobą w sposób ektotopowy.

W ciągu minuty przez wątrobę przepływa ok. 500ml krwi z tętnicy wątrobowej o znaczeniu odżywczym i blisko 2 razy więcej z żyły wrotnej, doprowadzającej krew o znaczeniu czynnościowym, co stanowi prawie 25% pojemności minutowej serca. Podwójny system zaopatrzenia sprawia, że powierzchnia wymiany między mięszem wątroby a naczyniami sięga ok. 400m².

Hepatocyty są wielościennymi komórkami o wymiarach 20x30 µm mającymi okrągłe jądro. Od 30 do 80% hepatocytów ma jądra poliploidalne, a ok. 25% ma po 2 jądra. Średni czas życia hepatocytów wynosi co najmniej 150 dni. Cytoplazma jest kwasochłonna. Zawiera 1-2 tys. mitochondriów, których okres półtrwania wynosi 10 dni, ok. 50 tys. diktiosomów aparatu Goldiego oraz rozbudowaną gładką i szorstką siateczkę śródplazmatyczną, ok. 300 lizosomów, ok. 400 peroksysomów oraz liczne ziarna glikogenu (glikosomy), ziarna barwników żółciowych i zgrupowania rybosomów (Sawicki 2009).

Hepatocyty są głównymi czynnościowymi komórkami wątroby posiadającymi 3 powierzchnie o podstawowym znaczeniu:

- zatokową stanowiącą 70% powierzchni hepatocytu, oddzieloną od sinusoidów przez przestrzeń Dissego,
- kanalikową zajmującą 15% powierzchni hepatocytu i będącą miejscem, przez które żółć przechodzi z hepatocytu do kanalika żółciowego,
- podstawno-boczną stanowiącą 15% powierzchni hepatocytu występującą pomiędzy sąsiednimi hepatocytami w miejscach, w których hepatocyt nie kontaktuje się z naczyniem zatokowym lub kanalikiem żółciowym.

Hepatocyty układają się w powiązane ze sobą blaszki, pomiędzy którymi znajdują się naczynia włosowate typu zatokowego (sinusoidy). Sinusoidy zawierają krew z najdalszych odgałęzień tętnicy wątrobowej i żyły wrotnej. Krew z zatok spływa do żył centralnych. Żółć wytwarzana przez hepatocyty przechodzi do cholangioli, a następnie do niewielkich przewodów żółciowych uchodzących do przewodów okołozrazikowych (Stevens i wsp. 2000).

Hepatocyty pełnią najwięcej funkcji spośród wszystkich komórek organizmu człowieka (Sawicki 2009), tj.:

- biorą udział w metabolizmie glukozy (pobierają glukozę dopływającą z krwią oraz syntetyzują glikogen, przeprowadzają glikogenolizę oraz glikoneogenezę),
- biorą udział w metabolizmie lipidów (wytwarzają cholesterol, trójglicerydy i fosfolipidy oraz wiążą je z apolipoproteinami tworząc lipoproteiny),
- biorą udział w metabolizmie białek i peptydów (m.in. syntetyzują i rozkładają: albuminę, protrombinę, fibrynogen, haptoglobinę, hemopeksynę, transferynę, α -fetoproteinę alfa, białko C-reaktywne, peptyd – hepcydynę),
- biorą udział w wydzielaniu żółci, która powoduje emulsyfikację tłuszczu, ułatwiając jego trawienie,
- biorą udział w detoksykacji i unieczynnianiu leków,
- wydzielają hormony peptydowe (somatomedyna C pobudzająca mitozę i syntezę proteoglikanów w chondrocytach wpływając na wzrost ciała oraz erytropoetyna pobudzająca erytrocytopoezę),
- magazynują i w miarę zapotrzebowania uwalniają do krwi witaminy A, D3, B2, B3, B4, B12, K oraz hydroksylują witaminę D3.

Podstawową jednostką morfologiczną wątroby jest zrazik wątrobowy o kształcie wielobocznej piramidy, której obwód wytyczają przestrzenie wrotno-żółciowe. W środku zrazika znajduje się żyła środkowa zbierająca krew z otaczającego mięszu. Zrąb zrazika tworzą włókna tkanki łącznej, które otaczają pasma hepatocytów zwane beleczkami. Hepatocyty w obrębie beleczek ułożone są jednowarstwowo, przylegając do siebie za pośrednictwem wyspecjalizowanych struktur łączących - „tight junctions” i desmosomów (Orłowski 1992).

Ostatnio sądzi się, że budowę wątroby lepiej przedstawia gronko wątrobowe (Stevens i wsp. 2000), które jest mniejsze od zrazika. W jego skład wchodzi przylegające części dwóch sąsiednich zrazików zasilane przez rozgałęzienia żyły wrotnej i tętnicy wątrobowej. Można w nich wyróżnić trzy strefy, zależnie od ich odległości od żył przestrzeni wrotno-żółciowych. Za słusnością koncepcji gronka przemawia fakt, że strefa odnowy hepatocytów, największa aktywność biologiczna oraz najlepsze ich odżywianie mieszczą się w pobliżu najlepszego ukrwienia i zaopatrzenia w tlen, czyli w pobliżu przestrzeni wrotno-żółciowych (Orłowski 1992).

W przebiegu ciąży pojawiają się zmiany w funkcji wielu narządów, m.in. w układzie krążenia, oddechowym, pokarmowym, moczowym. Do zmian dochodzi także w gruczołach wydzielania wewnętrznego. Zmiany metaboliczne w ciąży są następstwem wysokich stężeń hormonów: 17-beta estradiolu, progesteronu, prolaktyny, laktogenu łożyskowego oraz przyrostu masy tkanki tłuszczowej. Diabetogenne działanie tych hormonów prowadzi do rozwoju insulinooporności ciążowej poprzez nasilenie oporności tkanek docelowych na działanie insuliny oraz bezpośredniej stymulacji komórek beta wysp trzustkowych. Do wzrostu insulinooporności prowadzi także przyrost masy tkanki tłuszczowej (Zamłyński i wsp. 2005).

W prawidłowo przebiegającej ciąży wątroba nie wykazuje zmian morfologicznych, niewielkie są także zmiany czynnościowe. Wzrasta aktywność fosfatazy alkalicznej, spada stężenie albumin i nieznacznie globulin we krwi. Rzadko stwierdza się podwyższone stężenie bilirubiny bezpośredniej i urobilinogenu. Wyniki prób czynnościowych wątroby świadczą o upośledzeniu jej czynności metabolicznej w postaci gorszego wydalania produktów przemiany komórki wątroby i gorszego odpływu żółci (Bręborowicz 2005).

Wymiary i budowa histologiczna wątroby w czasie ciąży nie ulegają zmianie, natomiast ciąża może wywoływać zmiany obserwowane w schorzeniach wątroby. Ciąża może wpływać na produkcję i wydalanie kwasów żółciowych, a z uwagi na wysoki poziom estrogenów może dochodzić do niewielkiego zastoju żółci. W czasie ciąży wzrasta także poziom białek produkowanych przez wątrobę (Rytlewski 2008).

Hormony steroidowe (kortykoidy, estrogeny i androgeny) w większości są wychwytywane przez wątrobę i podlegają utlenieniu, redukcji lub hydroksylacji a następnie sprzężeniu z różnymi grupami anionowymi i wydzieleniu do żółci. Uszkodzenie wątroby i jej niezdolność do unieczynniania steroidów może prowadzić do nadmiernego ich stężenia w organizmie (Ostrowski 1995).

Nieprawidłowe wyniki testów wątrobowych spotyka się u około 3-5% ciężarnych. Większość stwierdzanych dysfunkcji wątroby w ciąży spowodowane jest wystąpieniem jednego z pięciu zespołów chorobowych, charakterystycznych dla ciąży, a mianowicie (Ronin-Walknowska 2010):

- niepowściągliwych wymiotów ciężarnych,
- cholestazy wewnątrzwątrobowej ciężarnych,
- stanu przedrzucawkowego (preeklampsji),
- zespołu HELLP,

- ostrego ciężowego stłuszczenia wątroby.

Każde z tych schorzeń występuje w charakterystycznym dla siebie trymestrze ciąży: wymioty występują w I trymestrze ciąży, cholestaza w drugiej połowie ciąży, natomiast preeklampsja, zespół HELLP, czy ostre stłuszczenie wątroby występują w III trymestrze ciąży (Hay 2008, Lee i wsp. 2009).

1.4. APOPTOZA

Śmierć komórki od dawna była opisywana przez wielu badaczy. Początkowo uważano, że śmierć komórki powstaje na skutek procesów patologicznych, jakie zachodzą w organizmie. Z czasem zwrócono uwagę, że śmierć komórki występuje także jako proces zaprogramowany. W związku z rozwojem wiedzy na temat umierania komórek powstało wiele klasyfikacji ich śmierci.

W latach 70-tych XX-wieku śmierć komórki opisano w dwóch mechanizmach:

- apoptozy, czyli zaplanowanej śmierci,
- nekrozy – przypadkowej śmierci.

W 1990 roku Clarke wyróżnił 4 typy śmierci komórki (Clarke 1990):

- Typ I apoptoza,
- Typ II autofagalna śmierć komórki,
- Typ III Nielizosomalna ziarnista degradacja,
- Typ IV degeneracja typu cytoplazmatycznego.

Obecnie najczęściej opisywanymi typami śmierci komórki są (Lockshin i wsp. 2004):

- apoptoza
- autofagia
- nekroza.

Słowo apoptoza pochodzi z języka greckiego i oznacza opadanie płatków z kielicha kwiatów lub liści z drzew. Synonimy apoptozy to „samobójcza”, aktywna, fizjologiczna lub nieprzypadkowa śmierć komórki, martwica „obkurczeniowa”, a także programowana śmierć komórki.

Po raz pierwszy terminu apoptoza użyli Kerr, Wyllie oraz Currie w 1972 roku określając apoptozę jako podstawowe biologiczne zjawisko znacząco wpływające na kinetykę tkanek (Kerr i wsp. 1972).

Apoptoza jest aktywnym procesem metabolicznym, uwarunkowanym genetycznie, który umożliwia usunięcie z organizmu komórek zniszczonych, zmutowanych, czy zainfekowanych. Równowaga pomiędzy procesem proliferacji komórkowej i apoptozą zapewnia utrzymanie właściwej liczby i odpowiedniego typu komórek w okresie rozwoju organizmu oraz zachowanie prawidłowych ich proporcji w dojrzałych tkankach (Bellamy i wsp. 1995, Reed 2000, Wyllie 1992).

Apoptoza odgrywa ważną rolę przez cały okres życia organizmów. Podczas embriogenezy warunkuje prawidłowy rozwój tkanek i narządów. Nieodpowiednio nasilona apoptoza trofoblastu może spowodować patologię ciąży, jak np. stan przedrzucawkowy (Dash i wsp. 2003). Podczas życia osobniczego bierze udział w stałym podtrzymywaniu czynności organizmu oraz w procesie starzenia. Ma podstawowe znaczenie w procesach odnowy i regeneracji tkanek oraz w zakończeniu życia komórek zróżnicowanych (m.in. apoptoza leukocytów, komórek nabłonka skóry lub jelit, komórek endometrium w okresie poprzedzającym menstruację, eliminacja niedojrzałych limfocytów T i B).

Zaburzenia apoptozy towarzyszą wielu patologiom. Najbardziej znanym przykładem są nowotwory, gdzie obserwuje się nasilenie apoptozy np. w czerniaku, raku okrężnicy lub zahamowanie apoptozy występujące w białaczkach, raku sutka, jajnika, czy gruczołu krokowego (Skotnicka 2003). Zmiany w przebiegu apoptozy obserwuje się także m.in. w chorobach układu krążenia, chorobach neurodegeneracyjnych, autoimmunologicznych, czy zakażeniach wirusowych.

Apoptoza oznacza serię swoistych przemian morfologicznych i biochemicznych determinowanych ekspresją odpowiednich genów (Goldsworthy i wsp. 1996, Honing i wsp. 2000).

Proces apoptozy został podzielony umownie na 3 fazy (Chmielewski i wsp. 2003):

- fazę decydującą,
- fazę wykonawczą,
- fazę degradacji.

Niektórzy autorzy wyróżniają czwartą fazę, w której dochodzi do degradacji ciałek apoptotycznych wewnątrz komórek fagocytyujących (Fal 2003).

W pierwszej fazie podejmowana jest decyzja o śmierci komórki pod wpływem zewnątrz- i wewnątrz-komórkowych czynników. Faza decydująca jest fazą odwracalną rozpoczynającą się od momentu powstania sygnału do apoptozy do uruchomienia kaskady kaspaz. Podczas fazy wykonawczej dochodzi do aktywacji wewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych – kaspaz, bezpośrednio odpowiedzialnych za śmierć komórki. Natomiast w fazie degradacji następuje fagocytoza ciałek apoptotycznych przez makrofagi i otaczające komórki.

Proces apoptozy indukowany jest wieloma różnymi sygnałami pochodzącymi ze środowiska otaczającego komórkę, jak i z jej wnętrza. Sygnały przekazywane są za pośrednictwem hormonów i czynników wzrostu. Sygnałem życia jest także kontakt z innymi komórkami.

W literaturze opisywane są najczęściej dwa podstawowe szlaki wiodące do apoptozy komórki (Bielak-Żmijewska 2003, Lockshin i wsp. 2001):

- droga zewnętrzna, receptorowa zależna od tzw. błonowych receptorów śmierci z nadrodziny czynnika martwicy guza – TNF,
- droga wewnętrzna, w której uczestniczą mitochondria.

Prowadzone w ostatnich latach badania nad procesem apoptozy poszerzyły wiedzę na temat szlaków przekazywania sygnałów do apoptozy. Wśród innych dróg sygnałowych apoptozy, wymienia się również zaobserwowany w cytotoksycznych limfocytach T oraz komórkach NK (natural killer) – szlak pseudoreceptorowy angażujący perforyny i granzym B, czy szlak sfingomielinowo-ceramidowy aktywowany głównie w wyniku narażenia komórek na działanie promieniowania jonizującego (Bratton 2001, Cain 2002, Mróz 2003, Ricci 2006).

W 2000 roku przedstawiony został nowy mechanizm apoptozy, w który zaangażowana jest siateczka endoplazmatyczna (Shiraishi i wsp. 2006).

Faza wykonawcza apoptozy jest procesem nieodwracalnym. Niezależnie od tego w jaki sposób jest inicjowany proces apoptozy, zawsze uczestniczą w nim enzymy z grupy kaspaz. Faza wykonawcza zwana jest także kaskadą kaspaz (Domiński 1999).

Kaspazy są enzymami należącymi do rodziny proteaz cysteinowych. Poprzez proteolizę dokonują aktywacji lub inaktywacji białek, co służy precyzyjnemu przekazywaniu sygnałów dotyczących funkcji komórki i jej losów w organizmie.

Pierwszą, zidentyfikowaną w 1993 roku kaspazą był enzym konwertujący IL-1 β -ICE (interleukin-1 β -converting enzyme), który przekształca prekursor pre-IL- 1 β w aktywną cytokinę (Thornberry i wsp. 1992). Enzym ten nazwano kaspazą-1.

Kaspazy trawią białko w miejscu za resztą asparaginową, wykorzystując w tym procesie jedną z reszt cysteinowych. Stąd też pochodzi ich nazwa: cysteine-dependent-asparaginian specific proteases (Sulejczak 2000, Kiliańska i wsp. 2003). Kaspazy występują w komórkach w formach nieczynnych (pro-kaspazy) i ulegają aktywacji podczas apoptozy. Prokaspaza 12 rozmieszczona jest na powierzchni siateczki endoplazmatycznej, natomiast prokaspazy – 8, -9, -3 przede wszystkim w cytoplazmie (Adams 2003).

Czynne kaspazy aktywują się wzajemnie na zasadzie kaskady enzymatycznej. Informacja o indukcji apoptozy z kaspaz inicjujących zostaje przeniesiona na enzymy wykonawcze: kaspaza 8 aktywuje prokaspazy 3, 6, 7 (Izdebska i wsp. 2005), zaś kaspaza 9 aktywuje prokaspazy 3 i 7 (Muzio i wsp. 1997, 1998).

Dotychczas wykryto 14 kaspaz biorących udział w apoptozie oraz w aktywacji cytokin. Kaspazy podzielono na (Adams i wsp. 2003, Martin 2001):

- inicjatorowe, aktywujące inne kaspazy (2, 8, 9, 10),
- efektorowe, uczestniczące w dalszych etapach apoptozy (3, 6, 7),
- kaspazy związane z cytokinami (1, 4, 5, 11, 12, 13, 14).

Kaspaza 12 zaliczana jest także do kaspaz inicjujących (Izdebska i wsp. 2005).

Aktywacja kaspaz może być uruchamiana przez tzw. zewnętrzny lub wewnętrzny szlak apoptozy. Kaspazy inicjujące rozpoczynają kaskadę kaspaz prowadzącą do aktywacji kaspaz efektorowych.

Faza degradacji apoptozy rozpoczyna się od niszczenia DNA znajdującego się w jądrze komórki. W fazie degradacji następuje fagocytoza ciałek apoptotycznych przez makrofagi i otaczające komórki.

Kaspazy prozapalne 1, 4, 5, 11 odgrywają kluczową rolę w odpowiedzi zapalnej lub śmierci apoptotycznej w warunkach patologicznych, np. w czasie ostrego niedokrwienia tkanek, działając jednocześnie jako inicjatorzy i egzekutorzy apoptozy (Korzeniowska-Dyl 2008). Inni autorzy kwestionują ich rolę w przebiegu apoptozy (Faubel i wsp. 2004).

Na podkreślenie zasługują także doniesienia, że lizosomy mogą także uczestniczyć w apoptozie, zainicjowanej aktywacją receptorów śmierci, czy działaniem

leków. W ich błonie mogą powstawać kanały, przez które w komórkach apoptotycznych wypływają enzymy lizosomalne. Obniżenie pH w komórkach jest czynnikiem aktywującym szlak wewnętrzny (Gyrd-Hansen i wsp. 2006).

1.4.1. KASPAZA 3

Jedną z ważniejszych składowych w kaskadzie apoptotycznej komórki człowieka jest kaspaza 3, na której kończą się szlaki prowadzące do fazy degradacji w apoptozie (Adams i wsp. 2003). Kaspaza 3 wykazuje następujące działanie (Chmielewski i wsp. 2008):

- uaktywnia bezpośrednio endonukleazę DFF (DNA Fragmentation Factor), CAD (Caspase-activated DNase) doprowadzając do trawienia DNA pomiędzy nukleosomami na odcinki 180 par zasad,
- rozkłada PARP (Poly ADP-Ribose Polymarse) inaktywując możliwość naprawy uszkodzonego genomu,
- uaktywnia RNazy – enzymy trawiące RNA, m.in. endonukleazę G, magazynowaną w mitochondriach, która jest jednocześnie RNazą i DNazą trawiącą RNA lub jedną nić DNA (Kawahara i wsp. 1998, Sulejczak 2000).
- jest końcowym etapem przemian kaspaz i w związku z tym stanowi prosty i właściwy punkt wykrywania apoptozy i oceny jej nasilenia.

Bardziej ograniczoną rolę w fazie wykonawczej pełni kaspaza 6 (degradacja laminy A) oraz kaspaza 7 (proteoliza PARP, fragmentacja DNA) (Smolewski 2003).

1.4.2. KASPAZA 9

Kaspaza 9 pełni istotną rolę w apoptozie przebiegającej szlakiem wewnętrznym, mitochondrialnym. Droga wewnętrzna pobudzana jest przez stres komórkowy występujący m.in. podczas ekspozycji komórki na promieniowanie UV i gamma, środki chemiczne, infekcje wirusowe bądź w wyniku szoku tlenowego (Herr i wsp. 2001, Igney i wsp. 2002). Może być także konsekwencją uszkodzenia czynnika wzrostu.

Cytochrom c jest istotnym składnikiem mitochondrialnego łańcucha elektronowego. Wraz z czynnikiem aktywacji proteaz apoptotycznych Apaf-1 (apoptosis protease activating factor-1) łączą się z cząsteczkami prokaspazy-9 w heptameryczny kompleks, zwany apoptosomem. Rola apoptosomu sprowadza się do

aktywacji kaspazy-9 oraz przekształcenia pod jej wpływem prokaspazy-3 w czynny enzym wykonawczy (Acehan i wsp. 2002).

Ważną rolę w fazie decyzji odgrywają białka z rodziny Bcl-2, białko p-53 oraz białka z rodziny inhibitorów apoptozy – IAP (inhibitor of apoptosis protein family) (Dighiero i wsp. 1998).

Białka z rodziny Bcl-2 umiejscowione są na błonie wewnętrznej mitochondrium. Działają zarówno proapoptotycznie (m.in. białko: Bax, Bcl-xS, Bak, Bik, Bim) jak i antyapoptotycznie (m.in. białko: Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, Bcl-2). Przepuszczalność błony zewnętrznej i (lub) wewnętrznej mitochondrium uzależniona jest od tych białek. Proapoptotyczne proteiny inicjują zwiększenie przepuszczalności błon przez formowanie w nich kanałów (Chmielewski i wsp. 2003). Białka z rodziny Bcl-2 wpływają na transport regulatorów apoptozy z przestrzeni międzybłonowej mitochondrium, m.in. cytochromu c, AIF (apoptosis inducing factor) (Wolter i wsp. 1997) poprzez ich oddziaływanie z megakanałami oraz wpływ na mitochondrialny potencjał transbłonowy (Castedo i wsp. 1996). Ponadto białka te kontrolują komórkowy poziom jonów oraz aktywują kaspazy i DNA-zy. Duże znaczenie w regulacji procesu apoptozy odgrywa wzajemny stosunek białek o działaniu antyapoptotycznym – Bcl-2 i proapoptotycznym – Bax, któremu przypisuje się także znaczenie prognostyczne (Jamroziak i wsp. 2000).

Białko p-53 jest niezwykle ważnym regulatorem procesu apoptozy, odpowiadającym m.in. za blokowanie cyklu komórkowego w przypadku uszkodzeń DNA. Przy braku możliwości naprawy uszkodzonego fragmentu genetycznego białko to bezpośrednio lub z udziałem białka Bax, aktywuje mitochondrialną drogę apoptozy (Vousden 2002, Vousden i wsp. 2005). Ponadto białko to (Chmielewski i wsp. 2003):

- stymuluje zwiększoną ekspresję molekuly Fas na błonie komórkowej,
- zwiększa ilość protein Bax na błonie mitochondrialnej,
- blokuje gen bcl-2 i tym samym zmniejsza ekspresję białka Bcl-2,
- aktywuje gen p21 hamujący cykl komórkowy w fazie G1.

Z uwagi na swoje działanie białko p53 jest zwane „strażnikiem genomu”.

Większość białek IAP ma zdolność bezpośredniego wiązania i hamowania aktywności kaspaz wykonawczych 3 i 7 oraz zapobiega aktywacji inicjatorowej kaspazy 9 (Bielak-Żmijewska 2003). Białka te zakłócają przekazywanie sygnału apoptotycznego przez tworzenie kompleksów nie tylko z kaspazami ale także z białkami adaptorowymi, czynnikami transkrypcyjnymi, czy wreszcie z białkami

będącymi blokerami ich aktywności. Białka IAP mają zdolność hamowania apoptozy zarówno receptorowo, jak i mitochondrialnie uczestnicząc w regulacji cyklu komórkowego i wewnątrzkomórkowym przekazie sygnału (Holcik i wsp. 2001, Roy i wsp. 1997, Wrzesień-Kuś i wsp. 2004).

1.4.3. KASPAZA 12

Rola kaspazy 12 nie jest do końca wyjaśniona. Postuluje się jej udział w niezależnym od mitochondrium szlaku wewnętrznym apoptozy wywołanym uszkodzeniem siateczki endoplazmatycznej i aktywacją białek Bax i Bak (Zong i wsp. 2003). Boddźcem do aktywacji tej kaspazy może być obniżone stężenie białek w osoczu oraz inhibitor syntezy białek – anizomycyna (Adams 2003). Kaspaza 12 niezależnie od Apaf – 1 i apoptosomu może aktywować kaspazę 9 (Rao i wsp. 2002). Kaspaza 12 zaliczana jest do kaspaz inicjujących (Izdebska i wsp. 2005).

Kaspaza 12 wydaje się pośredniczyć w apoptozie neurocytów pod wpływem β -amyloidu (Nakagawa i wsp. 2000). Zwrócono również uwagę na możliwy udział kaspazy 12 w odpowiedzi zapalnej. Obecność tego polimorficznego enzymu w formie o pełnej długości (dotyczy ok.20% populacji pochodzenia afrykańskiego) jest związana z większą podatnością na rozwój posocznicy, co może być skutkiem słabszej odpowiedzi zapalnej na endotoksyny (Saleh i wsp. 2004).

Przeprowadzone w 2000 roku badania nad mechanizmem apoptozy, w który zaangażowana jest siateczka endoplazmatyczna i kaspaza 12 potwierdziły, że powodem aktywacji programowanej śmierci komórki z udziałem tej organelli jest zaburzenie homeostazy jonów wapnia oraz nagromadzenie w niej nieprawidłowo zmodyfikowanych lub niewłaściwie sfaldowanych białek, które z powodu tych właśnie błędów nie są eksportowane z retikulum. Początkowo badania przeprowadzone na myszach z wyłączeniem kaspazy 12 ujawniły, że aktywacja tej proteazy cysteinowej nie jest zależna od innych rodzajów śmierci komórkowej, a uaktywniona kaspaza 12 prawdopodobnie bezpośrednio wpływa na kaspazy wykonawcze. W 2006 roku Shiraishi i wsp. wykazali jednak, że białko Apaf-1 oraz ścieżka mitochondrialna odgrywają ważną rolę w indukcji apoptozy z udziałem retikulum endoplazmatycznego (Shiraishi i wsp. 2006). Kaspaza 12 aktywuje kaspazę 3.

1.4.4. KASPAZA 8

Droga zewnętrzna indukowana jest sygnałem z zewnątrz. Istotną rolę odgrywają w niej receptory śmierci. Efektem wiązania receptora z ligandem jest najczęściej aktywacja kaspazy 8.

Receptory śmierci to cytokiny z rodziny TNF (tumor necrosis factor) m.in. TNFR-1, Fas (CD95/Apo-1), TRAIL-R, które po rozpoznaniu odpowiedniego liganda i zmianach strukturalnych receptora przekazują sygnał poprzez domenę śmierci DD (death domain) na białko adaptorowe, np. TRADD (TNF-R1 associated death domain), FADD (Fas-associated death domain), RIP (receptor interacting protein). W efekcie dochodzi do rozpoznania białka efektorowego – prokaspazy-8 (lub -10) i aktywacji tych kaspaz (Kiliańska i wsp. 2002, Schmitt i wsp. 2007, Takayama i wsp. 2003) oraz utworzenia aktywnego kompleksu zwanego DISC (death-inducing signaling complex).

Gdy sygnał z receptorów błonowych jest słaby i nie wystarczy do uruchomienia kaskady kaspaz, zachodzi amplifikacja sygnału śmierci za pośrednictwem białka Bid (Gonzalez i wsp. 2005, Scaffidi i wsp. 1998). Białko Bid będące przedstawicielem białek rodziny Bcl-2 ulega proteolizie dokonywanej przez kaspazę 8 / 10. To proteolityczne cięcie uwalnia fragment tBid (Gabai i wsp. 2002), który przyłącza się do zaktywowanych cząsteczek białka Bax, czy Bak na powierzchni mitochondriów i odpowiada za powstanie porów w błonach tych organelli, przez które wypływa cytochrom c, a następnie formuje się apoptosom (Kiliańska 2003, Stankiewicz i wsp. 2005, Zhao i wsp. 2004).

1.4.5. ZMIANY W MORFOLOGII KOMÓREK ULEGAJĄCYCH APOPTOZIE

Zmiany w morfologii komórek apoptotycznych przebiegają w kilku etapach polegających na (Sulejczak i wsp. 2000, Young i wsp. 2006):

- zmniejszaniu objętości komórki (kurczeniu się) z powodu utraty wody (Jabłoński i wsp. 2006),
- pofałdowaniu powierzchni komórki w związku ze zmianą struktury błony komórkowej,
- utracie kontaktu z komórkami sąsiadującymi ,
- kondensacji chromatyny (pyknoza) w jądrze i umiejscowieniu jej tuż pod błoną jądrową,

- poszerzeniu i rozpadzie zbiorników ziarnistej siateczki endoplazmatycznej i aparatu Goldiego,
- obkurczaniu całego jądra komórkowego i podziale materiału jądrowego na mniejsze fragmenty (karioreksis), któremu towarzyszy rozpad błony jądrowej i jego fragmentacja,
- zachowaniu integralności struktur wewnątrzkomórkowych,
- pęczkowaniu cytoplazmy i odrywaniu się od niej pojedynczych bąbli (pęcherzyków apoptotycznych - ciałek apoptotycznych),
- fragmentacji komórki na ciała apoptotyczne,
- rozpoznaniu komórek apoptotycznych przez komórki układu odpornościowego oraz sąsiadujące z nimi inne komórki (Fadok i wsp. 2000),
- fagocytozie szczątków komórki przez makrofagi lub komórki sąsiadujące bez odczynu zapalnego.

Apoptotyczna śmierć komórki trwa krótko, od kilku minut do kilkunastu godzin (Bursch i wsp. 1990).

Programowana śmierć komórki jest jej samounicestwieniem. Dotyczy całego organizmu ludzkiego. Dotyczy również wątroby, a w szczególności wątroby dotkniętej różnymi schorzeniami. Apoptoza jest więc procesem fizjologicznym, włączonym niekiedy w procesy patologiczne wątroby jako odpowiedź i obrona organizmu przed zagrożeniem rozłaniem integralności ustroju. Wątroba broni się przed całkowitą destrukcją a odpowiedzią tej obrony może być zjawisko apoptozy (Chmielewski i wsp. 2003).

Wiele badań potwierdza duże znaczenie apoptozy w chorobach wątroby. Należą do nich (Chmielewski i wsp.2003):

1. Cholestatyczne choroby wątroby, w których stwierdzono bezpośrednio pobudzenie apoptozy przez kwas glikodeoksycholowy w kulturze hepatocytów hodowlanych (inicjacja niezależna od Fas/FasL), pobudzenie kaspazy 8, aktywację katepsyny B i kinazy C, które odpowiedzialne są za pobudzenie endonukleazy tnącej DNA.
2. Wirusowe zapalenia wątroby, w których wykazano znaczenie wielu czynników wpływających na proces apoptozy, m.in. wzmożoną sekrecję cytokin TNF- α , aktywację kaspaz 3 i 7, wyrzut perforyn, aktywację Fas/FasL.

3. Autoimmunologiczne zapalenia wątroby, w których stwierdzono długie przeżycie limfocytów T, zbyt małą produkcję białka błonowego Fas oraz nadprodukcję białka Bcl-2.
4. Choroba alkoholowa wątroby. Wykazano, że stres tlenowy związany z wytworzeniem wolnych rodników tlenowych doprowadza do nagromadzenia w błonie komórkowej hepatocytów FasL, TNF- α .
5. Rak pierwotny wątroby. W chorobie tej dochodzi do uniemożliwienia prawidłowego zjawiska apoptozy poprzez redukcję receptorów błonowych Fas w celu zmylenia organizmu przed destrukcją komórek obcych na drodze apoptozy.

1.4.6. METODY IDENTYFIKACJI APOPTOZY

Opracowano wiele metod badawczych pozwalających wykryć zarówno pojedyncze komórki apoptotyczne, jak również populacje tych komórek (Sulejczak 2000).

Najczęściej stosowane metody identyfikacji apoptozy:

1. Barwienie histologiczne stosowane do uwidocznienia powstałych zmian w morfologii komórek. Charakterystyczne zmiany uwidocznione w jądrach komórkowych oraz kondensacja chromatyny wykazują morfologię odmienną dla apoptozy i dla martwicy (Solomon i wsp. 1997). Barwniki ze względu na ich właściwości fizyko-chemiczne podzielono na następujące kategorie:
 - barwniki kationowe (zasadowe) - hematoksylina, oranż akrydyny, fuksyna zasadowa, używane do barwienia jądra komórkowego i zasadochłonnych substancji cytoplazmatycznych,
 - barwniki anionowe (kwaśne) - błękit metylenowy, zieleń świetlna, kwaśna fuksyna, kwas pikrynowy barwiące przede wszystkim cytoplazmę komórki,
 - barwniki obojętne: fiolet metylowy, rodamina B.Ze względu na prostotę i znaczną szybkość techniki barwienia stosowane są także barwniki fluorescencyjne, m.in. jodek propidyny, bromek etydy, fluoresceina.
2. Ocena zmian zachodzących w błonie komórki apoptotycznej, wykorzystująca fakt całkowitej przepuszczalności dla barwników kationowych (zasadowych) takich jak: błękit trypanu, jodek propidyny, bromek etydy.

Inną zmianą zachodzącą w błonie komórkowej we wczesnym stadium apoptozy jest przemieszczanie się cząsteczek fosfolipidu fosfatydyloseryny z warstwy wewnętrznej do zewnętrznej, gdzie może być sprzężona ze znacznikiem, aneksyną V, umożliwiającym identyfikację takiej komórki. Wykrywanie kompleksu fosfatydyloseryna / aneksyna przeprowadza się przy użyciu mikroskopu świetlnego, fluorescencyjnego lub cytometru przepływowego (Kirszberg i wsp. 2005).

3. Badanie aktywności kaspazy 3 polegające na określeniu ilości produktów reakcji enzymatycznej, która jest katalizowana przez kaspazę 3. Inna metoda oparta jest na wykryciu obecności aktywnej kaspazy 3 i pomiarze jej aktywności kilkustopniową techniką Western blot polegającą na ilościowym oznaczeniu reakcji z przeciwciałami skierowanymi przeciw kaspazie 3 (Peng i wsp. 2006).
4. Badanie ilości uwolnionego cytochromu c z mitochondriów przy użyciu przeciwciała monoklonalnego przeciwko cytochromowi c.
5. Wykrywanie specyficznej dla apoptozy fragmentacji materiału genetycznego, m.in.:
 - metoda przy użyciu elektroforezy DNA na żelu agarozowym polegająca na oddzieleniu przez wirowanie frakcji DNA o wysokiej masie cząsteczkowej występującej w jądrach komórek prawidłowych od frakcji o niskiej masie cząsteczkowej charakterystycznej dla komórek apoptotycznych (Yuste i wsp. 2005),
 - metoda TUNEL (terminal deoxynukleotydyl transferase mediated deoxyUridine triphosphate-biotin/digoxigenin nick end-labeling) polegająca na znakowaniu rozszczepionych fragmentów DNA przez enzym nukleotydylotransferazę, która ma zdolność dobudowywania w miejscach pęknięć nici DNA nukleotydów znakowanych digoksygeniną (Chmielewski i wsp. 2008).
6. Cytometria przepływowa, zwana także cytofotometrią przepływową polega na pomiarze specyficznych cech fizyko – chemicznych komórek, które znakowane fluorochromami mijają punkt pomiarowy. Metoda ta polega na pomiarze ilości wzbudzonego światła fluorescencyjnego. Komórki apoptotyczne są rozpoznawane dzięki ich charakterystycznym cechom lub jako komórki z niską zawartością DNA. Dzięki tej metodzie można ocenić zawartość znakowanych

komórek, ich budowę, kształt, rozmiar oraz zawartość DNA (Jimnez i wsp. 2005).

7. Metoda immunohistochemiczna. Metoda ta ma podstawowe znaczenie zarówno w pracach badawczych, jak i w diagnostyce. W technikach immunohistochemicznych wykorzystuje się niezwykłą swoistość wiązania przeciwciała z antygenem. Obecnie wytwarzane są specyficzne przeciwciała monoklonalne, co daje wysoką czułość metody. Wiązanie antygenu znakowanego enzymatycznie peroksydazą chrzanową z przeciwciałem daje reakcję barwną, którą można oglądać w mikroskopie świetlnym. Najczęściej stosuje się metodę trójstopniową (three step) do skrawków parafinowych, polegającą na:

- oczyszczeniu skrawka z endogennych peroksydaz przy pomocy nadtlenu wodoru oraz reakcji antygen-przeciwciało pierwotne,
- reakcji przeciwciała pierwotnego z biotynylowanym przeciwciałem wtórnym,
- reakcji biotyny z awidyną lub streptawidyną połączoną z peroksydazą chrzanową.

Dodanie barwnika (AEC lub DAB), który jest utleniany przez peroksydazę chrzanową, w miejscu reakcji antygen-przeciwciało daje czerwone (AEC) lub bruntane (DAB) zabarwienie w tym miejscu, gdzie jest poszukiwany antygen (Avrameas i wsp. 1967, Pinkus 1982, Kohler i wsp. 2005). Istnieje kilka sposobów oceny występowania i nasilenia reakcji barwnej. Dosty często używa się metod subiektywnych polegających na obserwacji wzrokowej preparatu w mikroskopie świetlnym i ocenie jakościowej komórek z dodatnią reakcją immunologiczną. Bardziej obiektywne metody wykorzystują komputerową analizę ilościową obrazów z mikroskopu świetlnego. Należą do nich m.in.: metoda oparta na próbkowaniu barw bezpośrednio z oryginalnych obrazów kolorowych, metoda polegająca na ekstrakcji dodatniej reakcji metodą progowania, metoda oparta na tworzeniu obrazów przestrzennych przez wprowadzenie jasności jako dodatkowej współrzędnej cyfrowych obrazów mikroskopowych (Kaczmarek 2004).

Przeprowadzone badanie dotyczy oceny histologicznej i immunohistochemicznej toru indukcji sygnału do apoptozy w hepatocytach wątroby w fizjologicznej ciąży oraz ciąży poddanej działaniu L-argininy, uwzględniając czynnik

czasowy. Badaniu poddano ocenę toru wewnętrznego- mitochondrialnego i siateczkowego oraz toru zewnętrznego- receptorowego. Oceniono także indeks apoptozy.

2. CEL PRACY

Celem pracy jest histologiczna i immunohistochemiczna ocena toru indukcji sygnału do apoptozy w hepatocytach w fizjologicznej ciąży oraz ciąży poddanej działaniu L-argininy uwzględniająca czynnik czasu.

W/w komórki przebadano pod kątem:

1. Obecności nasilonej apoptozy oceniając indeks apoptozy, ekspresję kaspazy 3.
2. Oceny toru wewnętrznego-mitochondrialnego indukcji sygnału do apoptozy – kaspaza 9.
3. Oceny toru wewnętrznego-siateczkowego indukcji sygnału do apoptozy – kaspaza 12.
4. Oceny toru zewnętrznego-receptorowego indukcji sygnału do apoptozy – kaspaza 8.

3. MATERIAŁ

Do doświadczenia użyto dobrane losowo szczury, samice szczepu Wistar o początkowej masie ciała 200-250g, w wieku od 2, 5 do 3 miesięcy.

Samice dobrano zgodnie z zasadą jednoczasowości grup kontrolnych i badanych.

Szczury pochodziły z hodowli wsobnej Zakładu Histologii i Embriologii Akademii Medycznej w Lublinie oraz z Hodowli Zwierząt Laboratoryjnych Warszawa.

Zwierzęta odżywiano standardową paszą – LSM (wytwórnia pasz w Motyczu), poiono *ad libitum* wodą.

Przebywały one w Wiwarium, ul Głęboka 30, Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie w temperaturze otoczenia 20+/-2 stopnie Celsjusza i wilgotności ok. 60%. Zarówno temperatura otoczenia, oświetlenie i hałas nieznacznie zmieniały się w czasie dnia. Podściółkę w klatkach tworzyły trociny, które były odpowiednio często zmieniane. Zwierzęta otrzymywały wodę i paszę granulowaną LSM *ad libitum*.

Na badania na zwierzętach laboratoryjnych uzyskano pozytywną opinię II Lokalnej Komisji Etycznej w Lublinie przy Uniwersytecie Przyrodniczym nr 5/2010.

Zwierzęta podzielono na 7 równolicznych grup – po 10 samic w każdej:

- samicom z grup doświadczalnych podano per os 40 mg/kg. m.c. L-argininy, co 2-gi dzień począwszy od 7 dnia ciąży (7x),
- samicom z grup kontrolnych podano per os 2 ml wody destylowanej, co 2-gi dzień począwszy od 7 dnia ciąży (7x).

Samice dekapitowano kolejno:

- I grupa doświadczalna – samice, które zapłodniono, podano L-argininę i dekapitowano 10 dnia trwania ciąży
- II grupa kontrolna - samice, które zapłodniono, podano wodę destylowaną i dekapitowano 10 dnia trwania ciąży
- III grupa doświadczalna – samice, które zapłodniono, podano L-argininę i dekapitowano 20 dnia trwania ciąży
- IV grupa kontrolna - samice, które zapłodniono, podano wodę destylowaną i dekapitowano 20 dnia trwania ciąży

- V grupa doświadczalna – samice, które zapłodniono, podano L-argininę i dekapitowano 10 dnia po okoceniu
- VI grupa kontrolna - samice, które zapłodniono, podano wodę destylowaną i dekapitowano 10 dnia po okoceniu
- VII grupa kontrolna – samice, które dekapitowano 30 dnia od początku doświadczenia.

	Grupa	Zapłodnienie	Podano	Dekapitacja
Grupa doświadczalna	I	+	L-arginina	10 dzień ciąży
	III	+	L-arginina	20 dzień ciąży
	V	+	L-arginina	10 dni po okoceniu
Grupa kontrolna	II	+	Woda destylowana	10 dzień ciąży
	IV	+	Woda destylowana	20 dzień ciąży
	VI	+	Woda destylowana	10 dni po okoceniu
Grupa kontrolna	VII	-	-	30 dnia od początku doświadczenia

Tabela nr 1. Zestawienie grup.

4. METODY

4.1. ZAPŁODNIENIE / CIAŻA

Na początku doświadczenia samice parowano z samcami. Każdego dnia pobierano wymaz z pochwy i oglądano rozmaz na szkiełku podstawowym pod mikroskopem świetlnym. Obecność czopu pochwowego lub plemników w wymazie pochwowym traktowano jako skuteczną kopulację – zaplemnienie.

Do dalszego doświadczenia wybierano tylko te samice, które zostały zapłodnione od drugiego do czwartego dnia od chwili sparowania z samcami.

4.2. BADANIA MORFOLOGICZNE - MAKROSKOPOWE

Od wszystkich zwierząt po dekapitacji oglądano makroskopowo i opisano wątrobę.

4.3. BADANIA HISTOLOGICZNE W MIKROSKOPIE ŚWIETLNYM

Pobrane do badań histopatologicznych wycinki prawego płata wątroby 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.

Błoczki parafinowe krojono przy użyciu mikrotomu na skrawki o grubości 5 μm , które następnie umieszczano na szkiełku podstawowym i po odparafinowaniu barwiono Hematoksyliną i Eozyną.

Zabarwione preparaty oglądano pod mikroskopem świetlnym. Opisywano hepatocyty. 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.

4.4. INDEKS APOPTOZY

Do określenia ilościowego stopnia nasilenia apoptozy w preparatach pochodzących z wątroby 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 pyknotyczne, 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 pyknotycznych jąder w 100 obserwowanych komórkach w preparatach wątroby 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 hepatocyty. Wyniki badań poddano analizie statystycznej.

4.5. BADANIA IMMUNOHISTOCHEMICZNE

Wycinki wątroby szczurów pobrane do badań immunohistochemicznych utrwalone były w 10% formalinie, odwodnione we wzrastających stężeniach alkoholi, prześwietlone w ksylenie i zatopione w bloczkach parafinowych. Bloczki pocięto na 5 μ m preparaty, które umieszczono na szkiełkach silenizowanych.

Do badań użyto po dwa preparaty z badanego narządu od każdego osobnika. Preparaty odparafinowywano w ksylenie i malejących stężeniach alkoholu etylowego. Preparaty poddane były obróbce cieplnej w środowisku kwaśnym dla przeciwciał przeciwko białkom: kaspaza 3, kaspaza 8, kaspaza 9, kaspaza 12 (10mM bufor cytrynianowy pH 6, 0) – 7, 5 min. w kuchence mikrofalowej przy mocy 750W i po 5 min. przerwy 7, 5 min. przy mocy 375W.

Po wystudzeniu przez 20 min. preparaty splukano wodą destylowaną a następnie umieszczono w buforze TBS (Tris Buffered Saline).

Następnie w preparatach blokowano endogenną peroksydazę inkubując je przez 20 min. w 0, 3% roztworze H₂O₂ (99ml buforu TBS, 0,1 g NaN₃, 1 ml 30% H₂O₂). Preparaty płukano przez około 10 min. w buforze TBS. Następnie inkubowano je przez 60 min. w temperaturze pokojowej z króliczym przeciwciałem pierwotnym:

1. Dla kaspazy 3 (Lab Vision Ab-4; RB-1197-P0) w rozcieńczeniu 1/100 w buforze TBS/BSA 1%.

2. Dla kaspazy 8 (Lab Vision Ab-4; RB-1200-P0) w rozcieńczeniu 1/100 w buforze TBS/BSA 1%.
3. Dla kaspazy 9 (Lab Vision Ab-4; RB-1205-P0) w rozcieńczeniu 1/100 w buforze TBS/BSA 1%.
4. Dla kaspazy 12 (Alexis/ProScience PSC-2327) w rozcieńczeniu 1/100 w buforze TBS/BSA 1%.

W następnej kolejności do uzyskania reakcji immunohistochemicznej używano zestawu gotowych do użycia odczynników firmy DakoCytomation w skład, którego wchodziły:

1. Biotynylowane przeciwciało wtórne przeciwko przeciwciałom króliczym (Biotinylated Link Universal) (15 minut inkubacji).
2. Streptawidyna sprzęgnięta z peroksydazą chrzanową (Streptavidin-HRP) (15 minut inkubacji).
3. AEC – substrat- barwnik reakcji z peroksydazą chrzanową (AEC Substrate chromogen) (15 minut inkubacji).

Po użyciu każdego z odczynników preparaty płukano w buforze TBS przez minimum 10 min. Po zabarwieniu chromatogenem preparaty wkładano na ok. 1 min. do roztworu hematoksyliny, a następnie obficie płukano wodą destylowaną. Preparaty nakrywano szkiełkami nakrywkowymi przy pomocy płynu Aquatex. Dokumentacji fotograficznej dokonano przy użyciu Colour Video Camera CCD-IRIS (Sony) połączonej z komputerem.

Do każdego badanego preparatu robiono kontrolę negatywną. Był to preparat, do którego nie dodano przeciwciała pierwotnego.

4.6. OCENA BADAŃ IMMUNOHISTOCHEMICZNYCH

Wyniki badań immunohistochemicznych oceniano jakościowo i ilościowo. W jakościowej ocenie brano pod uwagę intensywność barwnego odczynu w miejscu reakcji antygen-przeciwciało w badanych narządach szczura, w poszczególnych grupach. Ilościowa ocena wyników badań nastąpiła przy użyciu programu komputerowego Analysis-pro, wersja 3 (Soft Imaging System GmbH, Niemcy). Analizę obrazu mikroskopowego w powiększeniu 125x oceniającą ekspresję białka

przeprowadzono oceniając z każdego preparatu 3 losowo wybrane miejsca, każde o powierzchni 781193, 35 μm^2 . Liczono pole powierzchni komórek wykazujących odczyn dodatni (+).

Najpierw ustalono pole powierzchni, które będzie uwzględniane przy zakładaniu maski, a następnie wybrano zakres kolorów odpowiadający barwie reakcji antygen-przeciwciała, na który zostanie nałożona maska. W następnej kolejności nałożono maskę, a komputer wykrywał obszary, które stały się białe na skutek nałożenia maski. Następnie przy użyciu programu komputerowego zliczono pola powierzchni obszarów przykrytych przez maskę.

Wyniki opracowano statystycznie.

4.7. OCENA STATYSTYCZNA

Uzyskane wyniki badań zestawiono w postaci średnich oraz odchylenia standardowego średniej i opracowano statystycznie posługując się testem ONE WAY ANOVA. Przyjęto 5% ryzyka błędu wnioskowania i istotność statystyczną różnic przy p mniejszym lub równym 0.05.

Analizie statystycznej poddano różnice w indeksie apoptozy oraz różnice w średnim polu powierzchni zajmowanym przez dodatni odczyn immunohistochemiczny w poszczególnych grupach dla wszystkich badanych przeciwciał.

5. WYNIKI BADAŃ

5.1. OBSERWACJE ZACHOWANIA ZWIERZĄT

Samice szczura szczepu Wistar dobrane i zaszeregowane losowo do grup kontrolnych i doświadczalnych przez cały czas trwania doświadczenia wykazywały się podobnym zachowaniem. Zachowywały podobną aktywność zmieniającą się podczas doby. Zjadały podobnie dużo paszy, którą były karmione i piły podobną ilość podawanej im wody *ad libitum*.

5.2. OCENA ZAPŁODNIENIA / CIĄŻY

Za skuteczną kopulację-zaplemnienie uznawano obecność czopu pochwowego w pochwie samic szczura lub/i plemników w wymazie z pochwy. Obserwacje takie poczyniono w przypadku 59 samic szczura. Kolejnym kryterium kwalifikacji do dalszego doświadczenia był czas, w którym doszło do zaplemnienia. Między drugim a czwartym dniem, licząc od chwili sparowania samic z samcami, nie doszło do zaplemnienia w sumie dwu samic – u jednej zaobserwowano czop pochwoy pierwszego dnia, druga nie została zapłodniona w zaplanowanym w doświadczeniu czasie. Do dalszej części badań zakwalifikowano 58 samic zapłodnionych i 10 samic nie będących w ciąży.

5.3. OCENA MAKROSKOPOWA WĄTROBY POBRANEJ DO BADAŃ

Makroskopowa obserwacja wątroby dekapitowanych szczurów tuż po wyjęciu jej z jamy brzusznej wykazała brak istotnych różnic w budowie narządu pochodzącego zarówno od samic szczura z grup kontrolnych jak i doświadczalnych.

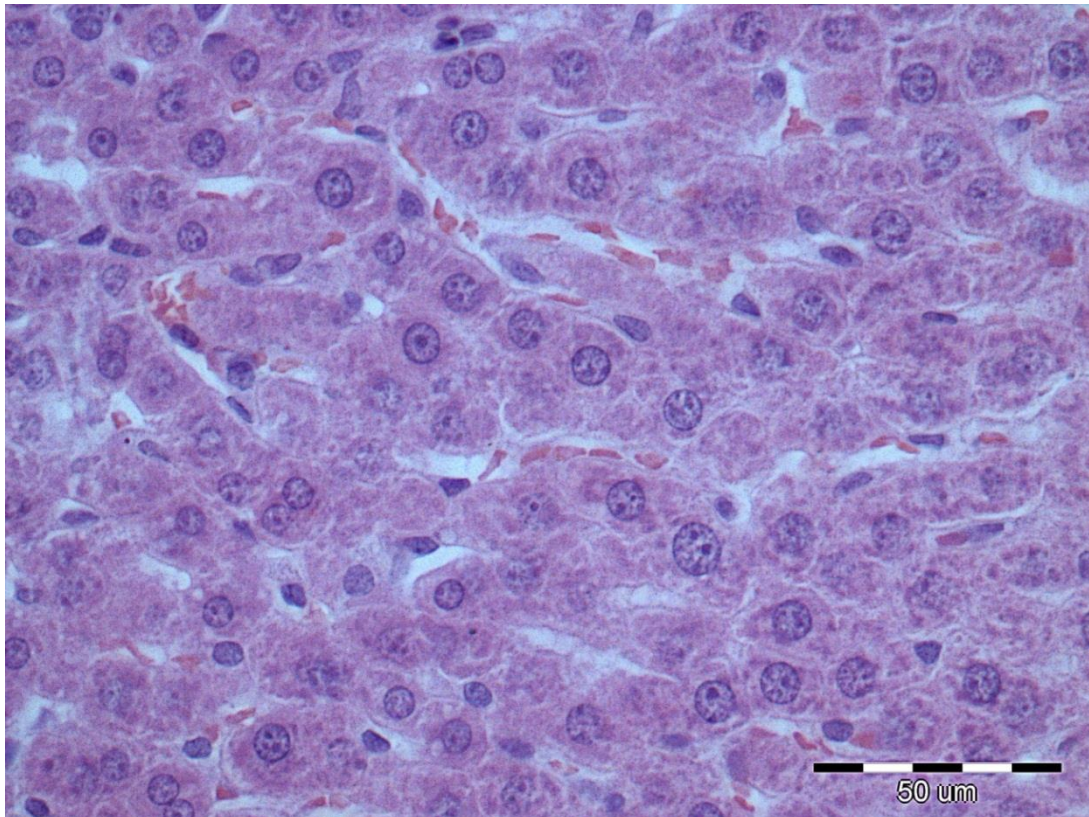
Powierzchnia narządu była ciemnoróżowa, gładka. Nie obserwowano oznak obrzęku. Brzegi wątroby były wyraźnie zastrzone. Widoczna linia przyczepu więzadła sierpowatego dzieliła narząd na płat większy prawy i mniejszy lewy. W dole pęcherzyka żółciowego widoczny był pęcherzyk żółciowy o zachowanej ciągłości ściany. We wrotach wątroby widoczne były naczynia, nerwy i przewody żółciowe.

5.4. WYNIKI BADAŃ HISTOLOGICZNYCH – OCENA WĄTROBY W MIKROSKOPIE ŚWIETLNYM

GRUPY KONTROLNE VI i VII oraz GRUPY DOŚWIADCZALNE III i V

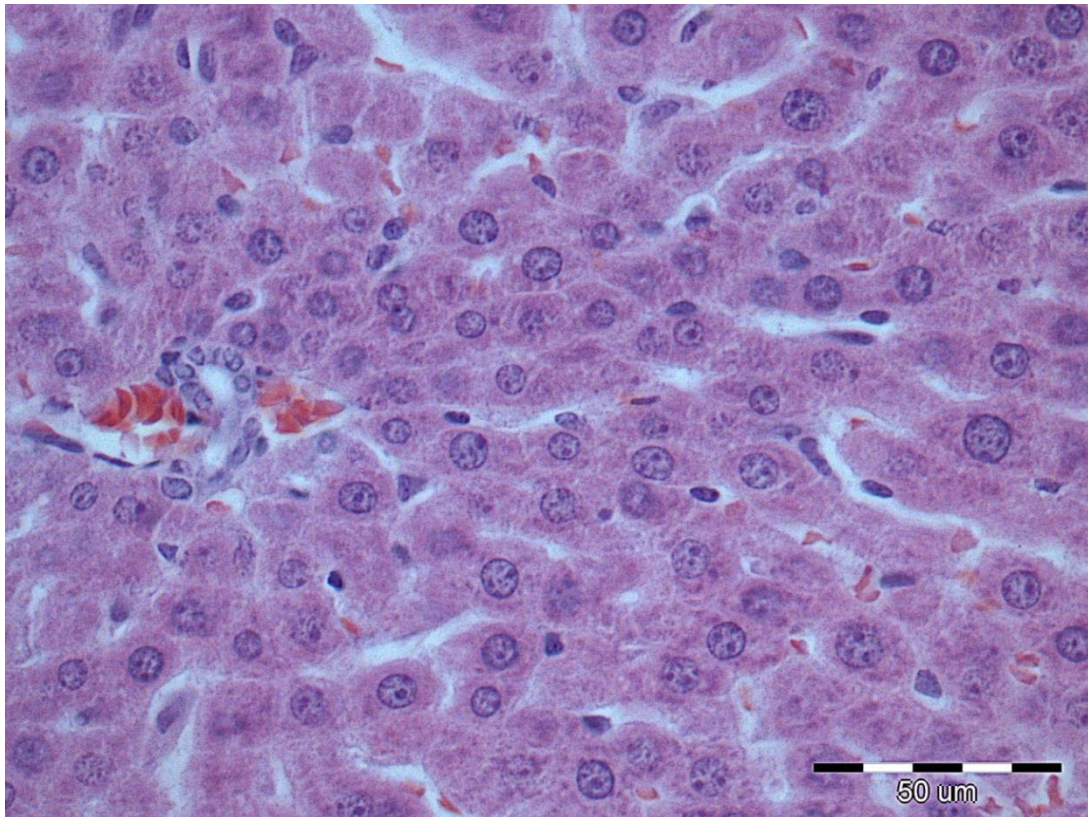
We wszystkich wymienionych grupach zarówno samic ciężarnych jak i nieciężarnych obraz mikroskopowy wątroby był podobny [Fot. nr 1, 2, 3, 4]. Był to obraz prawidłowego narządu, bez patologicznych zmian. Przestrzenie między elementami zrębu i widocznymi na preparatach naczyniami były wypełnione przez hepatocyty. Układały się one w belecзки wątrobowe, które biegły promieniście ku żyłom środkowym. Żyły te cechowała prawidłowa budowa ściany, w tym komórek śródbłonka. Zraziki wątrobowe widoczne były dość wyraźnie i miały kształt sześciolub pięciokątny. Ich granice wyznaczały linie łączące sąsiednie przestrzenie bramno-żółciowe w liczbie 3 do 6. W przestrzeniach widoczne były przekroje przez tętnice, żyły i przewody żółciowe międzyzrazikowe.

Kwasochłonna cytoplazma hepatocytów na preparatach barwionych Hematoksyliną i Eozyną wybarwiona była na różowo. Na terenie cytoplazmy widoczne było jedno lub dwa zasadochłonne, fioletowo wybarwione Hematoksyliną jądra [Fot. nr 1, 2]. W śródbłonku zatok widoczne były komórki Browicza-Kupffera, a w ich świetle niewielka ilość krwinek. Ogniskowo obserwowano hepatocyty o zatartej, zniszczonej strukturze błony komórkowej. Widoczne w nich były pyknotyczne jądra silnie, ciemno wybarwione Hematoksyliną o nieregularnym obrysie i zmniejszonych wymiarach. Ogniskowo zaznaczona defragmentacja beleczek wątrobowych oraz wolne „nagie” jądra świadczyły o miejscowym obumieraniu komórek o cechach apoptozy [Fot. nr 2, 3]. W grupach doświadczalnych (III, V) widoczne było poszerzenie światła sinusoid [Fot. nr 3, 4].



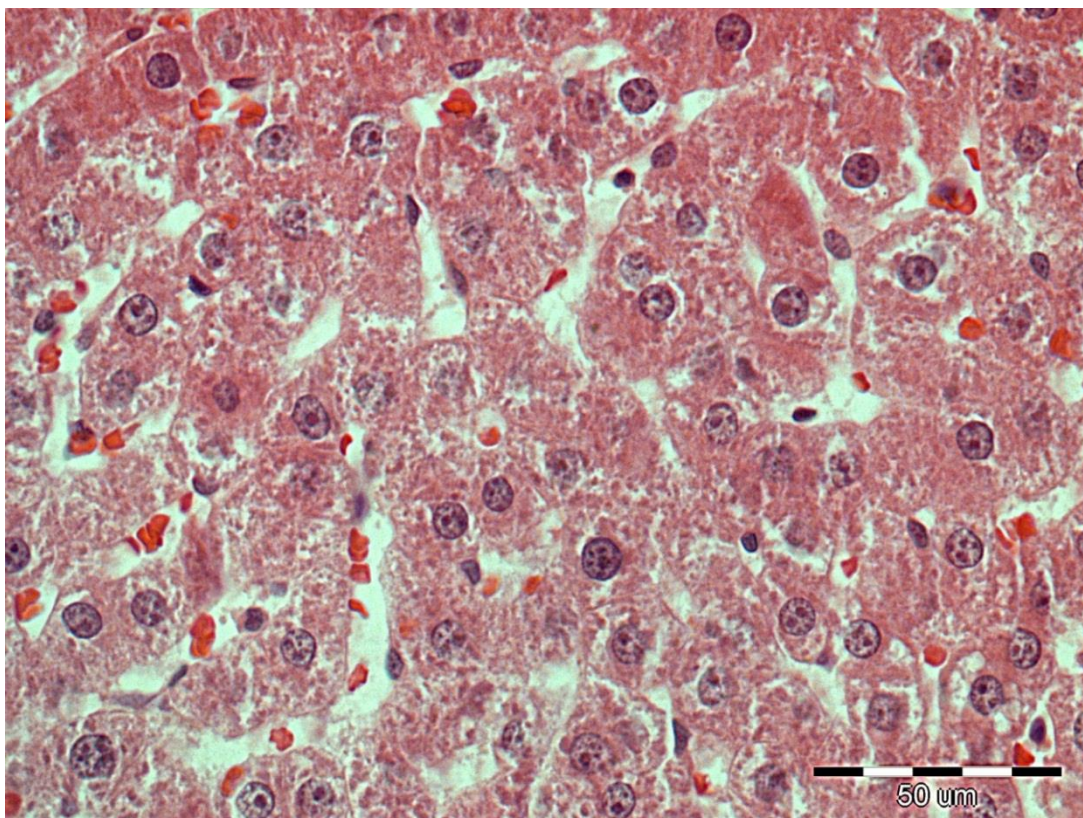
Fot. nr 1. GRUPA KONTROLNA VI. Fragment wątroby ciężarnej samicy szczura dekapitowanej 10 dnia po okoceniu.

Hepatocyty o różowej cytoplazmie posiadają w centralnej części okrągłe, duże, jedno lub dwa fioletowo zabarwione jądra z 1, 2 jąderkami. W świetle sinusoid widoczne krwinki. Między komórkami śródbłonna naczyń włosowatych widoczne komórki Browicza-Kupffera. Barwienie H+E.



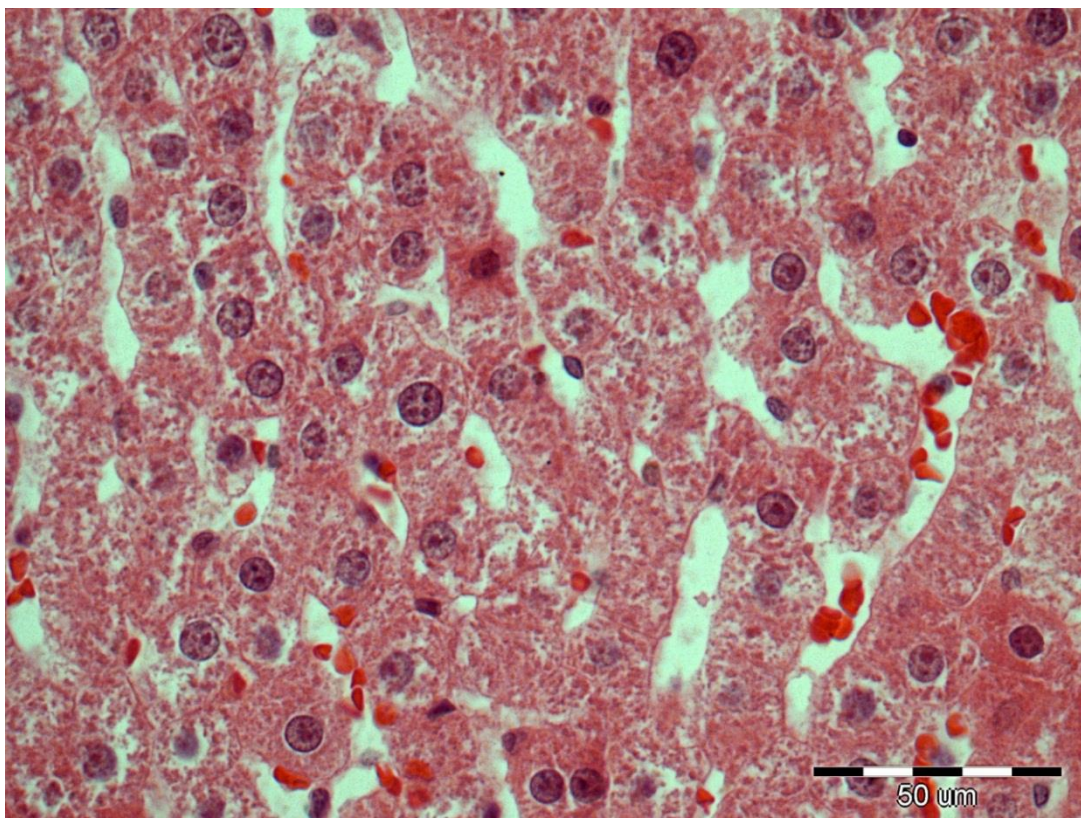
Fot. nr 2. GRUPA KONTROLNA VII. Fragment wątroby nieciążarnej samicy szczura dekapitowanej 30 dnia trwania doświadczenia.

Prawidłowa architektonika beleczyk wątrobowych. Jądra hepatocytów okrągłe, jasnofioletowe położone w komórkach centralnie. Widoczny fragment żyły centralnej i odchodzące od niej beleczyki wątrobowe zbudowane z hepatocytów. W sinusoidach krwinki. Wokół żyły centralnej przekrwienie. W kilku hepatocytach widoczne pyknotyczne jądra. Barwienie H+E.



Fot. nr 3. GRUPA DOŚWIADCZALNA III. Fragment wątroby ciężarnej samicy szczura, której podano L-argininę i dekapitowano 20 dnia ciąży.

Nieco zatarte granice między poszczególnymi hepatocytami. Zabarwienie cytoplazmy hepatocytów od jasnoróżowego z przejaśnieniami do ciemnoróżowego o zbitej strukturze. W komórkach widoczne okrągłe fioletowe jądra z jąderkami. W poszerzonym świetle sinusoid obecne krwinki. Między komórkami śródbłonna sinusoid obecne komórki Browicza-Kupffera. Widoczne kilka uszkodzonych hepatocytów z pyknotycznymi jądrami. Bawienie H+E.



Fot. nr 4. GRUPA DOŚWIADCZALNA V. Fragment wątroby ciężarnej samicy szczura, której podano L-argininę i dekapitowano 10 dnia po okoceniu.

Ułożone w beleczki wątrobowe hepatocyty zawierają kwasochłonną cytoplazmę zabarwioną Eozyną na kolor różowy o różnej intensywności. W komórkach widoczne okrągłe fioletowe jądra z jąderkami. W poszerzonym świetle naczyń włosowatych zatokowych obecne krwinki. Widoczne kilka ciemnych jąder hepatocytów ze skondensowaną chromatyną. Bawienie H+E.

GRUPY KONTROLNE II i IV oraz GRUPA DOŚWIADCZALNA I

We wszystkich wymienionych grupach zarówno samic ciężarnych w fizjologicznej ciąży jak i samic ciężarnych, którym podano L-argininę obraz histologiczny pobranych do oceny wycinków wątroby barwionych Hematoksyliną i Eozyną, oglądanych pod mikroskopem świetlnym był podobny [Fot. nr 5, 6, 7]. Zmiany odbiegające od książkowych opisów normy były ogniskowe. W pozostałych oglądanych miejscach zwracała uwagę prawidłowa architektonika narządu z dobrze widocznymi, okonturowanymi zrazikami. Cytoplazma hepatocytów zabarwiona była na różowo [Fot. nr 5]. W centrum komórek widoczne było dość duże, wyraźne i okrągłe jedno lub dwa jądra z regularną błoną jądrową i zrębem chromatyny. Jądra zabarwione były na jasno fioletowo, a na ich terenie widoczne były wyraźnie 1 lub 2 jąderka. W

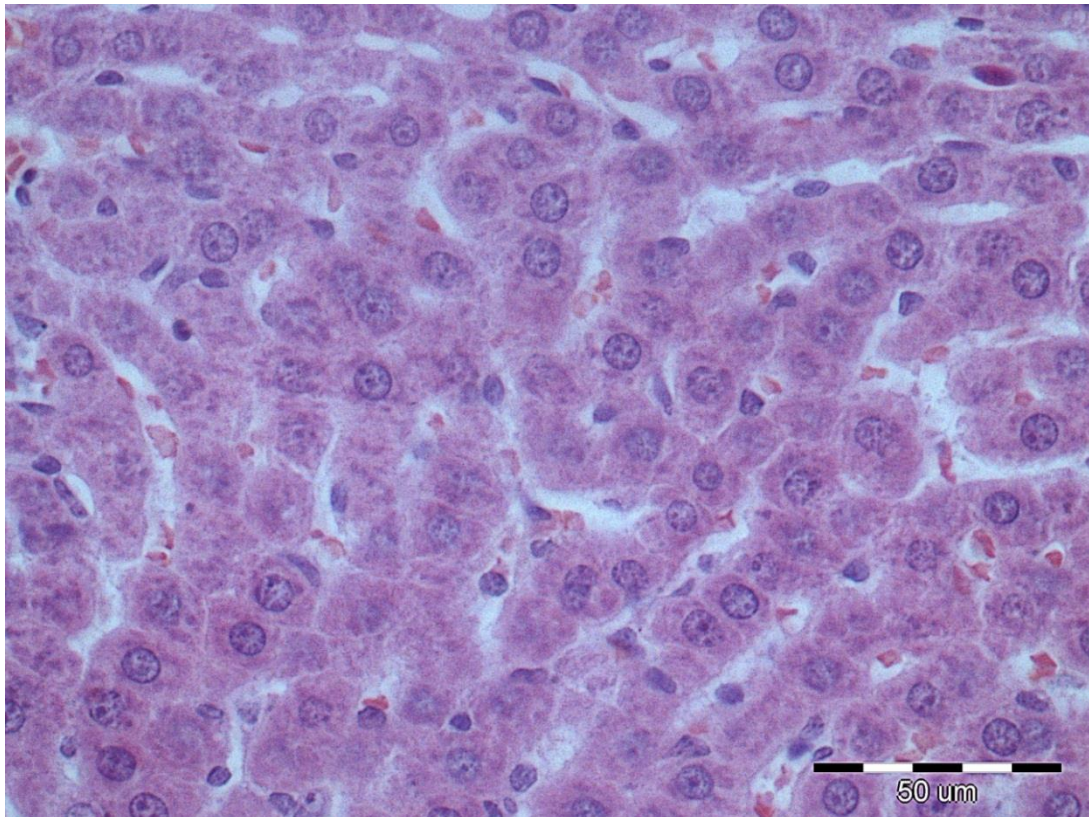
śródbłonku naczyń włosowatych zatokowych widoczne były komórki Browicza-Kupffera, a w ich świetle niewielka ilość krwinek [Fot. nr 5].

Na obserwowane ogniskowo zmiany w budowie badanej wątroby samic szczura składało się przede wszystkim zatarcie okonturowania komórek mięszu wątroby i ogniskowo dezintegracja architektoniki dotycząca kształtu i wielkości hepatocytów. Beleczki wątrobowe uległy ogniskowej defragmentacji. Charakterystyczna była różna wielkość, kształt i zabarwienie jąder, co było bardziej widoczne niż w pozostałych badanych grupach [Fot. nr. 5]. Chromatyna wykazywała cechy rozproszenia. W niektórych jądrach można było dostrzec zagęszczenie chromatyny na obwodzie jądra. Często stwierdzano zwiększoną liczbę jąder w jądrach.

W pojedynczych komórkach widoczne było zmniejszenie ilości cytoplazmy w postaci przejaśnień, zwłaszcza wokół jądra.

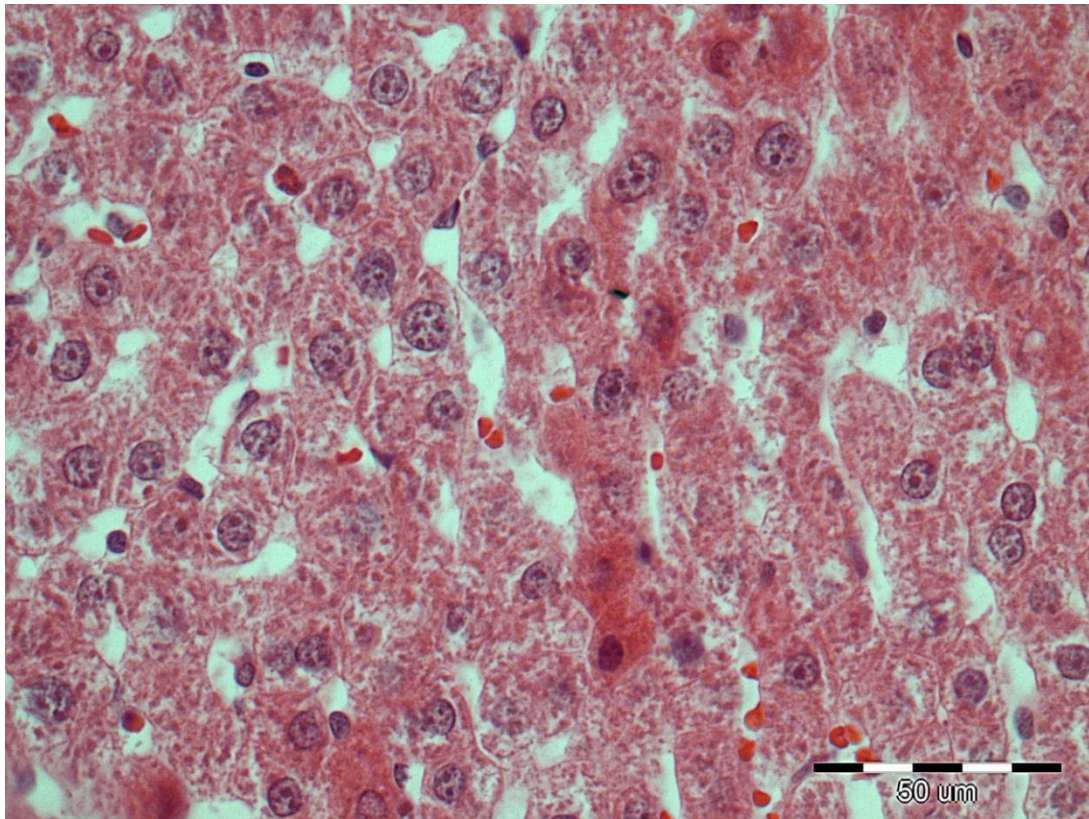
W niektórych komórkach nie widać było jądra lub miało ono wyraźnie zmniejszony obwód, zmieniony kształt i kolor o cechach kondensacji chromatyny. Obecność pyknotycznych jąder świadczyła o obumieraniu niektórych hepatocytów na drodze apoptozy [Fot. nr 6, 7].

Światło zatok było ogniskowo znacznie poszerzone. Widoczne w nim były nagie jądra hepatocytów oraz krwinki [Fot. nr 6, 7].



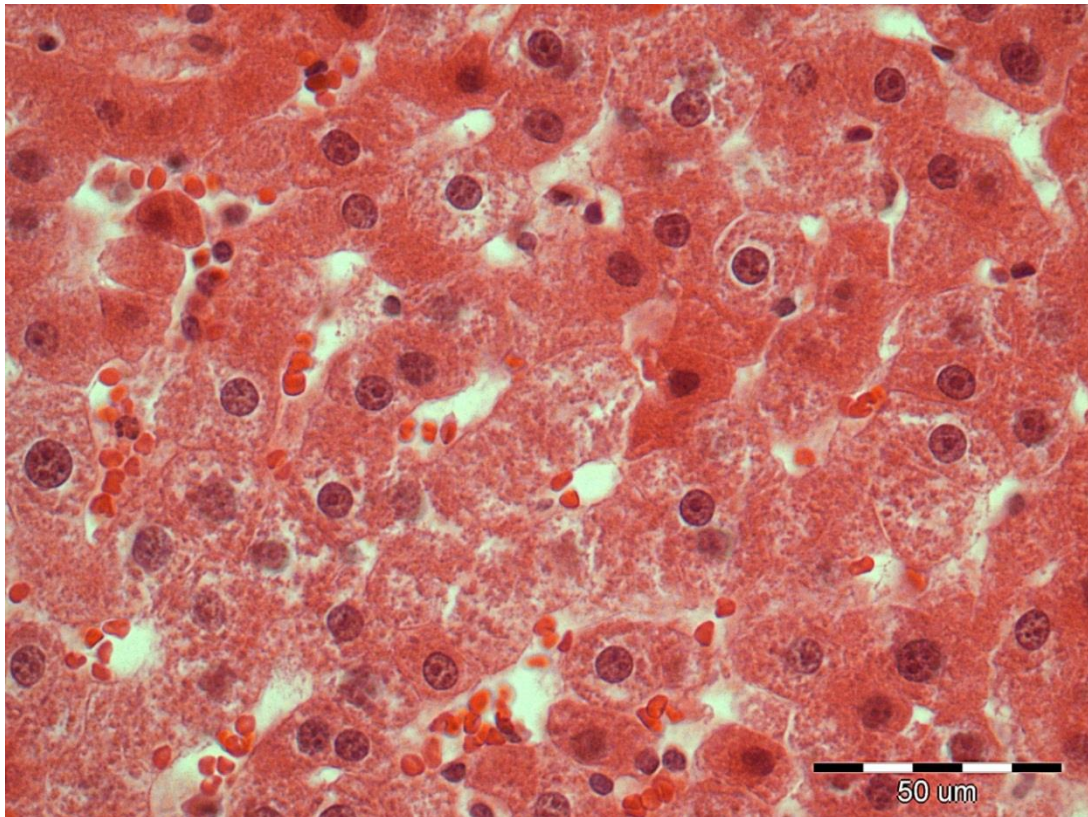
Fot. nr 5. GRUPA KONTROLNA II. Fragment wątroby ciężarnej samicy szczura dekapitowanej 10 dnia ciąży.

Widoczne hepatocyty ułożone w belecзки wątrobowe. Obecne w nich jądra mają różny kształt, kolor, wielkość. W niektórych hepatocytach są okrągłe, jasnofioletowe położone centralnie, w innych bardzo słabo zaznaczone lub nieobecne. W świetle prawidłowo szerokich sinusoid widoczne krwinki i pojedyncze „nagie”, pyknotyczne jądra. Między komórkami śródbłonna sinusoid obecne komórki Browicza-Kupffera. Barwienie H+E.



Fot. nr 6. GRUPA KONTROLNA IV. Fragment wątroby ciężarnej samicy szczura dekapitowanej 20 dnia ciąży.

Obecne miejsca o zaburzonej architektonice wątroby. Widoczne hepatocyty o przejaśnialej, jasnoróżowej cytoplazmie oraz o cytoplazmie skondensowanej intensywnie, kwasochłonnej. Część hepatocytów zawiera pyknotyczne jądra komórkowe, jądra słabo zaznaczone lub nie zawiera ich wcale. W świetle naczyń włosowatych zatokowych obecne krwinki. Barwienie H+E.



Fot. nr 7. GRUPA DOŚWIADCZALNA I. Fragment wątroby ciężarnej samicy szczura, której podano L-argininę i dekapitowano 10 dnia ciąży.

Ogniskowo widoczne zaburzenie architektoniki narządu. Obok prawidłowych hepatocytów widoczne hepatocyty o nieregularnym kształcie lub szczątkowe o ciemnej cytoplazmie, bez jądra lub z jądrem o zaburzonym kształcie i zabarwieniu – jądra pyknotyczne. Widoczne też hepatocyty o jasnej, ziarnistej cytoplazmie z jądrami słabo zaznaczonymi, lub bez jąder. Wokół jąder niektórych hepatocytów brak cytoplazmy. W poszerzonym świetle zatok widoczne liczne krwinki. Barwienie H+E.

5.5. INDEKS APOPTOZY (APOPTOTIC INDEX, AI)

Przebadano 100 komórek w każdym z trzech preparatów pochodzących od każdego osobnika. Łącznie przebadano 114 preparatów wątroby pochodzących od samic z grup kontrolnych i 90 preparatów wątroby pochodzących od szczurów z grup doświadczalnych.

GRUPY KONTROLNE – wyniki badań statystycznych

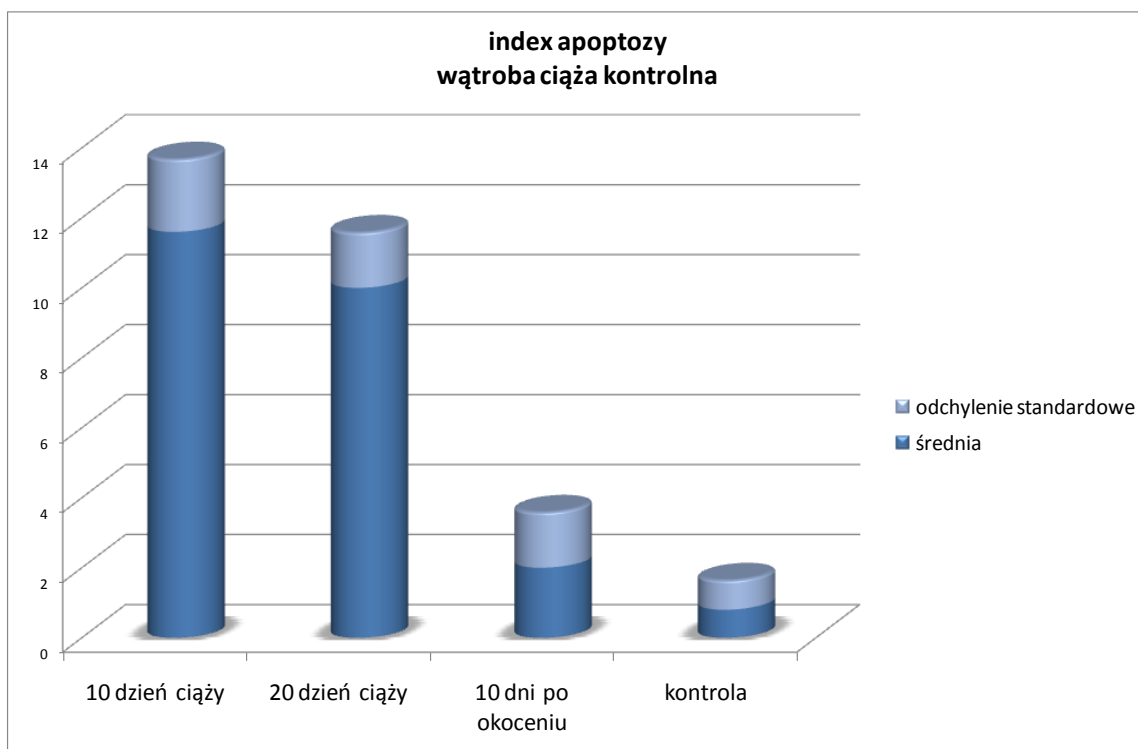
W grupach kontrolnych indeks apoptozy – 10 i 20 dnia ciąży był istotnie statystycznie większy niż w grupie samic nieciążarnych i 10 dni po okoceniu. 10 dnia ciąży był na takim samym poziomie jak 20 dnia ciąży ($p=0,21$). Nie było statystycznie istotnych różnic między kontrolną grupą samic nieciążarnych i 10 dni po okoceniu ($p=0,19$) (Tabela nr 2, 3, Wykres nr 1).

KONTROLA	Wątroba INDEX APOPTOZY				One Way ANOVA
	Ciąża			K	
	II	IV	VI	VII	
Średnia	11,6	10	2	0,8	$P<0,001$
Odchylenie Standardowe	2,07	1,58	1,58	0,84	

Tabela nr 2. Średnia ilość komórek apoptotycznych na 100 w polu widzenia w grupach kontrolnych. Odchylenie standardowe i One Way ANOVA test.

KONTROLA	Wątroba INDEX APOPTOZY			
	II	IV	VI	VII
II	X	X	X	X
IV	$P=0,21$	X	X	X
VI	$P<0,001$	$P<0,001$	X	X
VII	$P=0,0001$	$P<0,001$	$P=0,19$	X

Tabela nr 3. Istotność statystyczna różnic pomiędzy badanymi grupami kontrolnymi w średniej ilości komórek apoptotycznych na 100 komórek w polu widzenia. Test t-studenta.



Wykres nr 1. Porównanie średniej ilości komórek apoptotycznych na 100 w polu widzenia w grupach kontrolnych

GRUPY DOŚWIADCZALNE – wyniki badań statystycznych

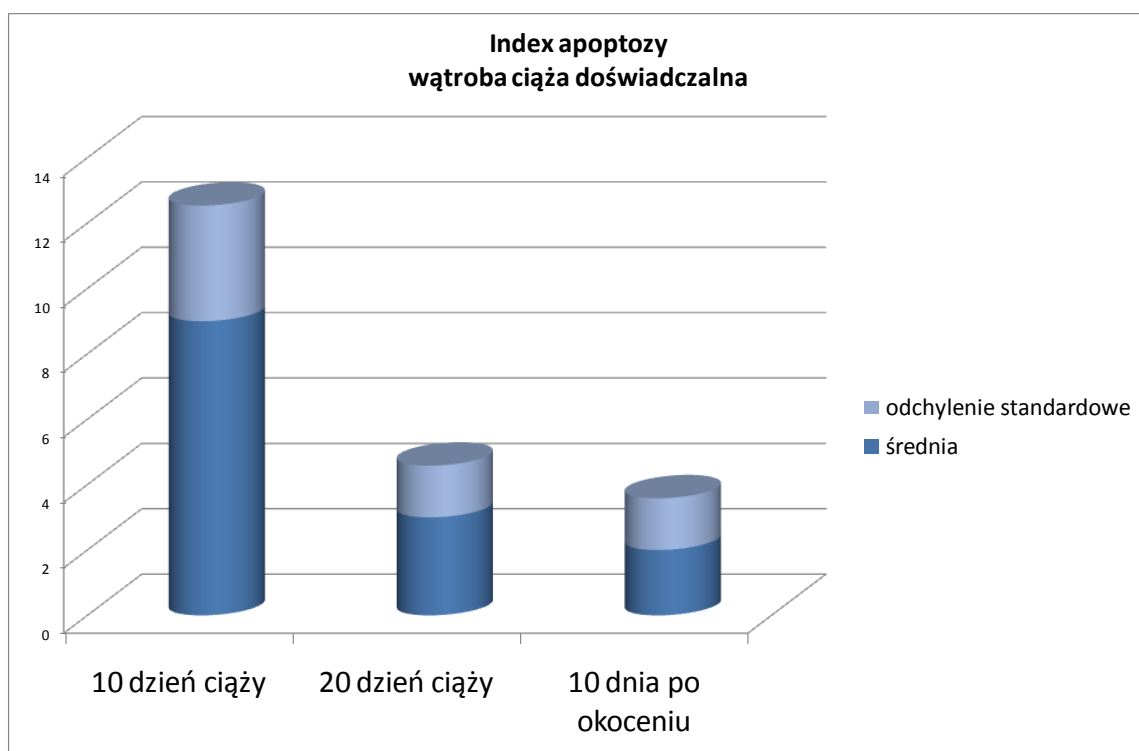
W grupach doświadczalnych index apoptozy 20 dnia ciąży był podobny do tego opisywanego 10 dnia po okoceniu ($p=0,35$). Statystycznie istotnie zmniejszył się 20 dnia ciąży w stosunku do grupy doświadczalnej I.

CIAŻA DOŚWIADCZALNA	Wątroba INDEX APOPTOZY			One Way ANOVA
	I	III	V	
Średnia	9	3	2	P=0,002
Odchylenie standardowe	3,54	1,58	1,58	

Tabela nr 4. Średnia ilość komórek apoptotycznych na 100 w polu widzenia w grupach doświadczalnych. Odchylenie standardowe i One Way ANOVA test.

CIAŻA DOŚWIADCZALNA	Wątroba INDEX APOPTOZY		
	I	III	V
I	X	X	X
III	P=0,02	X	X
V	P=0,007	P=0,35	X

Tabela nr 5. Istotność statystyczna różnic pomiędzy badanymi grupami doświadczalnymi w średniej ilości komórek apoptotycznych na 100 w polu widzenia. Test t-studenta.



Wykres nr 2. Porównanie średniej ilości komórek apoptotycznych na 100 w polu widzenia w grupach doświadczalnych.

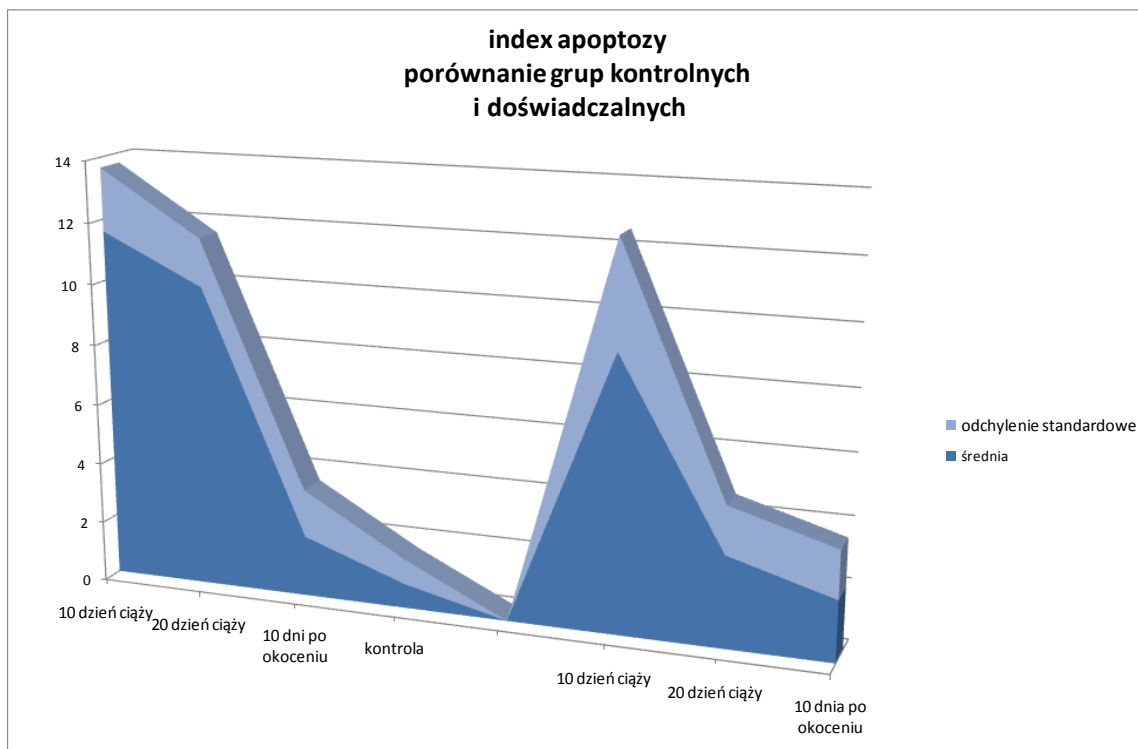
PORÓWNANIE GRUP KONTROLNYCH I DOŚWIADCZALNYCH – wyniki badań statystycznych

Indeks apoptozy w kontrolnej ciąży wzrósł 10 dnia i utrzymywał się na podobnym poziomie do 20 dnia ciąży. Istotnie statystycznie zmniejszył się 10 dni po okoceniu. Był wtedy porównywalny z obserwowanym w grupie samic doświadczalnych 20 dnia ciąży i 10 dnia po okoceniu.

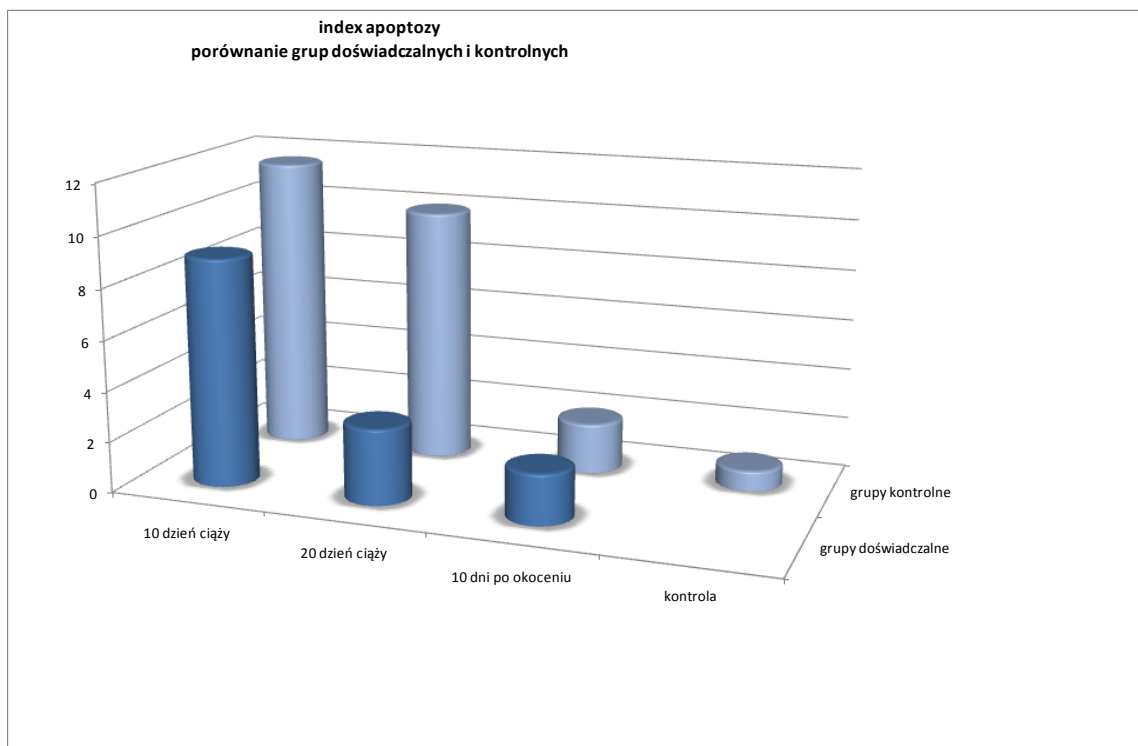
W ciąży, w której stosowano L-argininę indeks apoptozy był nasilony 10 dnia podobnie jak w tym czasie w ciąży kontrolnej, zmniejszył się 20 dnia i był podobny do tego obserwowanego 10 dni po okoceniu i istotnie niższy niż w tym samym dniu w ciąży kontrolnej (Tabela nr 6, Wykres nr 3, 4).

CIAŻA DOŚWIADCZALNA	CIAŻA KONTROLNA			
	II	IV	VI	VII
I	P=0,21	P=0,58	P=0,007	P=0,007
III	P=0,0002	P=0,0001	P=0,35	P=0,03
V	P<0,001	P<0,001	P=1	P=0,18

Tabela nr 6. Istotność statystyczna różnic pomiędzy badanymi grupami kontrolnymi i doświadczalnymi w średniej ilości komórek apoptotycznych na 100 w polu widzenia. Test t-studenta.



Wykres nr 3. Porównanie średniej ilości komórek apoptotycznych na 100 w polu widzenia w grupach kontrolnych i doświadczalnych.



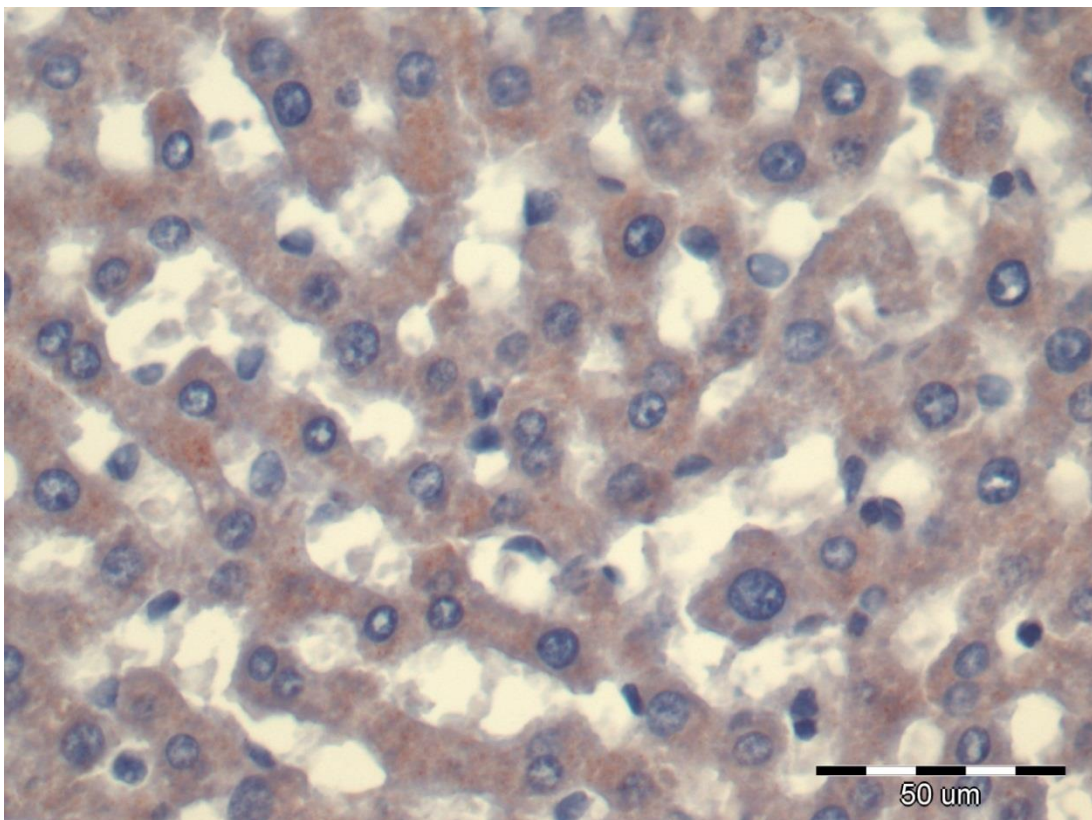
Wykres nr 4. Porównanie średniej ilości komórek apoptotycznych na 100 w polu widzenia w grupach kontrolnych i doświadczalnych.

5.6. WYNIKI BADAŃ IMMUNOHISTOCHEMICZNYCH

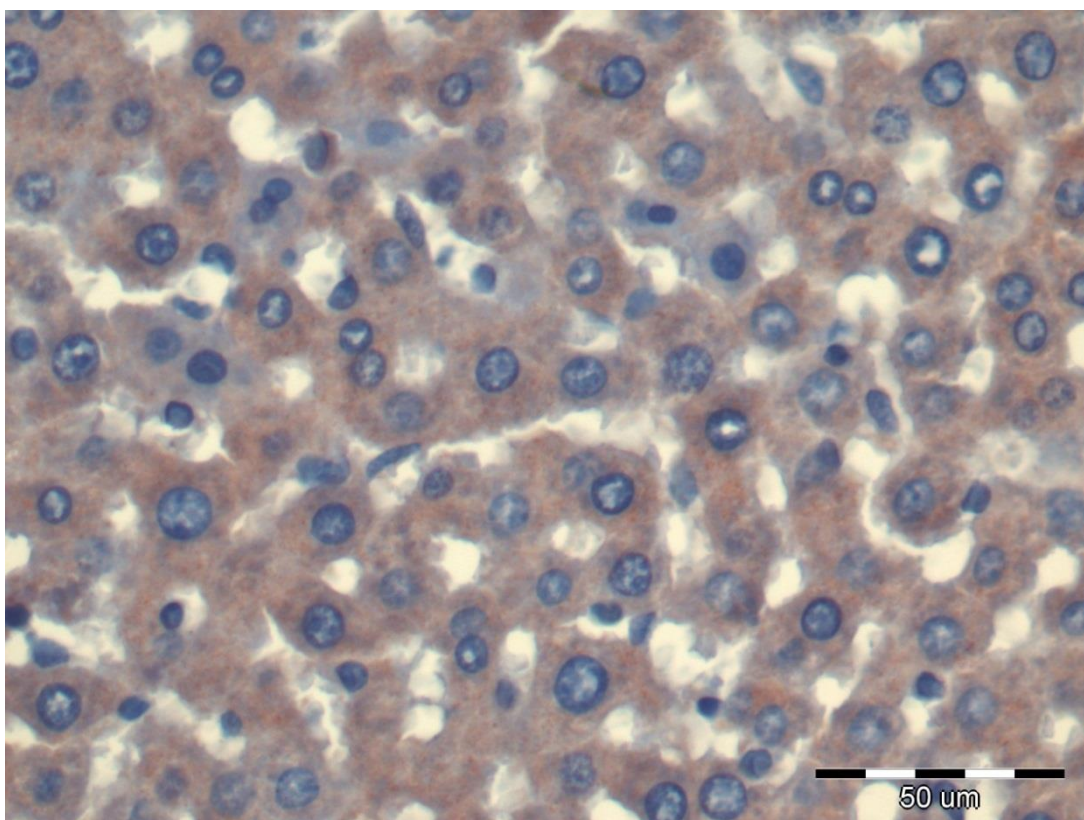
5.6.1. KASPAZA 3

GRUPY KONTROLNE –dokumentacja fotograficzna

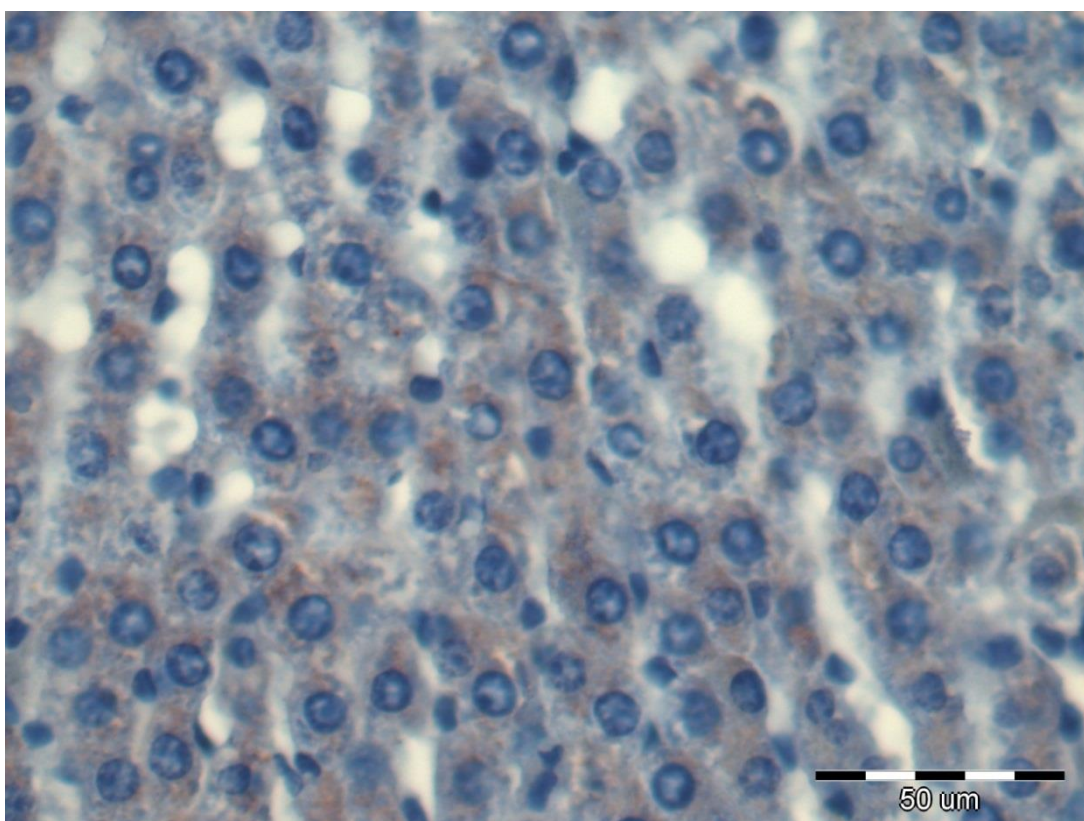
Odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 3 oceniany jakościowo obserwowany był na wszystkich preparatach wątroby pochodzących od samic będących w fizjologicznej ciąży oraz od samic nieciążarnych [Fot. nr 8, 9, 10, 11]. Największą intensywność czerwono- różowego odczynu zaobserwowano w komórkach wątroby na wycinkach pochodzących od ciężarnych samic badanych 10 i 20 dnia ciąży [Fot. nr 8, 9). Odczyn o mniejszej intensywności dotyczący niektórych tylko hepatocytów zauważono na preparatach pobranych od samic badanych 10 dni po okoceniu oraz samic nieciążarnych [Fot. nr 10, 11].



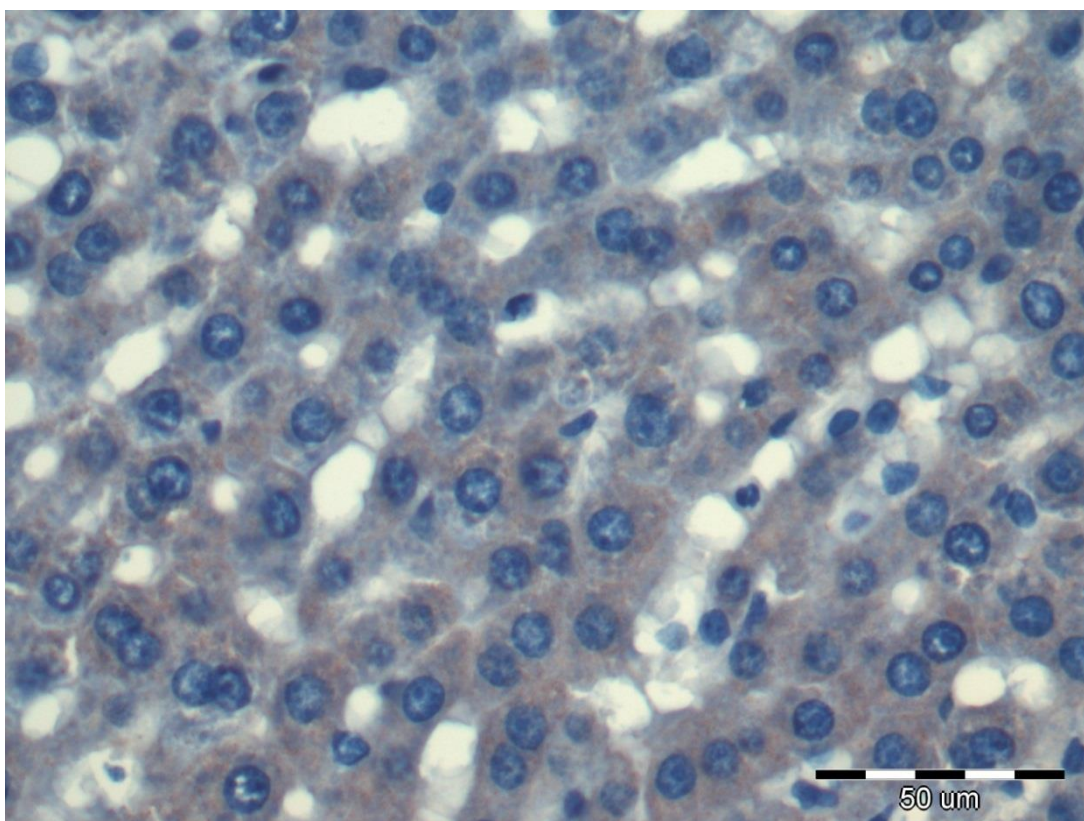
Fot. nr 8. GRUPA KONTROLNA II. Nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 3 we fragmencie wątroby ciężarnej samicy szczura badanej 10 dnia ciąży. Barwienie H+AEC.



Fot. nr 9. GRUPA KONTROLNA IV. Nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 3 we fragmencie wątroby ciężarnej samicy szczura badanej 20 dnia ciąży. Barwienie H+AEC.



Fot. nr 10. GRUPA KONTROLNA VI. Średnio nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 3 we fragmencie wątroby samicy szczura badanej 10 dnia po okoceniu. Barwienie H+AEC.



Fot. nr 11. GRUPA KONTROLNA VII. Średnio nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 3 we fragmencie wątroby nieciążarnej samicy szczura. Barwienie H+AEC.

GRUPY KONTROLNE – wyniki badań statystycznych

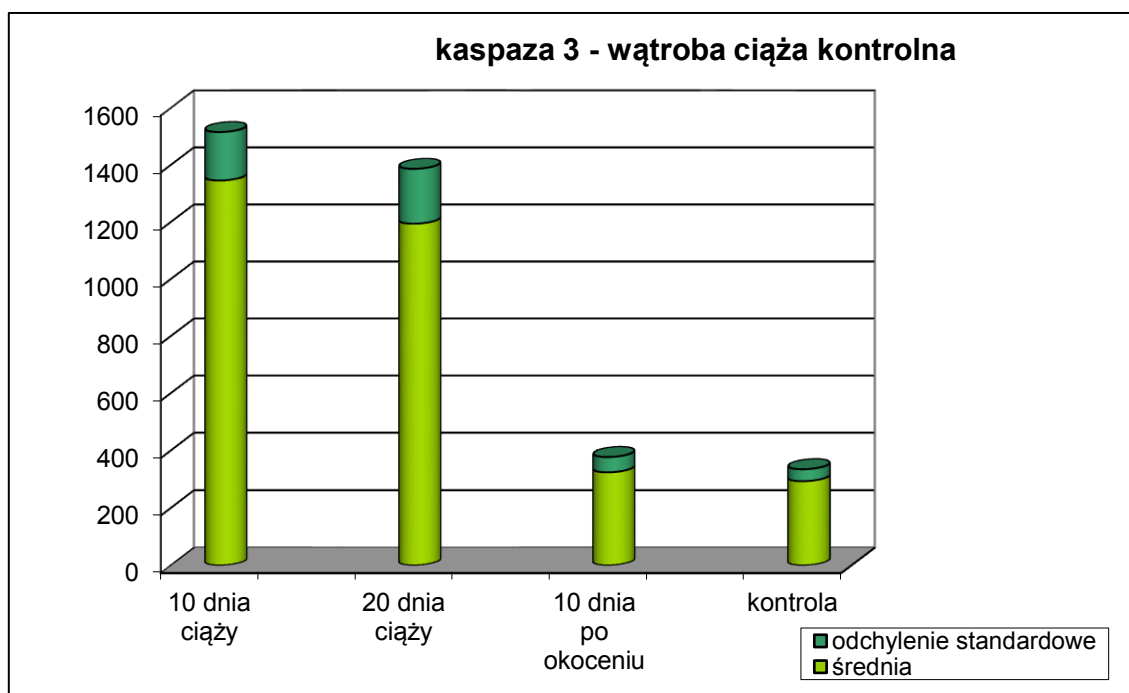
Przebadano łącznie 38 osobników ze wszystkich grup kontrolnych samic w fizjologicznej ciąży i samic nieciążarnych. Z każdej badanej wątroby pobierano po 3 wycinki, z których robiono preparaty. W każdym preparacie badano pole powierzchni w 3 miejscach. Łącznie w całym doświadczeniu przebadano 342 miejsca na preparatach pochodzących od samic z grup kontrolnych.

KONTROLA	Wątroba KASPAZA 3				One Way ANOVA
	Cięża			K	
	II	IV	VI	VII	
Średnia	1345,55	1194,09	324,05	1293,575	1990,087
Odchylenie Standardowe	169,68	192,21	53,00	41,39	293,17

Tabela nr 7. Średnie pole powierzchni w μm^2 zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 3 na badanej powierzchni: $781193,35 \mu\text{m}^2$ w grupach kontrolnych. Odchylenie standardowe i One Way ANOVA test.

Kontrola	Wątroba KASPAZA 3			
	II	IV	VI	VII
II	X	X	X	X
IV	P=0,18	X	X	X
VI	P<0,001	P<0,001	X	X
VII	P<0,001	P<0,001	P=0,29	X

Tabela nr 8. Istotność statystyczna różnic pomiędzy badanymi grupami kontrolnymi w średnim polu powierzchni zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 3. Test t-studenta.



Wykres nr 5. Porównanie średniego pola powierzchni w μm^2 zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 3 w grupach kontrolnych.

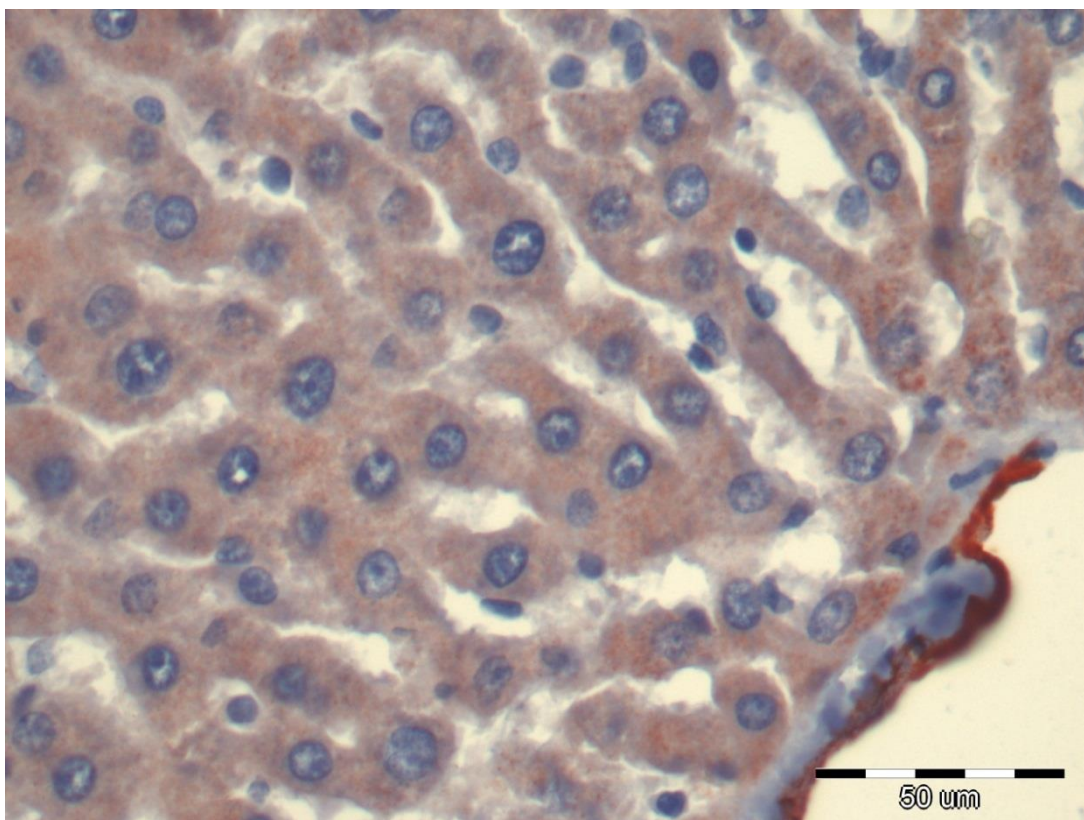
W grupach kontrolnych pole powierzchni wątroby zajętej przez odczyn immunohistochemiczny w miejscu lokalizacji kaspazy 3 - 10 i 20 dnia ciąży było istotnie statystycznie większe niż w wątrobie pochodzącej od samic nieciążarnych i samic badanych 10 dni po okoceniu.

10 dnia ciąży pole powierzchni wątroby zajętej przez odczyn immunohistochemiczny dla badanego białka było porównywalne do tego badanego w wątrobie samic dekapitowanych 20 dnia ciąży ($p=0,18$).

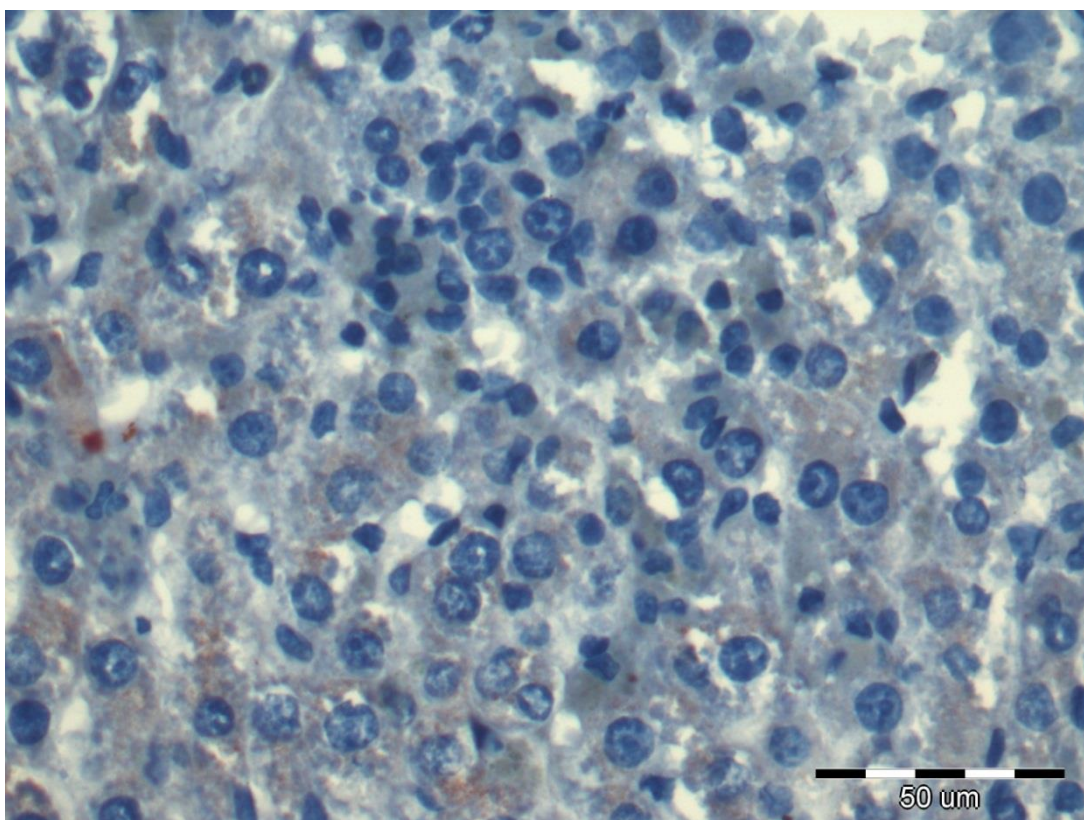
Nie było statystycznie istotnych różnic między polem powierzchni odczynu dla kaspazy 3 badanym w grupie kontrolnej i w grupie ocenianej 10 dni po okoceniu ($p=0,29$) (Tabela nr 7, 8. Wykres nr 5).

GRUPY DOŚWIADCZALNE – dokumentacja fotograficzna

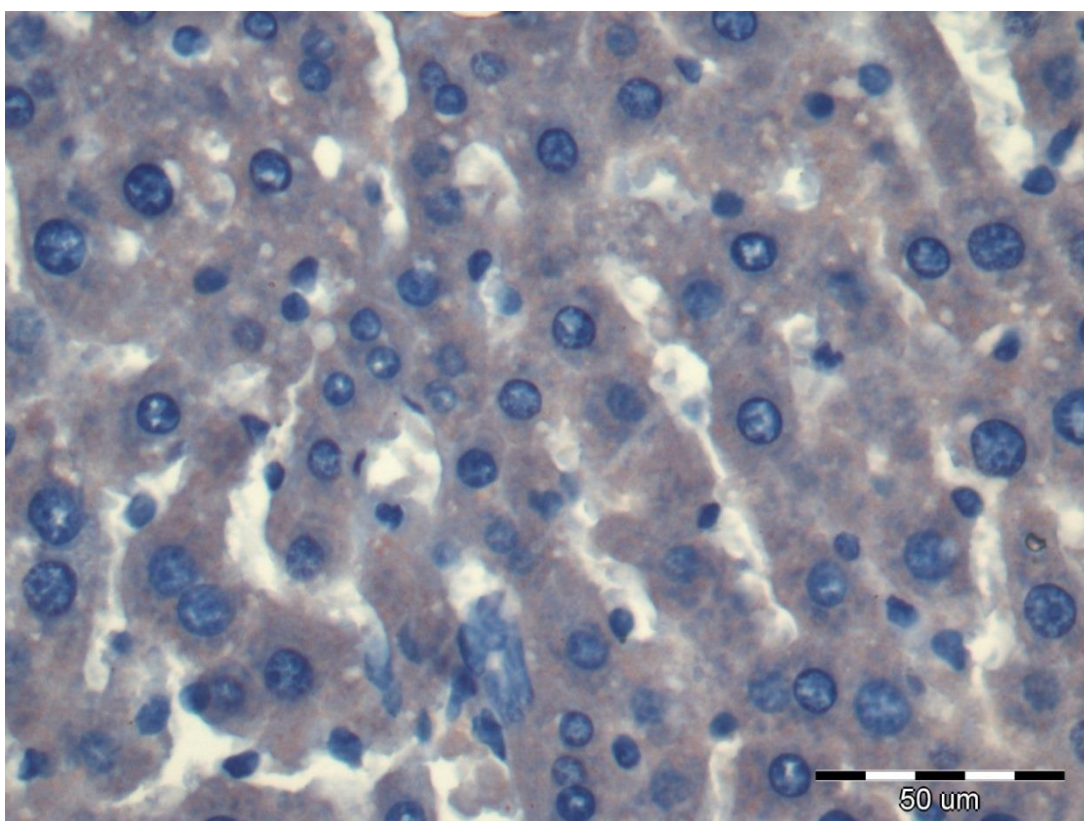
Na preparatach wątroby pochodzącej od samic z grup doświadczalnych, czyli tych, którym podano L-argininę podczas trwania ciąży, obserwowano różowy odczyn immunohistochemiczny o różnej intensywności w komórkach wątroby w miejscach immunologicznego wykrycia aktywnej kaspazy 3 [Fot. nr 12, 13, 14]. Ciemno różowa barwa odczynu wypełniająca całą cytoplazmę komórek była charakterystyczna dla wątroby pochodzącej od samic ciężarnych, którym podano L-argininę i badano 10 dnia ciąży [Fot. nr 12]. Średnio nasilony odczyn jasnoróżowy, mniej uogólniony i nie wypełniający całej cytoplazmy hepatocytów obecny był na preparatach wątroby ciężarnych samic szczura badanych 20 –tego dnia ciąży oraz 10 dni po okoceniu [Fot. nr 13, 14].



Fot. nr 12. GRUPA DOŚWIADCZALNA I. Nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 3 we fragmencie wątroby ciężarnej samicy szczura badanej 10 dnia ciąży. Barwienie H+AEC.



Fot. nr 13. GRUPA DOŚWIADCZALNA III. Średnio nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 3 we fragmencie wątroby ciężarnej samicy szczura badanej 20 dnia ciąży. Barwienie H+AEC.



Fot. nr 14. GRUPA DOŚWIADCZALNA V. Średnio nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 3 we fragmencie wątroby samicy szczura badanej 10 dnia po okoceniu. Barwienie H+AEC.

GRUPY DOŚWIADCZALNE – wyniki badań statystycznych

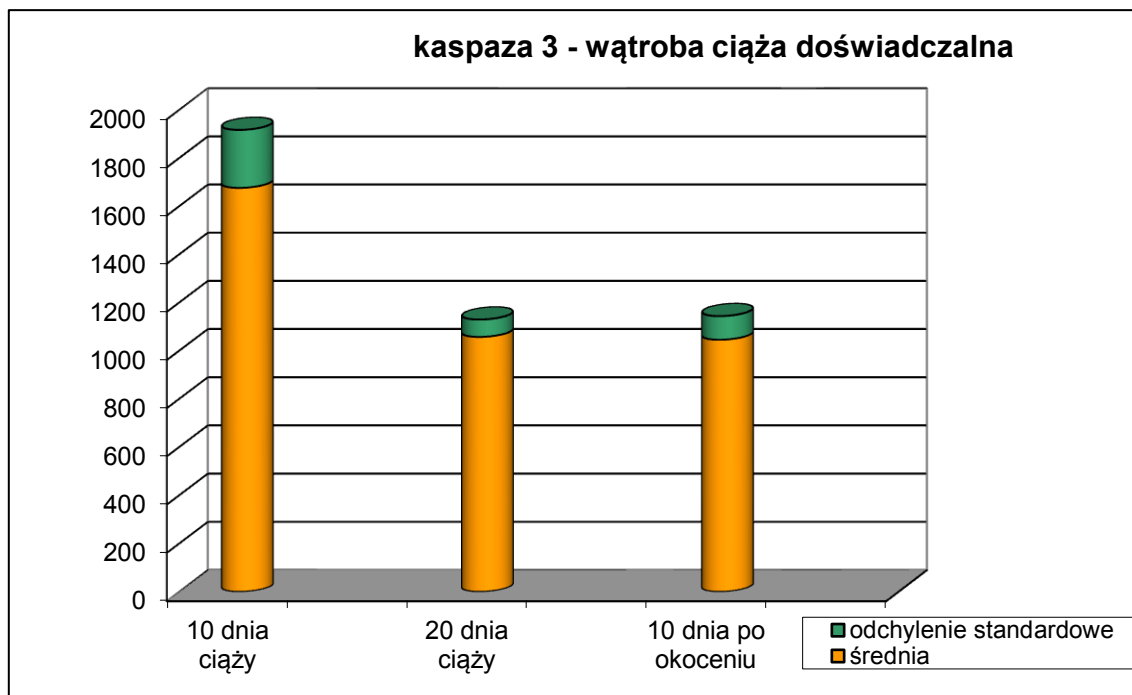
W grupach doświadczalnych przebadano łącznie 30 samic, którym podano L-argininę w fizjologicznej ciąży i 10 dni po okoceniu. Z każdej badanej wątroby pobierano po 3 wycinki, z których robiono preparaty. W każdym preparacie badano pole powierzchni w 3 miejscach. Łącznie w całym doświadczeniu przebadano 270 miejsc na preparatach pochodzących od samic z grup doświadczalnych.

CIAŻA DOŚWIADCZALNA	Wątroba KASPAZA 3			One Way ANOVA
	I	III	V	
Średnia	1676,30	1057,40	1045,72	P<0,001
Odchylenie Standardowe	240,70	72,08	98,03	

Tabela nr 9. Średnie pole powierzchni w μm^2 zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 3 na badanej powierzchni: 781193,35 μm^2 w grupach doświadczalnych. Odchylenie standardowe i One Way ANOVA test.

CIAŻA DOŚWIADCZALNA	Wątroba KASPAZA 3		
	I	III	V
I	X	X	X
III	P<0,001	X	X
V	P<0,001	P=0,78	X

Tabela nr 10. Istotność statystyczna różnic pomiędzy badanymi grupami doświadczalnymi w średnim polu powierzchni zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 3. Test t-studenta.



Wykres nr 6. Porównanie średniego pola powierzchni w μm^2 zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 3 w grupach doświadczalnych.

W grupach doświadczalnych odczyn dla kaspazy 3 w badanej wątrobie samic obserwowanych 20 dnia ciąży był podobny do tego opisywanego w wątrobie samic ocenianych 10 dnia po okoceniu ($p=0,78$).

Pole powierzchni zajętej przez odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 3 w wątrobie badanej 20 dnia ciąży zmniejszyło się statystycznie istotnie w stosunku do tego opisanego w grupie doświadczalnej I (samic badanych 10 dnia ciąży) (Tabela nr 9, 10, Wykres nr 6).

PORÓWNANIE GRUP KONTROLNYCH I DOŚWIADCZALNYCH – wyniki badań statystycznych

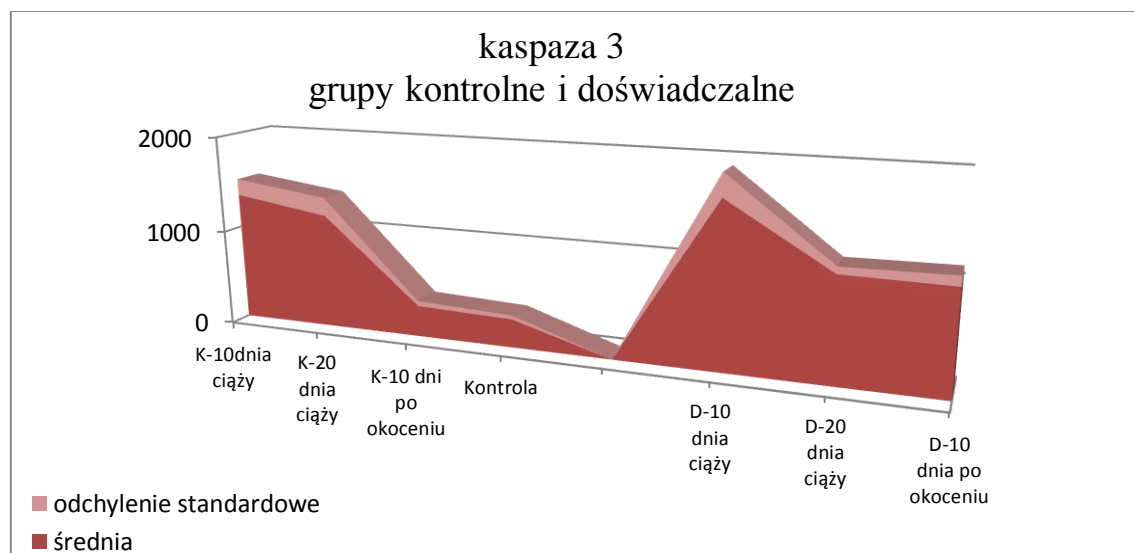
Odczyn dla kaspazy 3 w kontrolnej ciąży wzrósł 10 dnia i utrzymywał się na podobnym poziomie do 20 dnia ciąży. Istotnie statystycznie zmniejszył się 10 dni po okoceniu. Był wtedy najniższy wśród obserwowanych we wszystkich badanych grupach doświadczalnych i kontrolnych oraz porównywalny z obserwowanym w grupie nieciążarnych samic.

W ciąży, w której stosowano L-argininę odczyn dla kaspazy 3 był nasilony 10 dnia bardziej niż w tym czasie w ciąży kontrolnej, zmniejszył się 20 dnia i był podobny

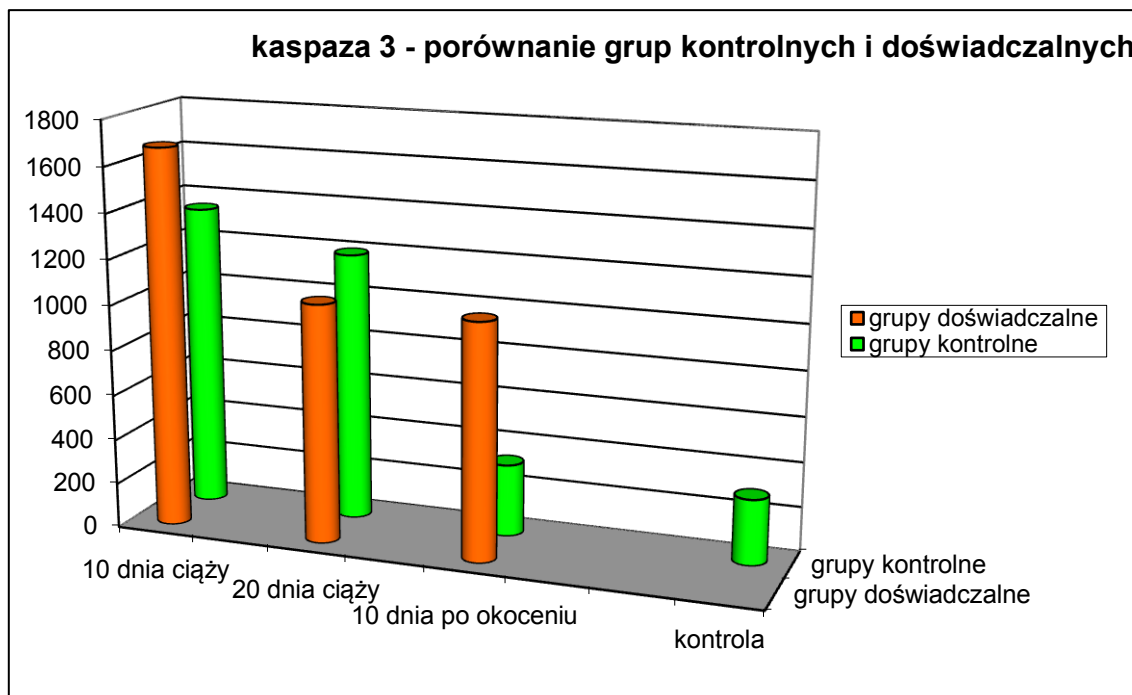
do tego obserwowanego 10 dni po okoceniu i niższy niż tego samego dnia w ciąży kontrolnej (Tabela nr 11, Wykres nr 7, 8).

CIAŻA DOŚWIADCZALNA	CIAŻA KONTROLNA			
	II	IV	VI	VII
I	P=0,008	P=0,001	P<0,001	P<0,001
III	P=0,008	P=0,15	P<0,001	P<0,001
V	P=0,006	P=0,12	P<0,001	P<0,001

Tabela nr 11. Istotność statystyczna różnic pomiędzy badanymi grupami kontrolnymi i doświadczalnymi w średnim polu powierzchni zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 3. Test t-studenta.



Wykres nr 7. Porównanie średniego pola powierzchni w μm^2 zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 3 w grupach kontrolnych i doświadczalnych.



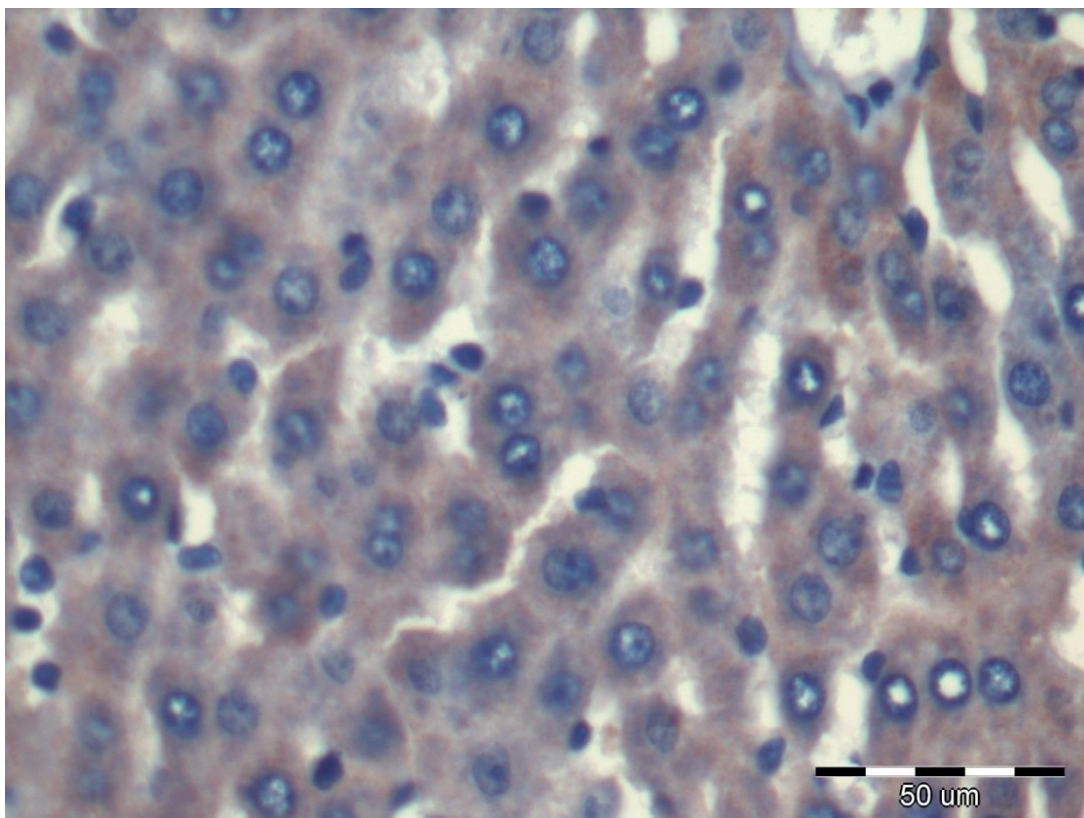
Wykres nr 8. Porównanie średniego pola powierzchni w μm^2 zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 3 w grupach kontrolnych i doświadczalnych.

5.6.2. KASPAZA 8

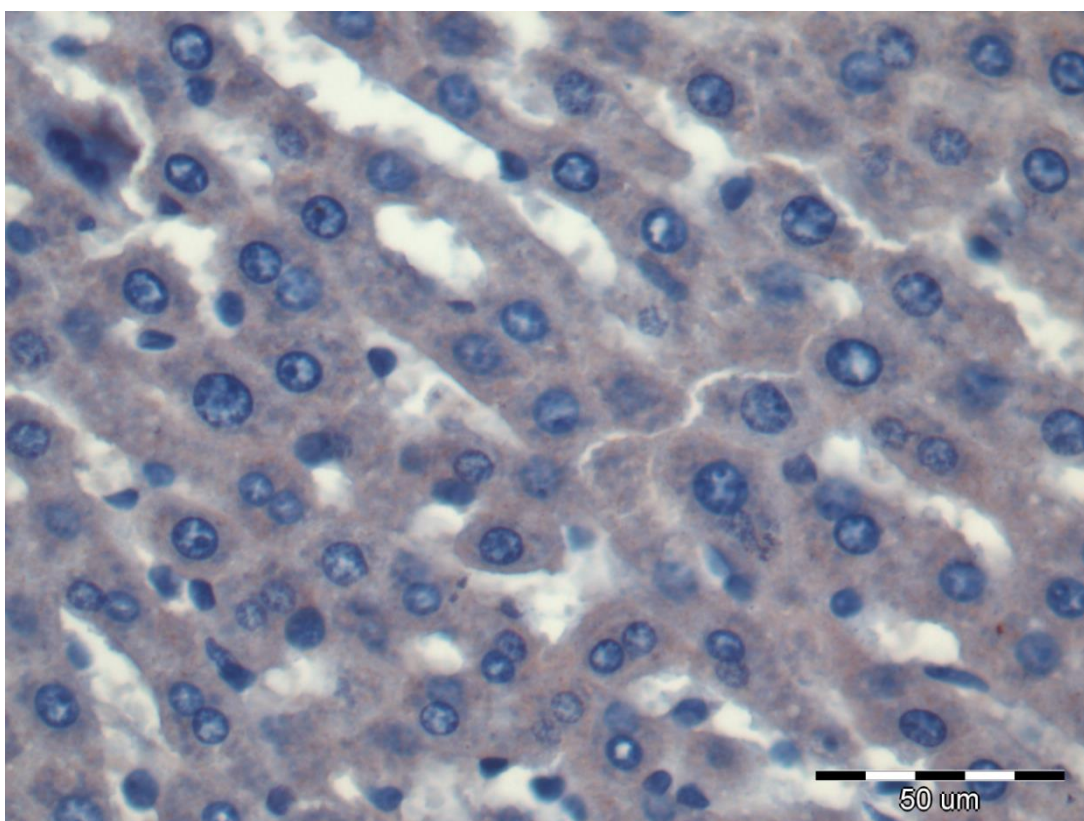
GRUPY KONTROLNE –dokumentacja fotograficzna

Odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 8 oceniany jakościowo w wątrobie samic szczura z grup kontrolnych był nasilony średnio lub słabo [Fot. nr 15, 16, 17, 18]. Różowe zabarwienie w miejscu pozytywnej reakcji antygen-przeciwciało było najbardziej intensywne w wątrobie samic badanych 10 dnia fizjologicznej ciąży. Nieco słabszy odczyn w postaci barwnej różowej reakcji obecny był w cytoplazmie komórek wątroby samic badanych 20 dnia ciąży. Zabarwienie wypełniało całą cytoplazmę obserwowanych komórek wątroby [Fot. nr 15, 16].

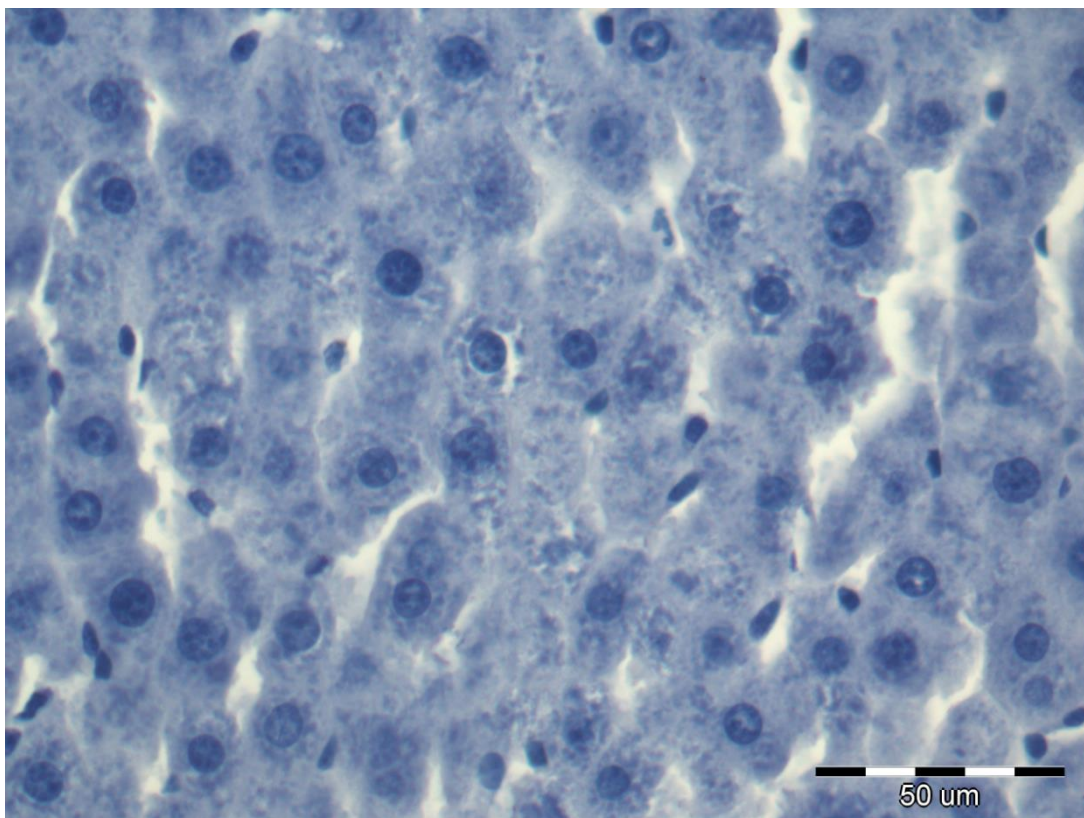
W grupie samic dekapitowanych 10 dni po okoceniu oraz w grupie samic nieciążarnych odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 8 w komórkach wątroby był bardzo słaby. Niemal niedostrzegalny [Fot. nr 17, 18].



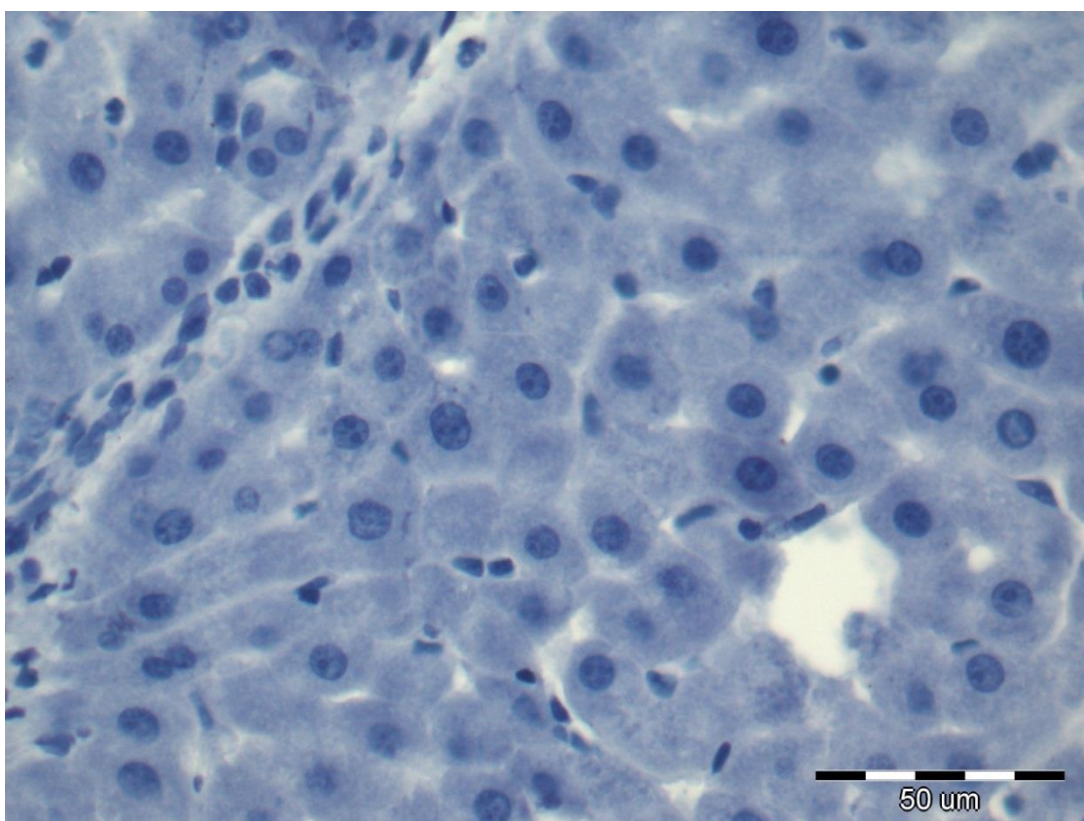
Fot. nr 15. GRUPA KONTROLNA II. Średnio nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 8 we fragmencie wątroby ciężarnej samicy szczura oglądanej 10 dnia ciąży. Barwienie H+AEC.



Fot. nr 16. GRUPA KONTROLNA IV. Średnio nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 8 we fragmencie wątroby ciężarnej samicy szczura oglądanej 20 dnia ciąży. Barwienie H+AEC.



Fot. nr 17. GRUPA KONTROLNA VI. Słabo nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 8 we fragmencie wątroby samicy szczura oglądanej 10 dnia po okoceniu. Barwienie H+AEC.



Fot. nr 18. GRUPA KONTROLNA VII. Słabo nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 8 we fragmencie wątroby nieciążarnej samicy szczura. Barwienie H+AEC.

GRUPY KONTROLNE – wyniki badań statystycznych

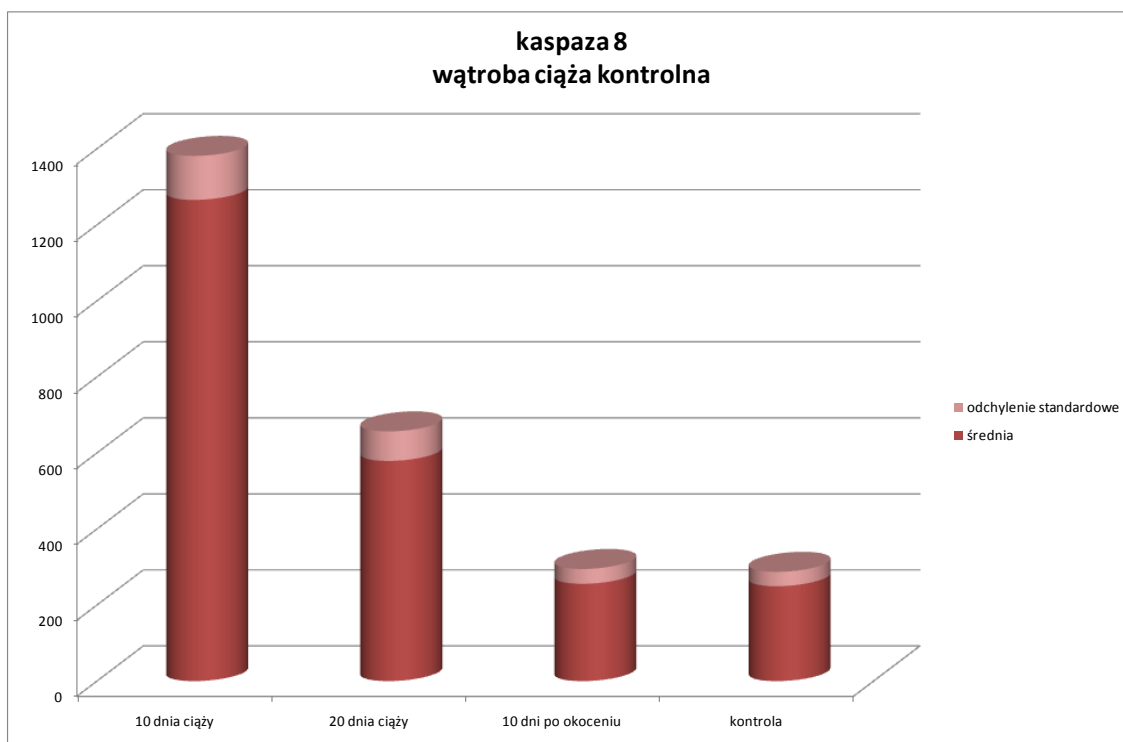
Przebadano łącznie 38 osobników ze wszystkich grup kontrolnych samic w fizjologicznej ciąży i samic nieciążarnych. Z każdej badanej wątroby pobierano po 3 wycinki, z których robiono preparaty. W każdym preparacie badano pole powierzchni w 3 miejscach. Łącznie w całym doświadczeniu przebadano 342 miejsca na preparatach pochodzących od samic z grup kontrolnych

KONTROLA	Wątroba KASPAZA 8				One Way ANOVA
	Cięża			K	
	II	IV	VI	VII	
Średnia	1265,79	579,16	255,99	249,72	P<0,001
Odchylenie Standardowe	115,68	77,68	38,99	37,68	

Tabela nr 12. Średnie pole powierzchni w μm^2 zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 8 na badanej powierzchni: 781193,35 μm^2 w grupach kontrolnych. Odchylenie standardowe i One Way ANOVA test

Kontrola	Wątroba KASPAZA 8			
	II	IV	VI	VII
II	X	X	X	X
IV	P<0,001	X	X	X
VI	P<0,001	P=0,0002	X	X
VII	P<0,001	P=0,0001	P=0,8	X

Tabela nr 13. Istotność statystyczna różnic pomiędzy badanymi grupami kontrolnymi w średnim polu powierzchni zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 8. Test t-studenta.

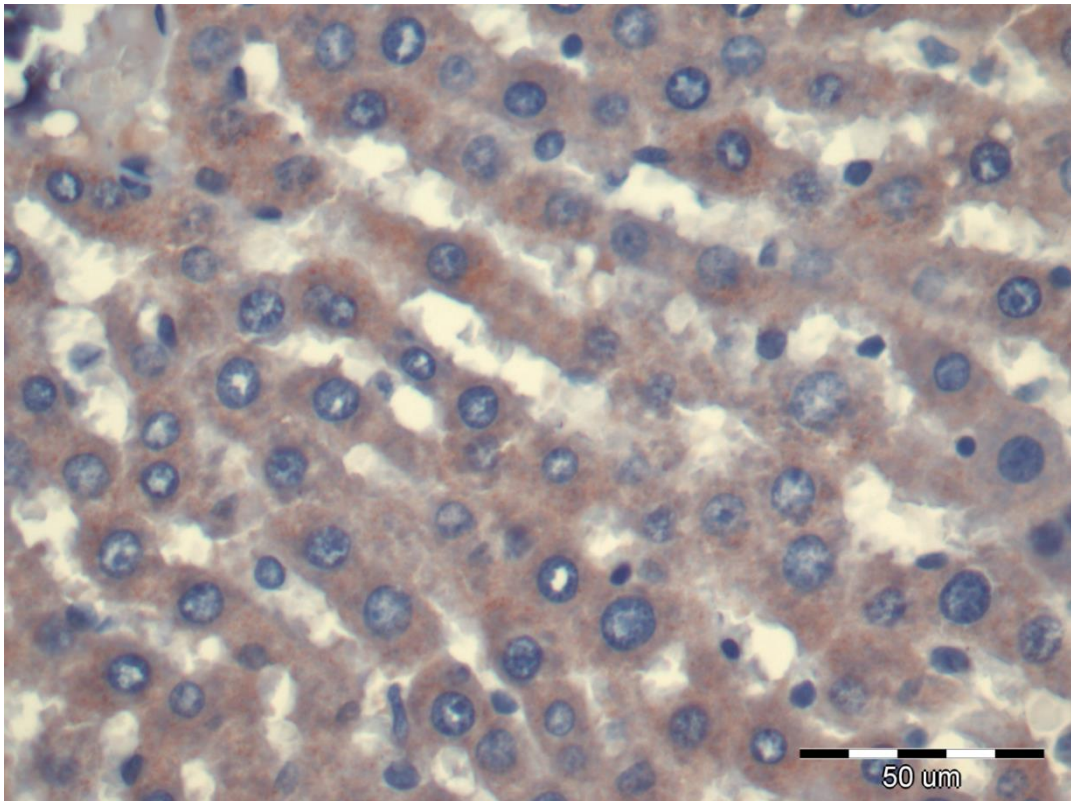


Wykres nr 9. Porównanie średniego pola powierzchni w μm^2 zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 8 w grupach kontrolnych.

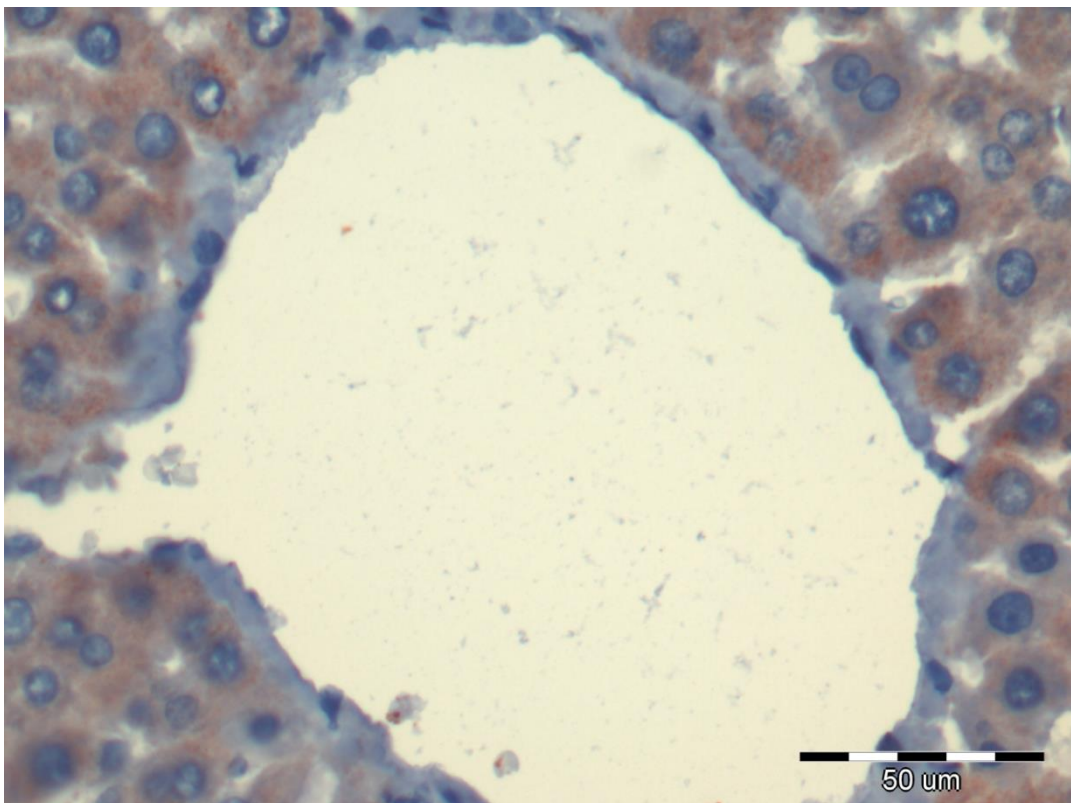
W grupach kontrolnych odczyn dla kaspazy 8 – 10 dnia ciąży był istotnie statystycznie większy niż w grupie samic ciężarnych 20 dnia ciąży, grupie samic nieciążarnych i 10 dni po okoceniu. 10 dnia po okoceniu był na takim samym poziomie jak u samic nieciążarnych ($p=0,80$).

GRUPY DOŚWIADCZALNE –dokumentacja fotograficzna

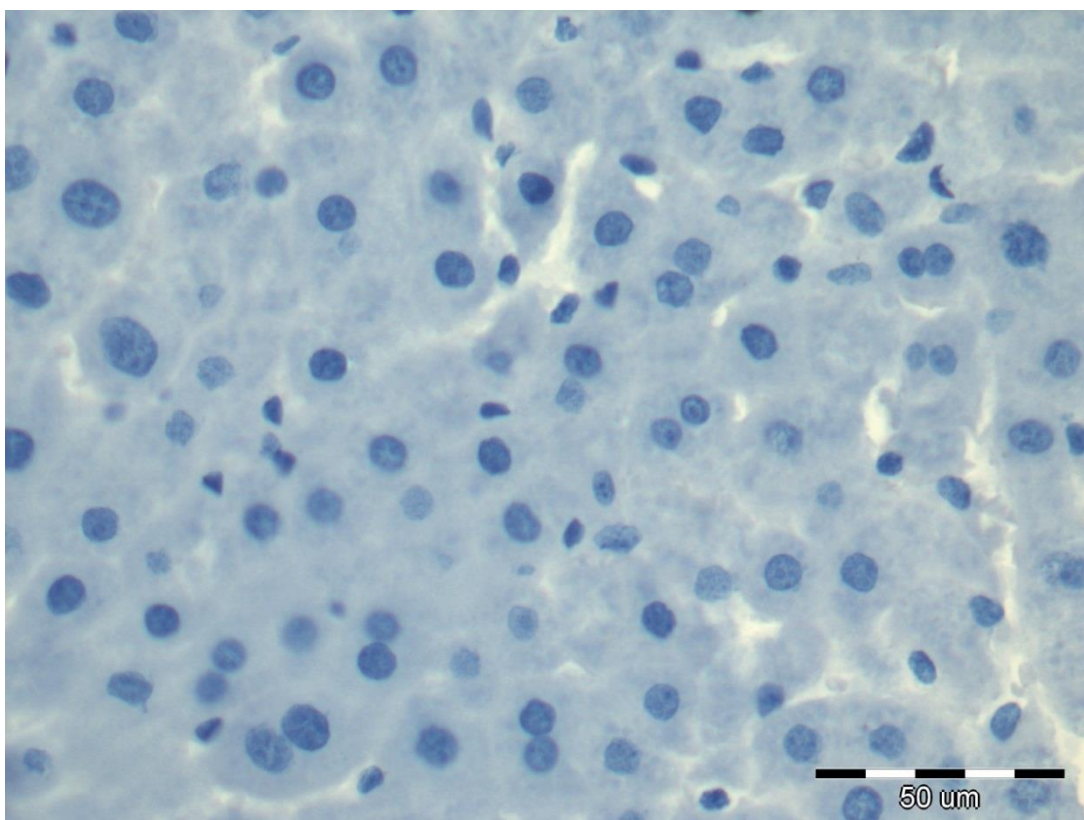
Barwny odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 8 obserwowany w komórkach wątroby samic z grup doświadczalnych był średnio lub słabo nasilony [Fot. nr 19, 20, 21]. W grupie samic badanych 10 dnia ciąży odczyn w oglądanych skrawkach wątroby był najbardziej intensywny. Ciemnoróżowe zabarwienie widoczne było w całej cytoplazmie jednak najbardziej wokół jąder komórkowych [Fot. nr 19]. Podobnie średnio nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 8 był w komórkach wątroby samic dekapitowanych 20 dnia ciąży [Fot. nr 20]. 10 dni po okoceniu w wątrobie samic odnotowano słaby, ogniskowy jedynie lekko różowy odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 8 [Fot. 21].



Fot. nr 19. GRUPA DOŚWIADCZALNA I. Średnio nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 8 we fragmencie wątroby ciężarnej samicy szczura oglądany 10 dnia ciąży. Barwienie H+AEC.



Fot. nr 20. GRUPA DOŚWIADCZALNA III. Średnio nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 8 we fragmencie wątroby ciężarnej samicy szczura oglądany 20 dnia ciąży widoczny w cytoplazmie hepatocytów, nieobecny w cytoplazmie komórek śródbłonna żyły centralnej. Barwienie H+AEC.



Fot. nr 21. GRUPA DOŚWIADCZALNA V. Slabo nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 8 we fragmencie wątroby ciężarnej samicy szczura oglądany 10 dnia po okoceniu. Barwienie H+AEC.

GRUPY DOŚWIADCZALNE – wyniki badań statystycznych

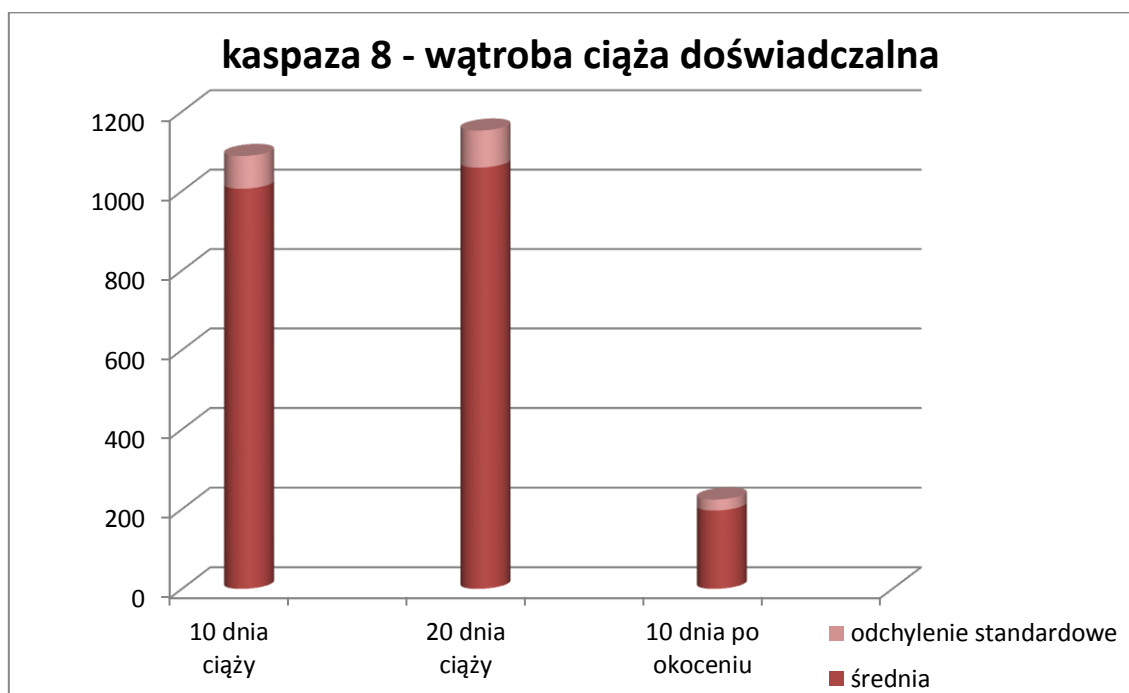
W grupach doświadczalnych przebadano łącznie 30 samic, którym podano L-argininę w fizjologicznej ciąży i 10 dni po okoceniu. Z każdej badanej wątroby pobierano po 3 wycinki, z których robiono preparaty. W każdym preparacie badano pole powierzchni w 3 miejscach. Łącznie w całym doświadczeniu przebadano 270 miejsc na preparatach pochodzących od samic z grup doświadczalnych.

CIAŻA DOŚWIADCZALNA	wątroba KASPAZA 8			One way ANOVA
	I	III	V	
Średnia	1005,82	1059,04	196,5	P<0,001
Odchylenie standardowe	82,48	93,25	27,61	

Tabela nr 14. Średnie pole powierzchni w μm^2 zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 8 na badanej powierzchni: 781193,35 μm^2 w grupach doświadczalnych. Odchylenie standardowe i One Way ANOVA test.

CIAŻA DOŚWIADCZALNA	wątroba KASPAZA 8		
	I	III	V
I	X	X	X
III	P=0,37	X	X
V	P<0,001	P<0,001	X

Tabela nr 15. Istotność statystyczna różnic pomiędzy badanymi grupami doświadczalnymi w średnim polu powierzchni zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 8. Test t-studenta.



Wykres nr 10. Porównanie średniego pola powierzchni w μm^2 zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 8 w grupach doświadczalnych.

W grupach doświadczalnych odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 8, 10 i 20 dnia ciąży był statystycznie istotnie podobny. W tym okresie odczyn był istotnie bardziej nasilony niż opisywany 10 dnia po okoceniu. Nie było statystycznie istotnych różnic między grupą I i III (10 i 20 dnia ciąży) ($p=0,37$) (Tabela nr 14, 15. Wykres nr 10).

PORÓWNANIE GRUP KONTROLNYCH I DOŚWIADCZALNYCH – wyniki badań statystycznych

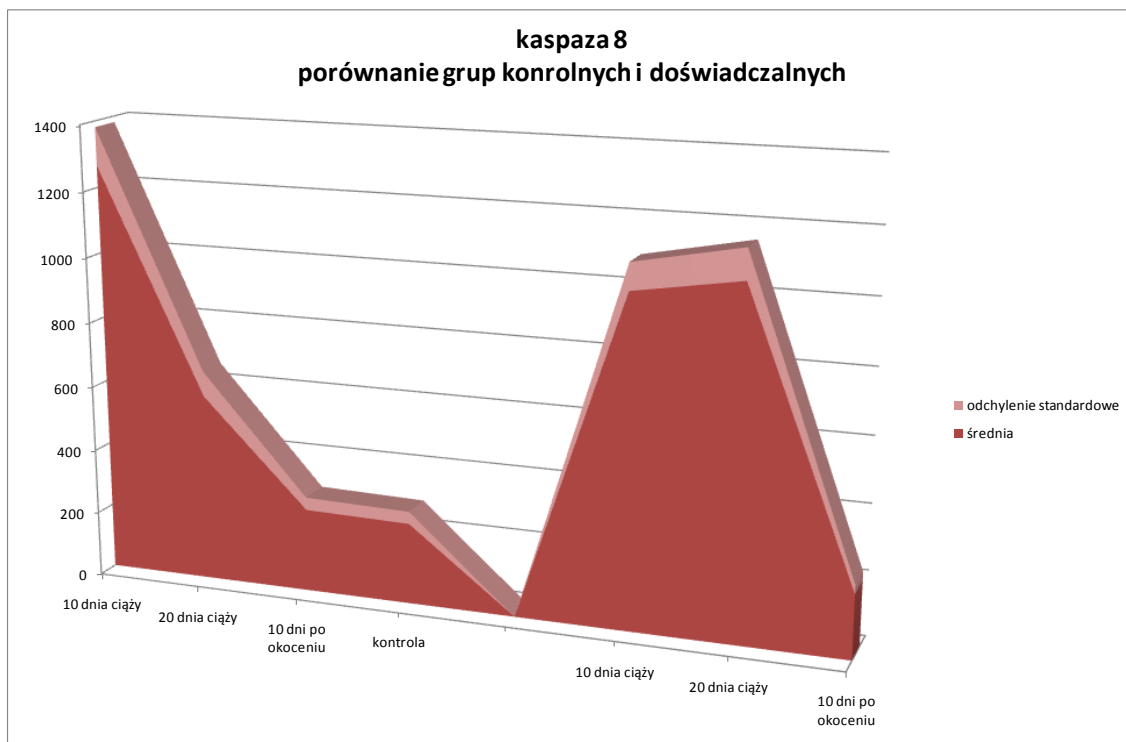
Różowy odczyn immunohistochemiczny w wątrobie badanych samic szczura z grup doświadczalnych w miejscach aktywności kaspazy 8 różnił się istotnie statystycznie od tego opisywanego grupach kontrolnych.

10 dnia ciąży był podobny i w kontroli i w grupie doświadczalnej ale 20 dnia wzrósł znacznie w grupie doświadczalnej w stosunku do grupy samic w fizjologicznej ciąży.

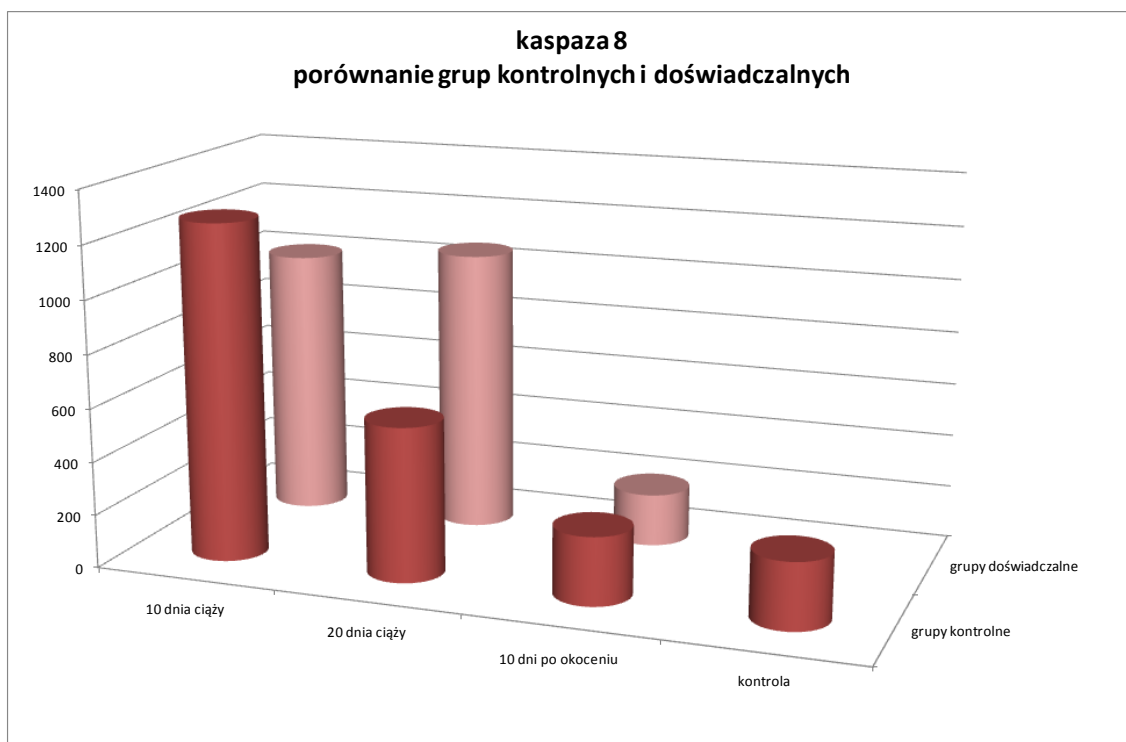
W grupach doświadczalnych 10 dnia po okoceniu odczyn dla kaspazy 8 był podobny do tego opisywanego 10 dnia po okoceniu w grupach kontrolnych oraz do tego opisywanego w grupie samic nieciążarnych (Tabela nr 16. Wykres nr 11, 12).

CIAŻA DOŚWIADCZALNA	CIAŻA KONTROLNA			
	II	IV	VI	VII
I	P=0,005	P<0,001	P<0,001	P<0,001
III	P=0,01	P<0,001	P<0,001	P<0,001
V	P<0,001	P=0,0001	P=0,027	P=0,038

Tabela nr 16. Istotność statystyczna różnic pomiędzy badanymi grupami kontrolnymi i doświadczalnymi w średnim polu powierzchni zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 8. Test t-studenta.



Wykres nr 11. Porównanie średniego pola powierzchni w μm^2 zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 8 w grupach kontrolnych (strona lewa) i doświadczalnych (strona prawa).



Wykres nr 12. Porównanie średniego pola powierzchni w μm^2 zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 8 w grupach kontrolnych i doświadczalnych.

5.6.3. KASPAZA 9

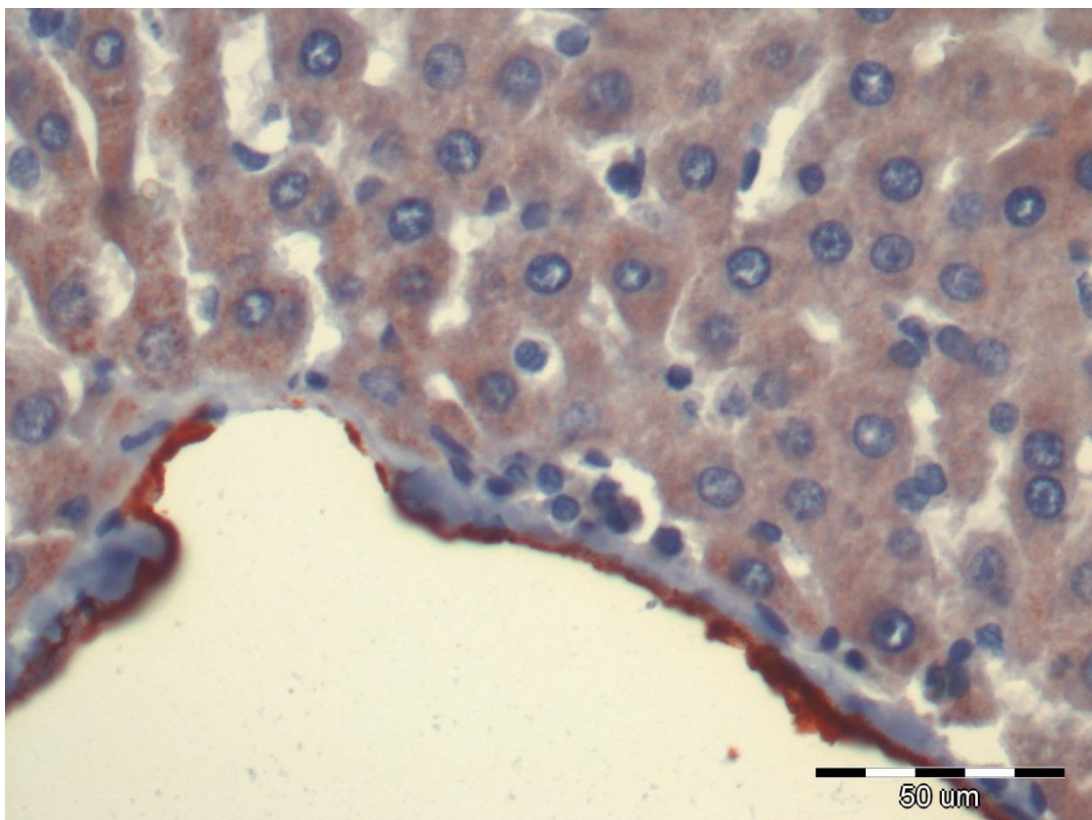
GRUPY KONTROLNE –dokumentacja fotograficzna

W cytoplazmie komórek badanej wątroby samic szczura z grup kontrolnych obserwowano różowo-czerwony odczyn immunohistochemiczny. Zabarwienie pojawiło się w miejscach aktywności kaspazy 9 [Fot. nr 22, 23, 24, 25].

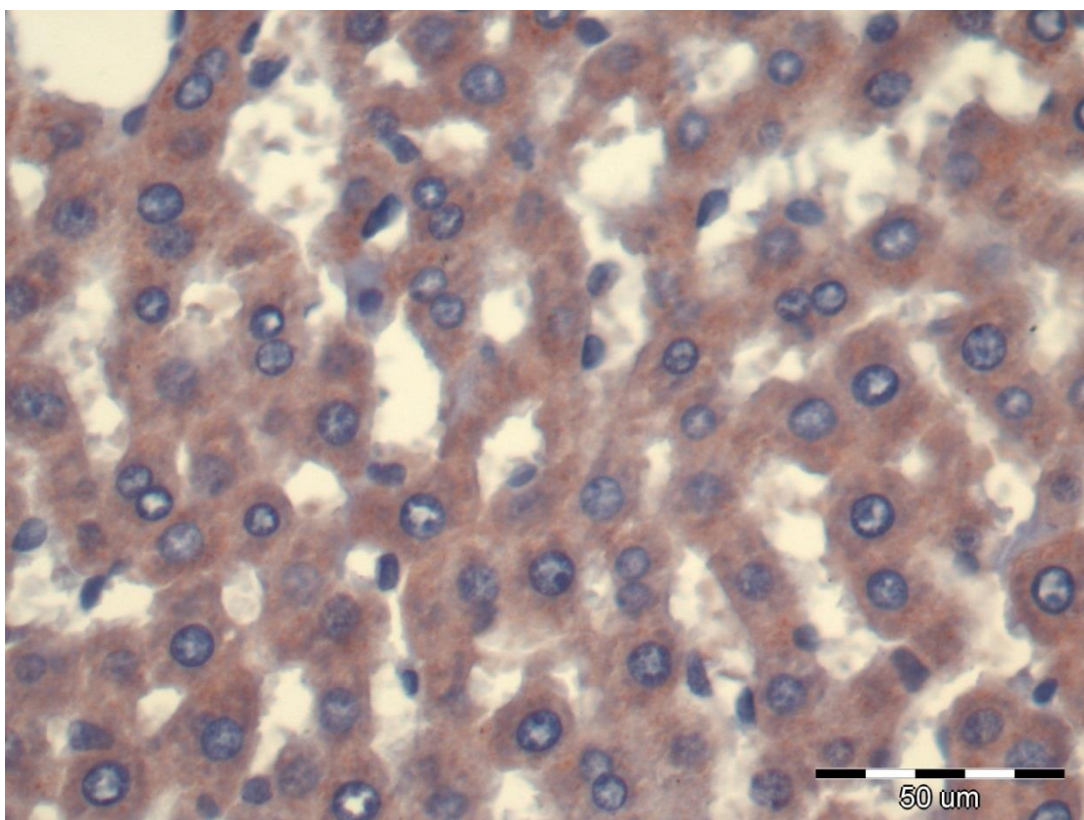
Bardzo intensywny odczyn zaobserwowano w wątrobie samic ciężarnych badanych 10 dnia ciąży. Opisywany tam odczyn dotyczył całej cytoplazmy hepatocytów, choć najsilniejszy był wokół jąder komórkowych. Wypełniał również cytoplazmę komórek śródbłonka żył centralnych [Fot. nr 22]

Porównywalnie silny barwny odczyn immunohistochemiczny pojawił się również w cytoplazmie hepatocytów wątroby samic dekapitowanych 20 dnia ciąży. Wypełniał on cytoplazmę komórek wątrobowych w miarę równomiernie [Fot. nr 23].

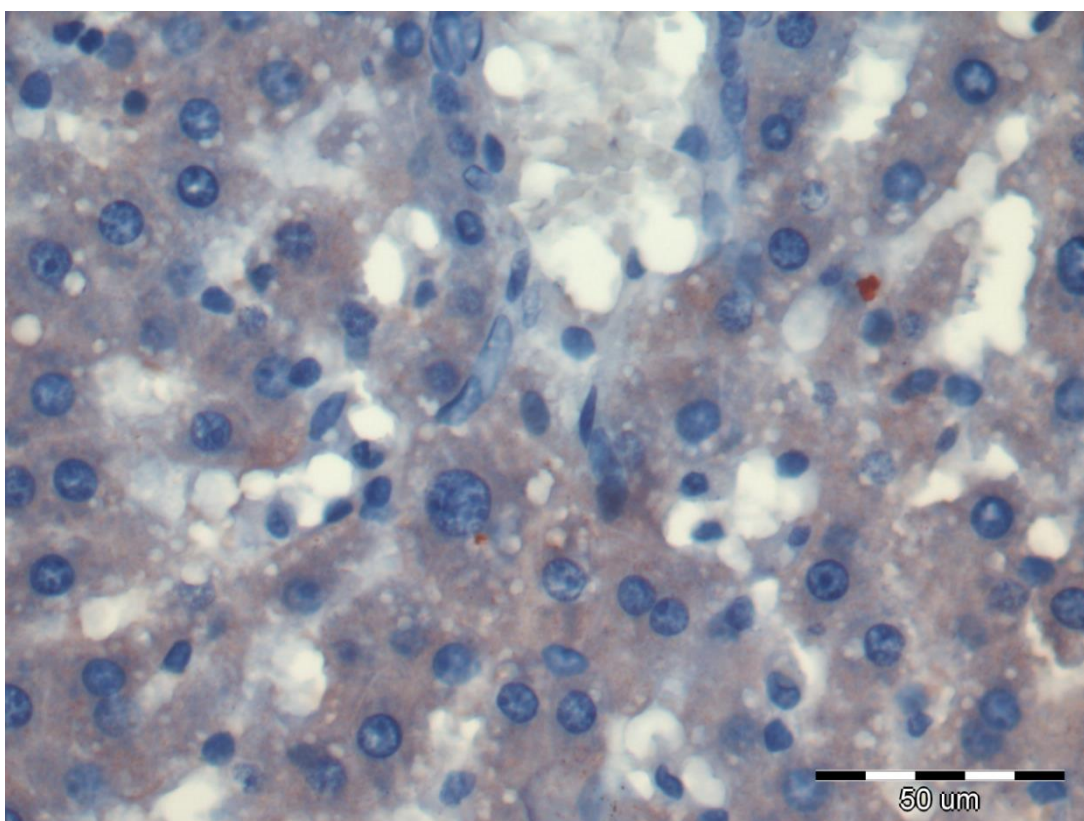
Średnio nasilona barwa jasnorożowa w miejscach lokalizacji kaspazy 9 w cytoplazmie komórek wątroby obserwowana była w wątrobie samic 10 dni po okoceniu i samic nieciężarnych [Fot. nr 24, 25].



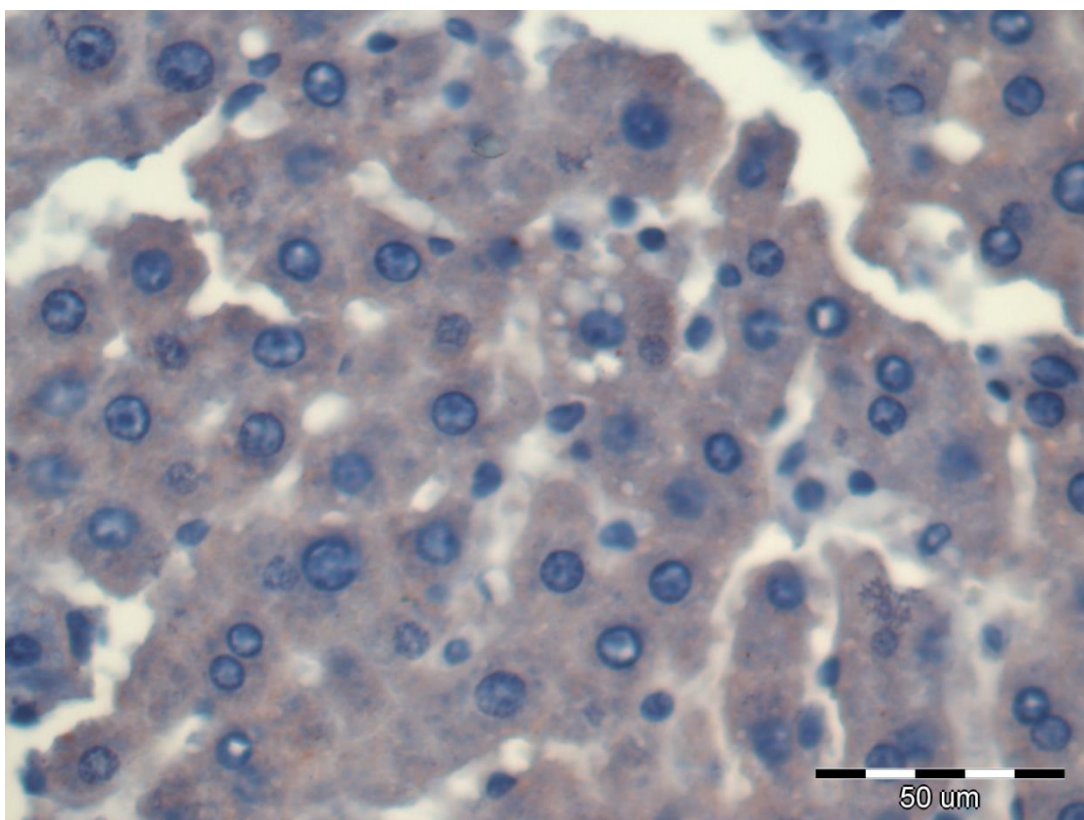
Fot. nr 22. GRUPA KONTROLNA II. Fragment wątroby ciężarnej samicy szczura oglądany 10 dnia ciąży. Nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 9. Barwienie H+AEC.



Fot. nr 23. GRUPA KONTROLNA IV. Fragment wątroby ciężarnej samicy szczura oglądany 20 dnia ciąży. Nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 9. Barwienie H+AEC.



Fot. nr 24. GRUPA KONTROLNA VI. Fragment wątroby samicy szczura oglądany 10 dnia po okoceniu. Średnio nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 9. Barwienie H+AEC.



Fot. nr 25. GRUPA KONTROLNA VII. Fragment wątroby nieciążarnej samicy szczura. Średnio nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 9. Barwienie H+AEC.

GRUPY KONTROLNE – wyniki badań statystycznych

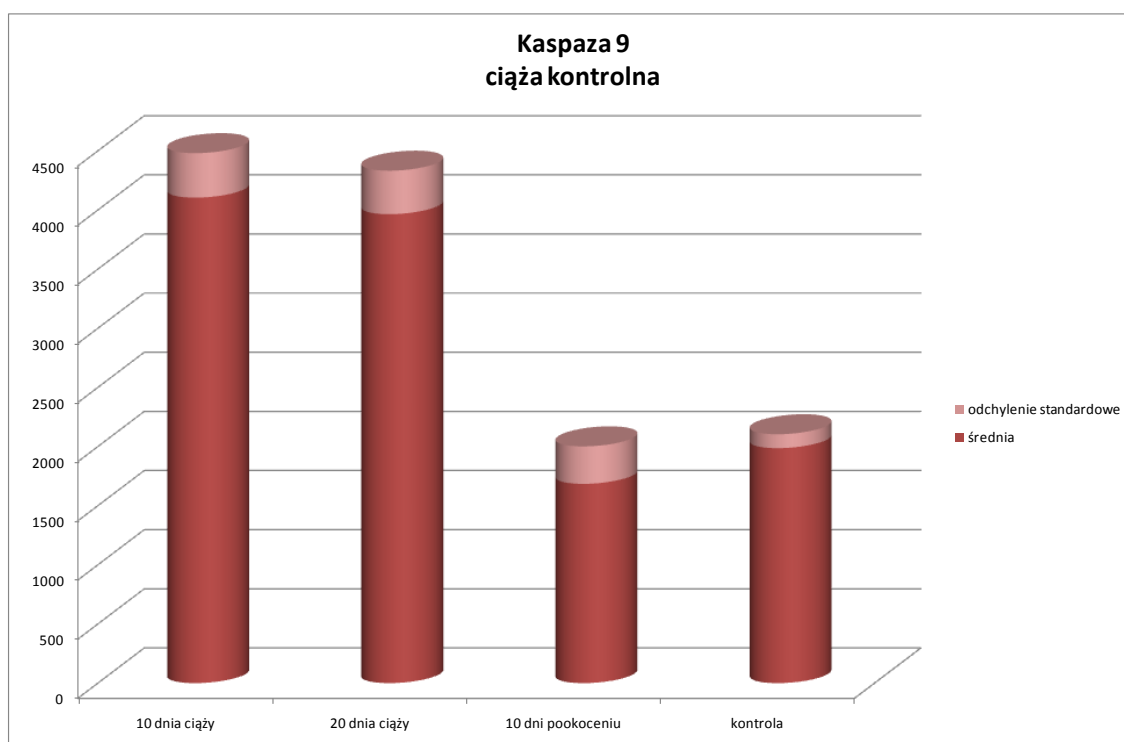
Przebadano wątroby 38 samic z grup kontrolnych. W każdym preparacie badano 3 losowo wybrane pola powierzchni. Z każdej badanej wątroby pobierano po 3 wycinki. Łącznie w grupach kontrolnych przebadano 342 miejsca.

KONTROLA	Wątroba KASPAZA 9				One Way ANOVA
	Ciąża			K	
	II	IV	VI	VII	
Średnia	4104,46	3964,68	1684,58	1986,50	P<0,001
Odchylenie Standardowe	376,08	367,63	316,95	117,73	

Tabela nr 17. Średnie pole powierzchni w μm^2 zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 9 na badanej powierzchni: 781193,35 μm^2 w grupach kontrolnych. Odchylenie standardowe i One Way ANOVA test.

Kontrola	Wątroba KASPAZA 9			
	II	IV	VI	VII
II	X	X	X	X
IV	P=0,50	X	X	X
VI	P<0,001	P<0,001	X	X
VII	P<0,001	P<0,001	P=0,045	X

Tabela nr 18. Istotność statystyczna różnic pomiędzy badanymi grupami kontrolnymi w średnim polu powierzchni zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 9. Test t-studenta.



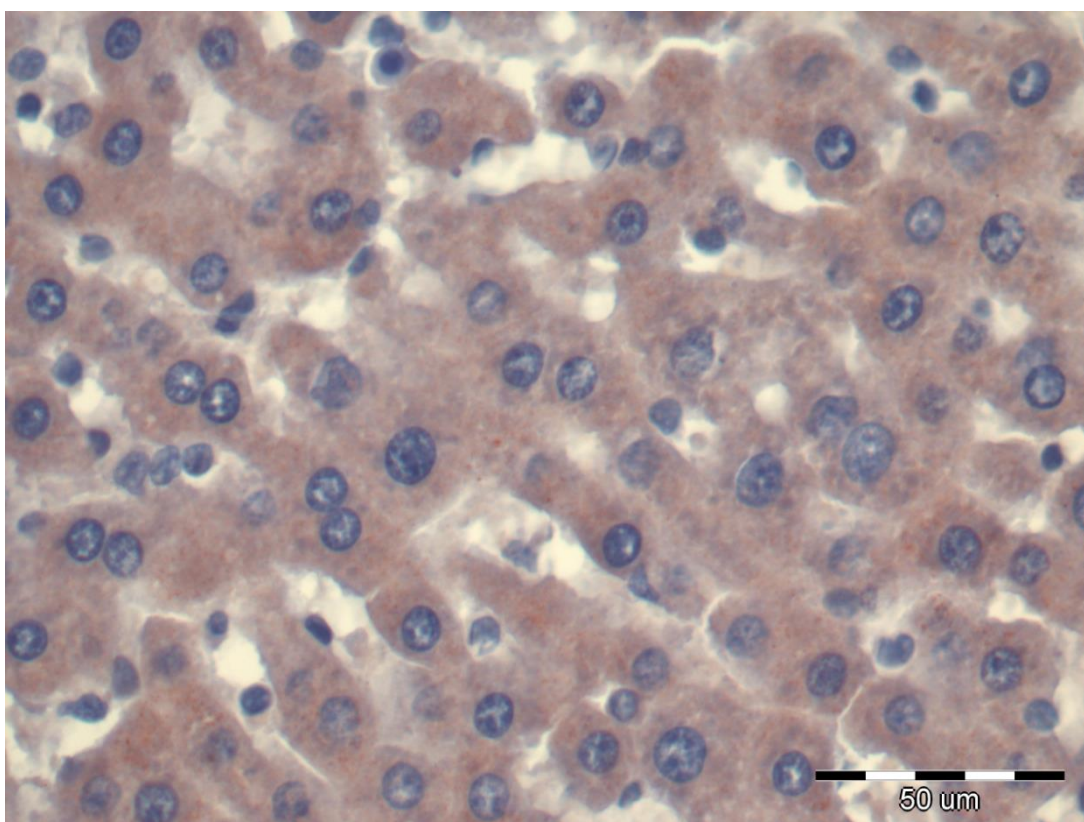
Wykres nr 13. Porównanie średniego pola powierzchni w μm^2 zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 9 w grupach kontrolnych.

W grupach kontrolnych odczyn dla kaspazy 9 – 10 i 20 dnia ciąży był istotnie statystycznie większy niż w grupie samic nieciążarnych i 10 dni po okoceniu. 10 dnia ciąży był na takim samym poziomie jak 20 dnia ciąży ($p=0,50$). Nie było statystycznie istotnych różnic między grupą kontrolną i 10 dni po okoceniu ($p=0,045$) (Tab. nr 17, 18. Wykres nr 13).

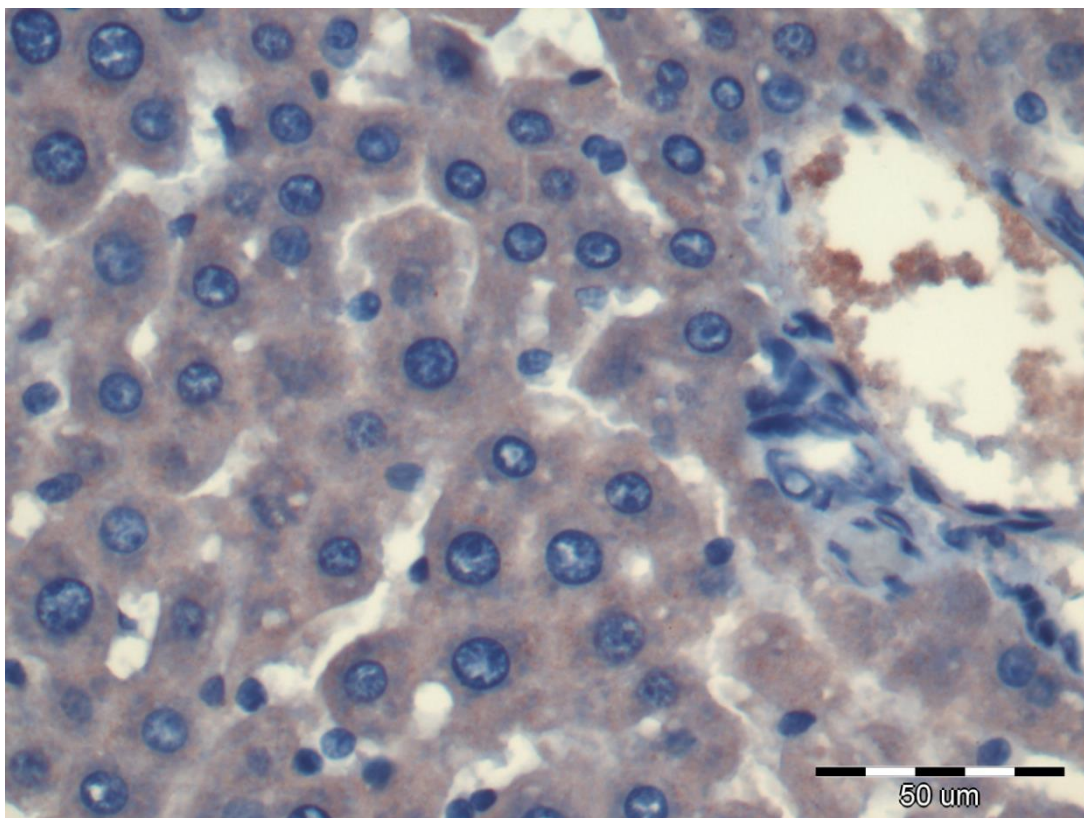
GRUPY DOŚWIADCZALNE –dokumentacja fotograficzna

Najbardziej nasilony barwny odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 9 obserwowano w hepatocytach samic szczura, którym podano L-argininę i badano 10 dnia ciąży. Odczyn nierównomiernie wypełniał niemal całą cytoplazmę komórek wątroby [Fot. nr 26].

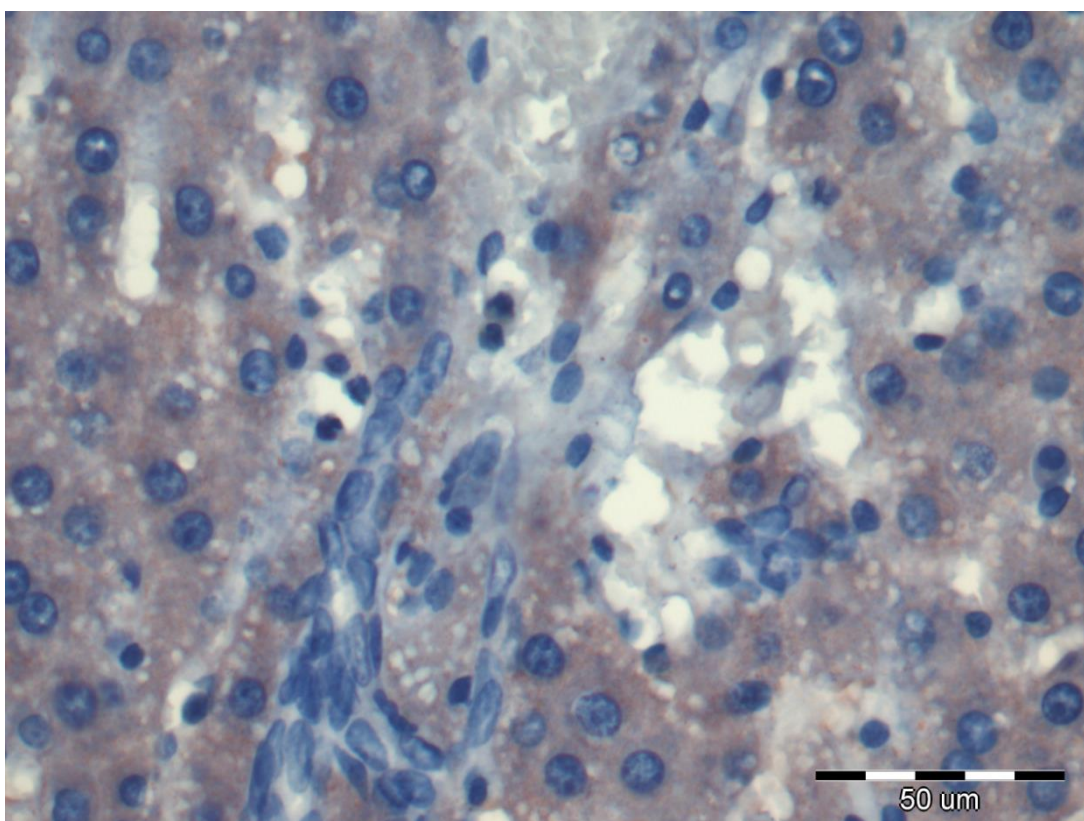
Odczyn różowy o średnim nasileniu widoczny był w cytoplazmie komórek wątroby pochodzącej od samic z grup doświadczalnych badanych 20 dnia ciąży i 10 dnia po okoceniu [Fot. nr 27, 28].



Fot. nr 26. GRUPA DOŚWIADCZALNA I. Fragment wątroby ciężarnej samicy szczura oglądany 10 dnia ciąży. Nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 9. Barwienie H+AEC.



Fot. nr 27. GRUPA DOŚWIADCZALNA III. Fragment wątroby ciężarnej samicy szczura oglądany 20 dnia ciąży. Średnio nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 9. Barwienie H+AEC.



Fot. nr 28. GRUPA DOŚWIADCZALNA V. Fragment wątroby samicy szczura oglądany 10 dnia po okoceniu. Średnio nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 9. Barwienie H+AEC.

GRUPY DOŚWIADCZALNE– wyniki badań statystycznych

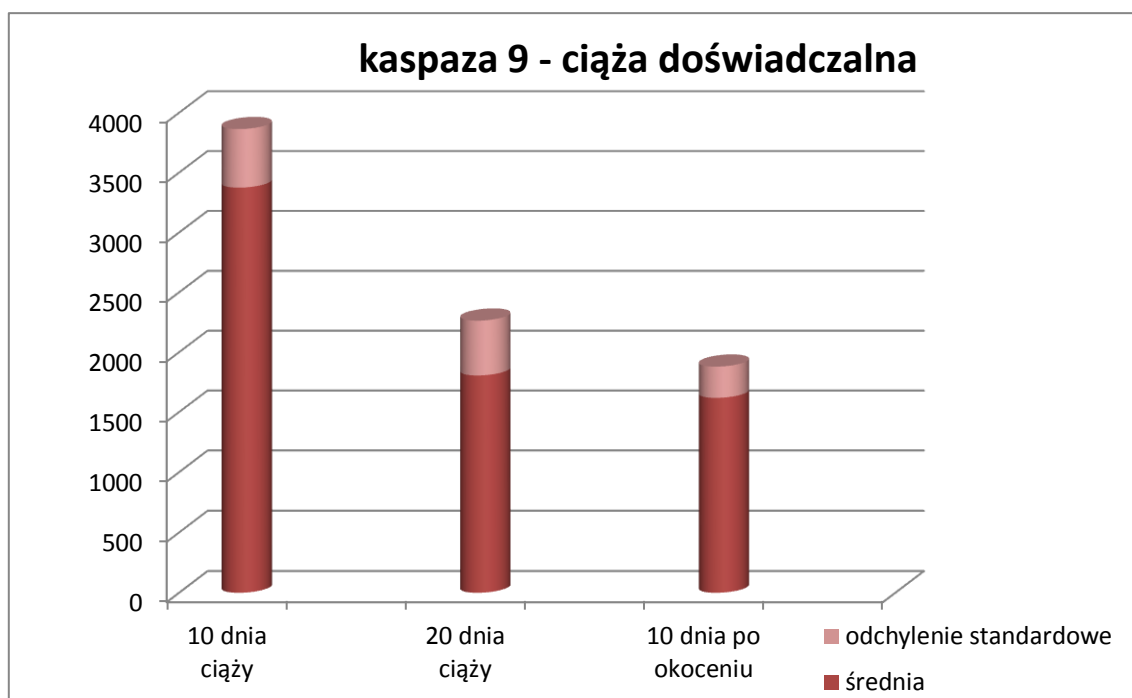
W celu obiektywnej, statystycznej oceny rozległości i intensywności odczynu immunohistochemicznego dla kaspazy 9 w komórkach wątroby samic z grup doświadczalnych przebadano 270 miejsc na preparatach. Z wątroby pobranej od każdej samicy analizowano 3 wycinki, z których zrobiono preparaty, a na nich obliczano pole powierzchni zajmowanej przez odczyn w 3 losowo wybranych miejscach.

CIAŻA DOŚWIADCZALNA	wątroba KASPAZA 9			One Way ANOVA
	I	III	V	
średnia	3374,60	1805,63	1618,36	P<0,001
Odchylenie standardowe	489,26	458,04	261,14	

Tabela nr 19. Średnie pole powierzchni w μm^2 zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 9 na badanej powierzchni: 781193,35 μm^2 w grupach doświadczalnych. Odchylenie standardowe i One Way ANOVA test.

CIAŻA DOŚWIADCZALNA	wątroba KASPAZA 9		
	I	III	V
I	X	X	X
III	P<0,001	X	X
V	P<0,001	P=0,37	X

Tabela nr 20. Istotność statystyczna różnic pomiędzy badanymi grupami doświadczalnymi w średnim polu powierzchni zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 9. Test t-studenta.



Wykres nr 14. Porównanie średniego pola powierzchni w μm^2 zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 3 w grupach doświadczalnych.

W grupach doświadczalnych odczyn dla kaspazy 9, 10 dnia ciąży był najwyższy i istotnie statystycznie wyższy opisywanego 20 dnia ciąży ($p < 0,001$). Tego dnia utrzymywał się na poziomie porównywalnym z tym opisywanym 10 dnia po okoceniu ($p = 0,37$) [Tabela nr 19, 20. Wykres nr 14].

PORÓWNANIE GRUP KONTROLNYCH I DOŚWIADCZALNYCH – wyniki badań statystycznych

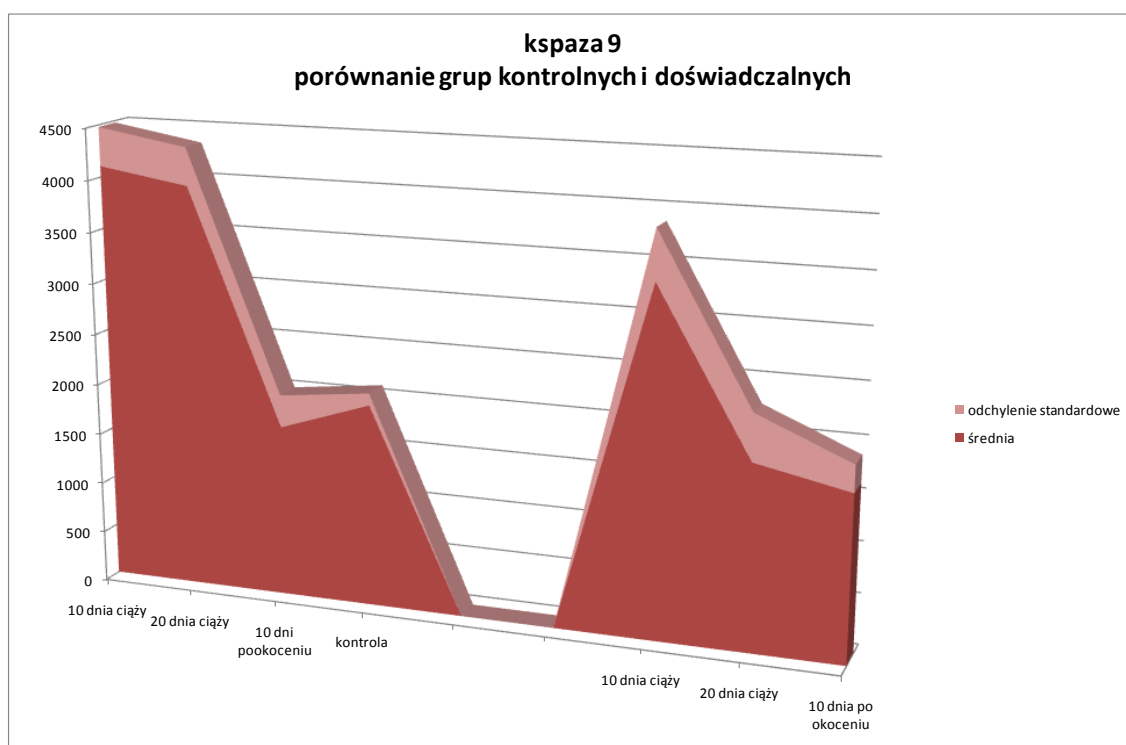
Odczyn dla kaspazy 9 pod wpływem NO zmniejszył się istotnie statystycznie w stosunku do kontroli już 10 dnia ciąży.

20 dnia ciąży również był istotnie statystycznie mniejszy w stosunku do obserwowanego w tym samym dniu w grupie kontrolnej. Utrzymywał się wtedy na poziomie porównywalnym z tym obserwowanym 10 dni po okoceniu w grupie kontrolnej oraz w grupie samic nieciążarnych.

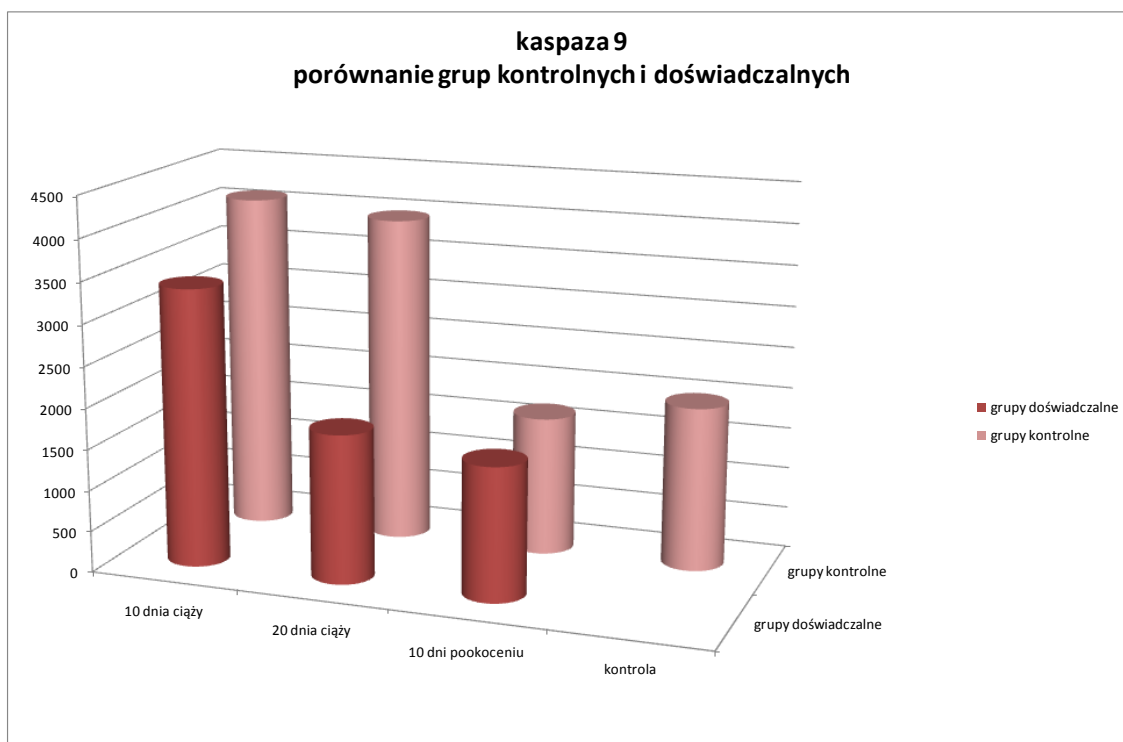
10 dnia po okoceniu odczyn dla kaspazy 9 był podobnie natężony w grupie kontrolnej i doświadczalnej oraz statystycznie istotnie mniejszy niż w grupie samic nieciążarnych (Tabela nr 21. Wykres nr 15, 16).

CIAŻA DOŚWIADCZALNA	CIAŻA KONTROLNA			
	II	IV	VI	VII
I	P=0,009	P=0,026	P<0,001	p=0,0002
III	P<0,001	P<0,001	P=0,58	p=0,35
V	P<0,001	P<0,001	P=0,68	P=0,009

Tabela nr 21. Istotność statystyczna różnic pomiędzy badanymi grupami kontrolnymi i doświadczalnymi w średnim polu powierzchni zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 9. Test t-studenta.



Wykres nr 15. Porównanie średniego pola powierzchni w μm^2 zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 9 w grupach kontrolnych i doświadczalnych.



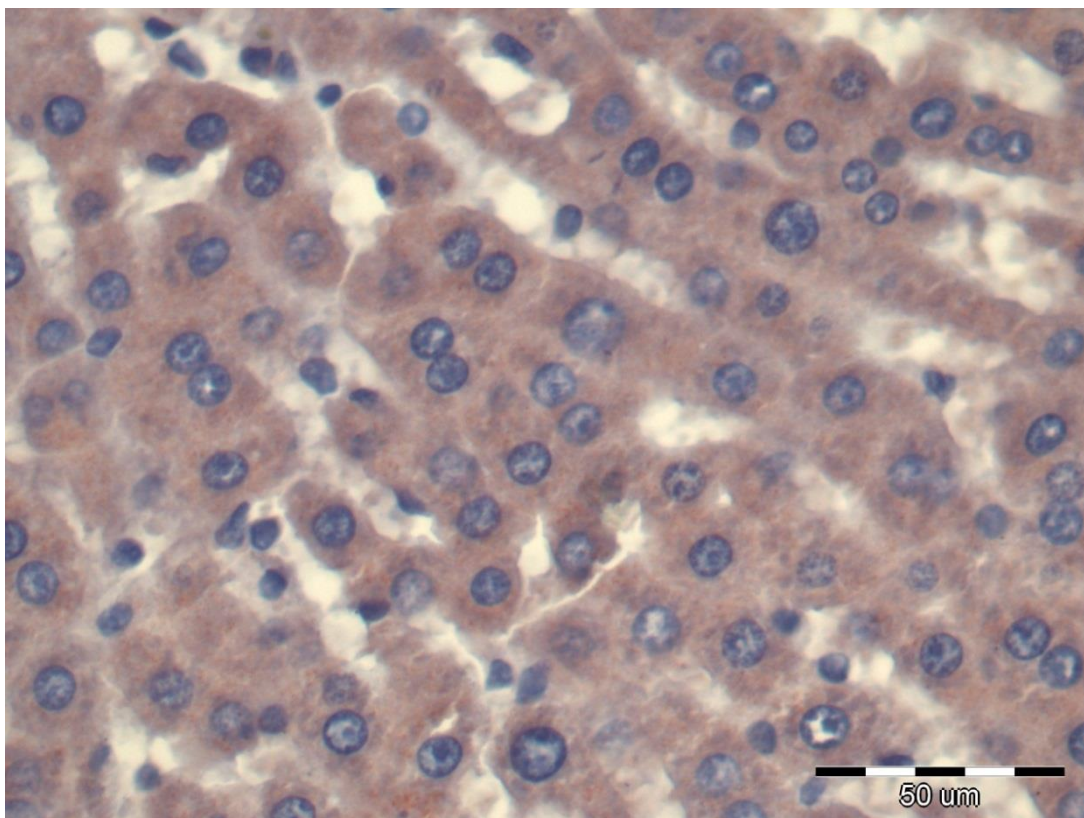
Wykres nr 16. Porównanie średniego pola powierzchni w μm^2 zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 9 w grupach kontrolnych i doświadczalnych.

5.6.4. KASPAZA 12

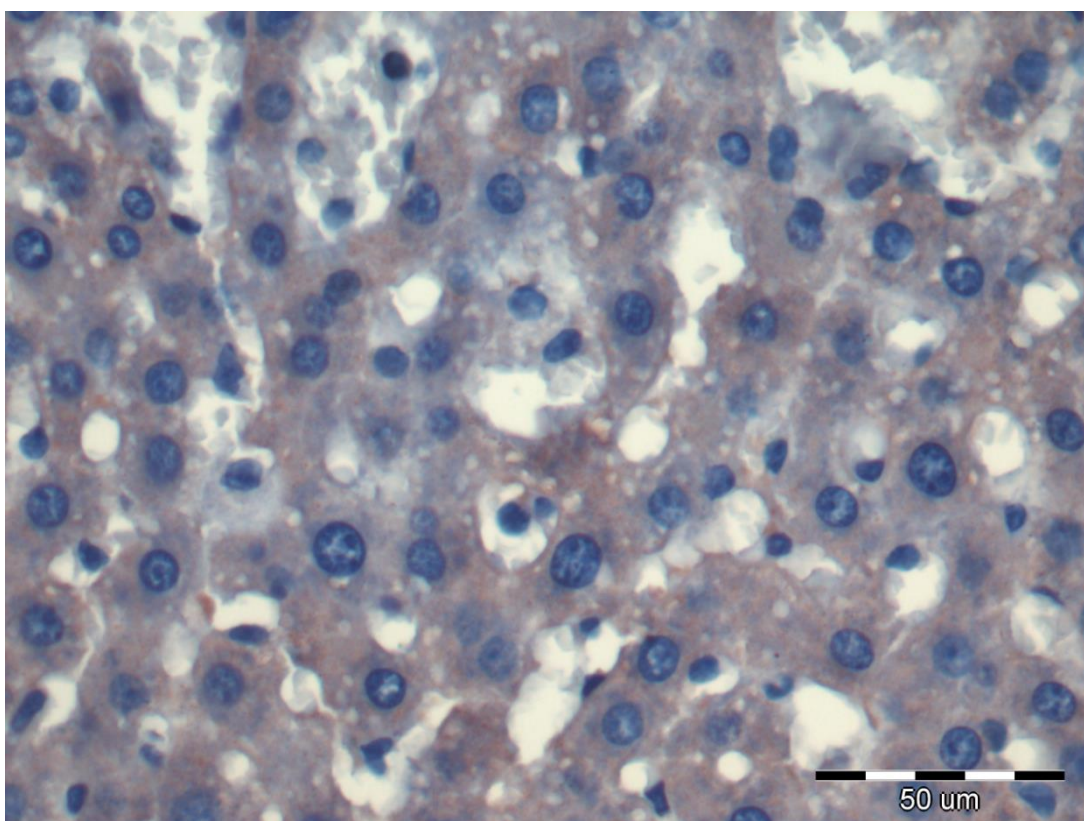
GRUPY KONTROLNE –dokumentacja fotograficzna

Średnio nasiloną różową barwę w cytoplazmie hepatocytów w miejscu reakcji antygen-przeciwciało (Kaspaza 12) obserwowano w wątrobie pochodzącej od samic badanych pod koniec fizjologicznej ciąży (20-tego dnia) [Fot. nr 30]. Odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 12 w postaci różowo-czerwonego zabarwienia był bardzo słabo nasilony w cytoplazmie hepatocytów wątroby samic szczura z kontrolnych grup samic badanych 10 dnia po okoceniu i samic nieciążarnych [Fot. nr 31, 32].

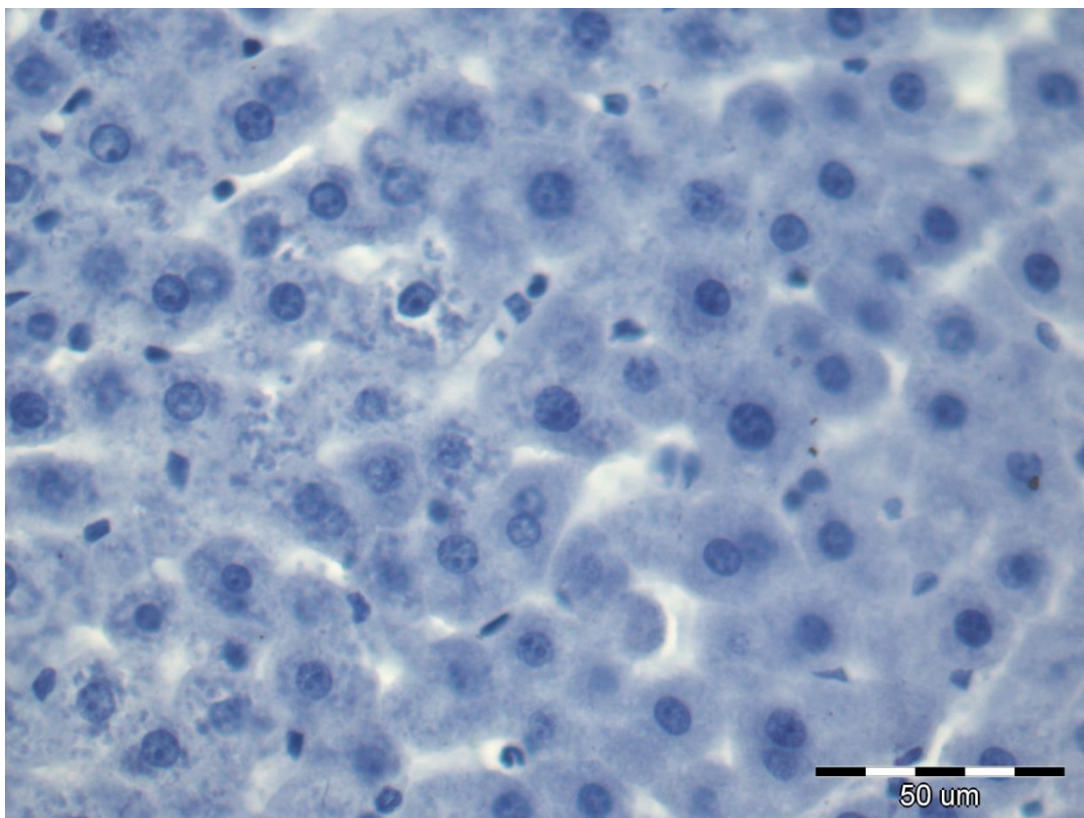
Intensywny odczyn immunohistochemiczny odnotowano w preparatach wątroby ciężarnych samic obserwowanych pod koniec pierwszego trymestru fizjologicznej ciąży (10-tego dnia) [Fot. nr 29].



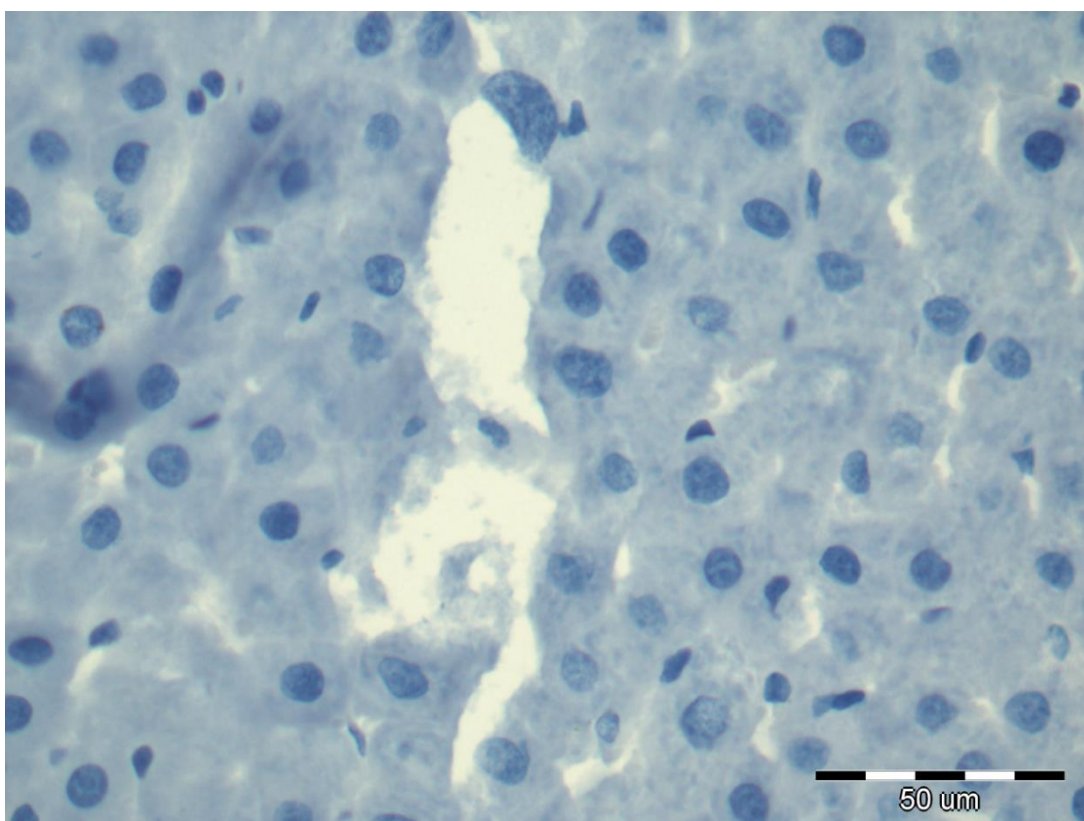
Fot. nr 29. GRUPA KONTROLNA II. Nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 12 we fragmencie wątroby ciężarnej samicy szczura badanej 10 dnia ciąży. Barwienie H+AEC.



Fot. nr 30. GRUPA KONTROLNA IV. Średnio nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 12 we fragmencie wątroby ciężarnej samicy szczura badanej 20 dnia ciąży. Barwienie H+AEC.



Fot. nr 31. GRUPA KONTROLNA VI. Słabo nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 12 we fragmencie wątroby ciężarnej samicy szczura badanej 10 dnia po okoceniu. Barwienie H+AEC.



Fot. nr 32. GRUPA KONTROLNA VII. Słabo nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 12 we fragmencie wątroby nieciężarnej samicy szczura. Barwienie H+AEC.

GRUPY KONTROLNE – wyniki badań statystycznych

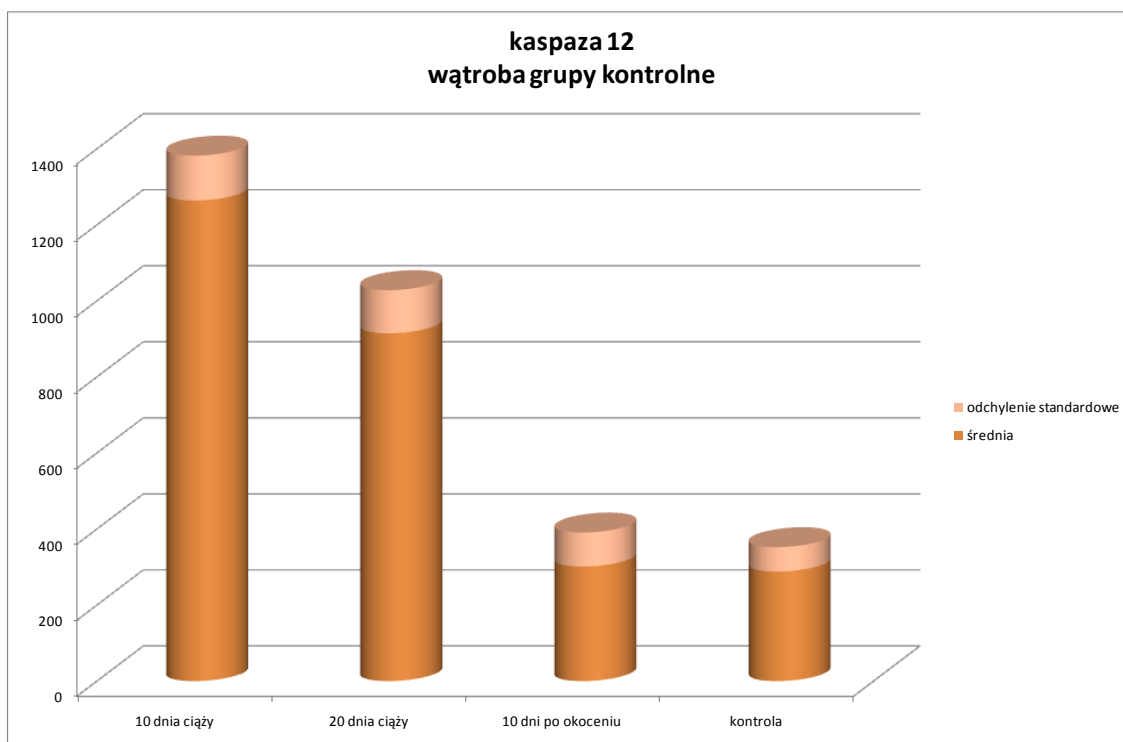
Przeanalizowano 342 miejsca w preparatach pochodzących z wątroby samic z grup kontrolnych. Z każdej wątroby pobierano po 3 wycinki, a na powstałych z nich preparatach oglądano po 3 miejsca.

KONTROLA	Wątroba KASPAZA 12				One Way ANOVA
	Cięża			K	
	II	IV	VI	VII	
Średnia	1264,16	914,89	301,38	288,04	P<0,001
Odchylenie Standardowe	117,91	113,42	89,32	64,26	

Tabela nr 22. Średnie pole powierzchni w μm^2 zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 12 na badanej powierzchni: $781193,35 \mu\text{m}^2$ w grupach kontrolnych. Odchylenie standardowe i One Way ANOVA test.

Kontrola	Wątroba KASPAZA 12			
	II	IV	VI	VII
II	X	X	X	X
IV	P=0,0002	X	X	X
VI	P<0,001	P<0,001	X	X
VII	P<0,001	P<0,001	P=0,77	X

Tabela nr 23. Istotność statystyczna różnic pomiędzy badanymi grupami kontrolnymi w średnim polu powierzchni zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 12. Test t-studenta.

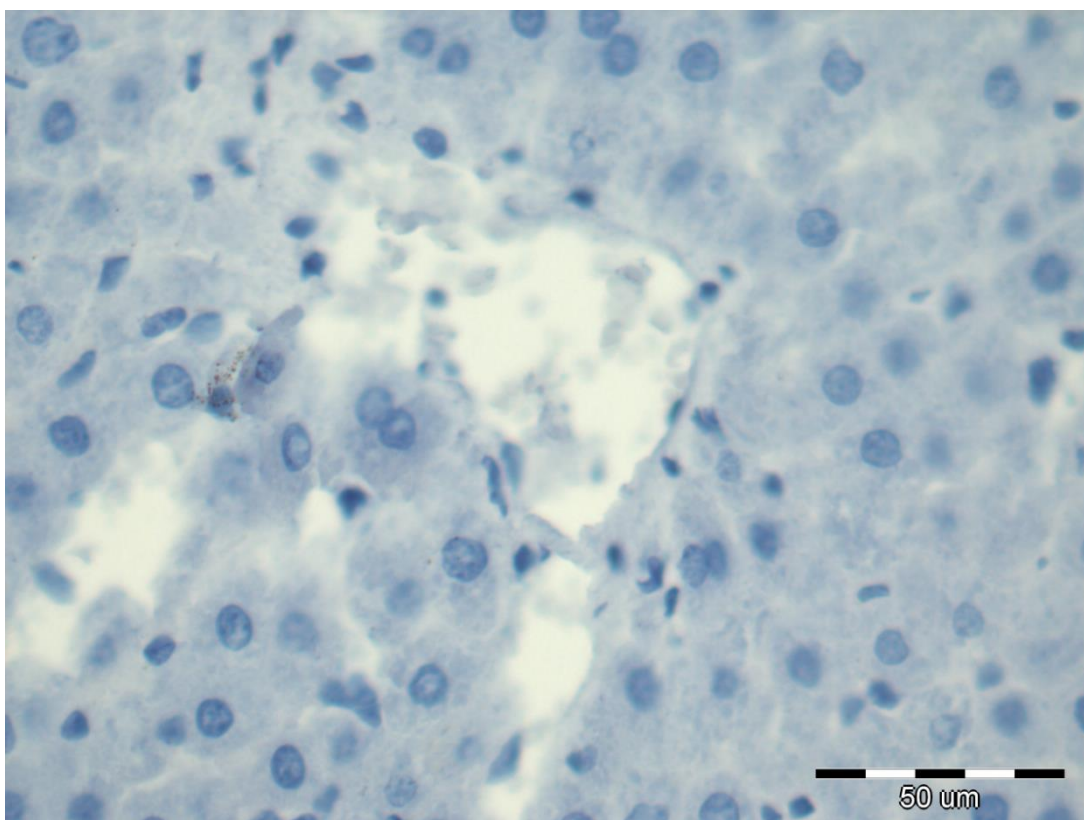


Wykres nr 17. Porównanie średniego pola powierzchni w μm^2 zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 12 w grupach kontrolnych.

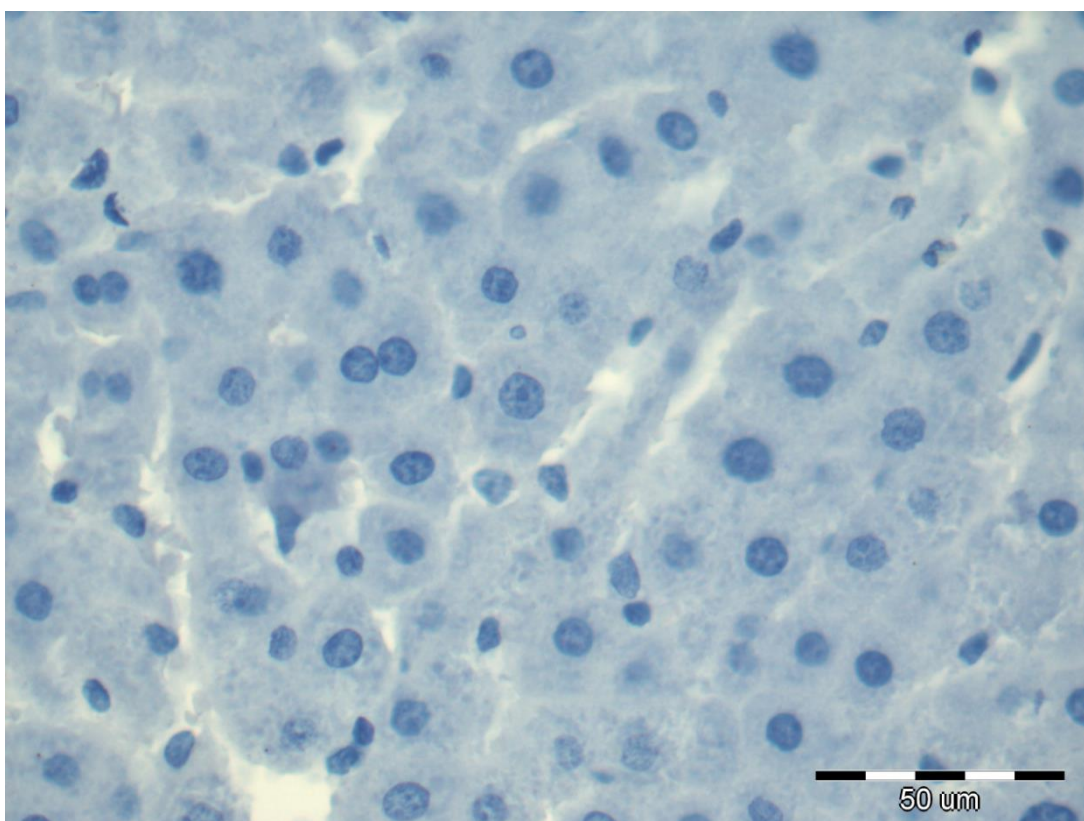
W grupach kontrolnych odczyn dla kaspazy 12 – 10 i 20 dnia ciąży był istotnie statystycznie większy niż w grupie samic nieciążarnych i 10 dni po okoceniu. 10 dnia ciąży był na poziomie wyższym niż 20 dnia ciąży. Nie było statystycznie istotnych różnic między grupą kontrolną i 10 dni po okoceniu ($p=0,77$) (Tabela nr 22, 23. Wykres nr 17).

GRUPY DOŚWIADCZALNE –dokumentacja fotograficzna

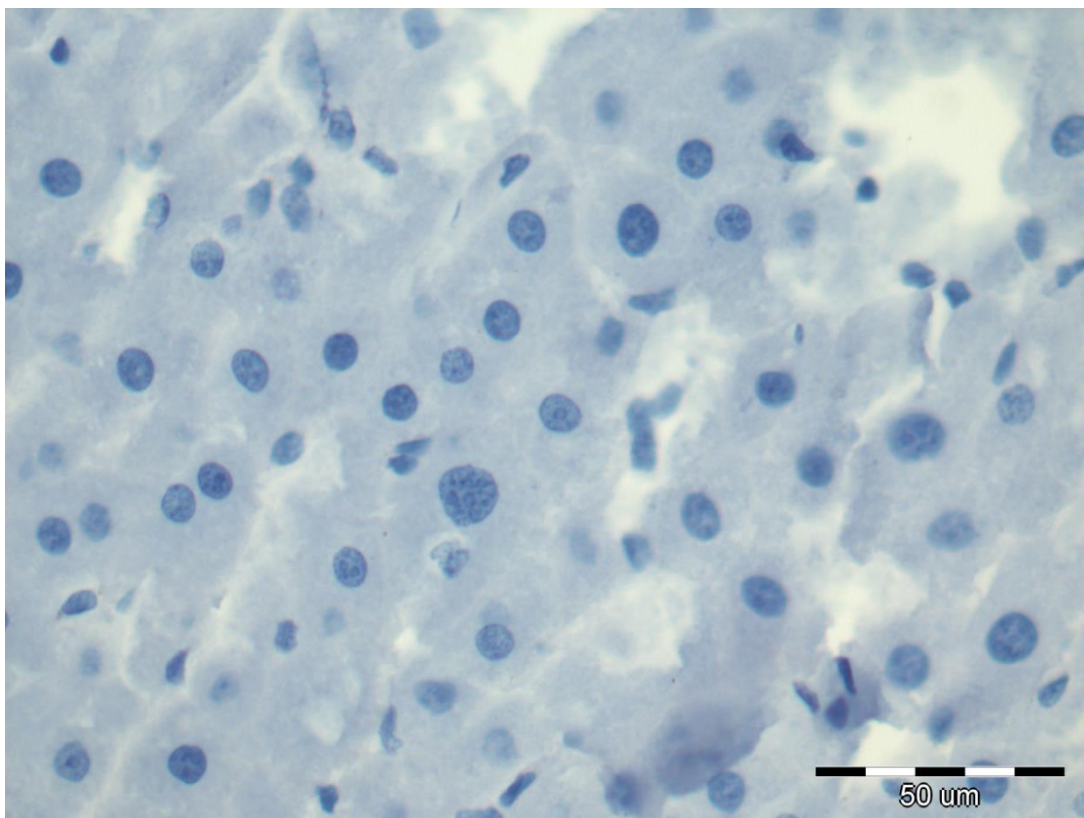
Na preparatach wątroby samic ciężarnych, którym podano L-argininę zaobserwowano słaby, jedynie lekko różowy odczyn immunohistochemiczny w cytoplazmie komórek wątroby w miejscu aktywnej kaspazy 12 [Fot. nr 33, 34, 35].



Fot. nr 33. GRUPA DOŚWIADCZALNA I. Słabo nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 12 we fragmencie wątroby ciężarnej samicy szczura badanej 10 dnia ciąży. Barwienie H+AEC.



Fot. nr 34. GRUPA DOŚWIADCZALNA III. Słabo nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 12 we fragmencie wątroby ciężarnej samicy szczura badanej 20 dnia ciąży. Barwienie H+AEC.



Fot. nr 35. GRUPA DOŚWIADCZALNA V. Słabo nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 12 we fragmencie wątroby nieciążarnej samicy szczura. Barwienie H+AEC.

GRUPY DOŚWIADCZALNE– wyniki badań statystycznych

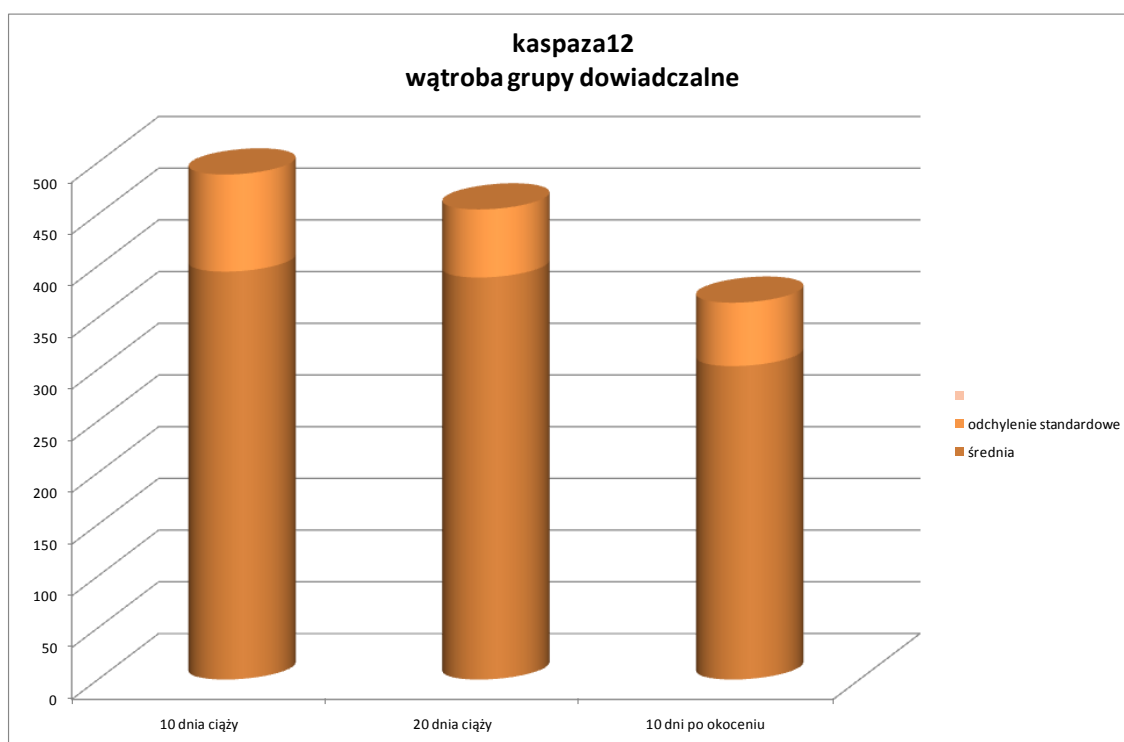
Na preparatach wątroby samic z grup doświadczalnych przebadano łącznie 270 miejsc. Z wątroby pobranej od każdej samicy analizowano 3 wycinki, z których zrobiono preparaty, a na nich obliczano pole powierzchni zajmowanej przez odczyn w 3 losowo wybranych miejscach.

CIAŻA DOŚWIADCZALNA	wątroba KASPAZA 12			One Way ANOVA
	I	III	V	
średnia	394,48	388,78	303,13	P=0,09
Odchylenie standardowe	93,94	65,86	61,32	

Tabela nr 24. Średnie pole powierzchni w μm^2 zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 12 na badanej powierzchni: $781193,35 \mu\text{m}^2$ w grupach doświadczalnych. Odchylenie standardowe i One Way ANOVA test.

CIAŻA DOŚWIADCZALNA	wątroba KASPAZA 12		
	I	III	V
I	X	X	X
III	P=0,91	X	X
V	P=0,08	P=0,04	X

Tabela nr 25. Test t-studenta – istotność statystyczna różnic pomiędzy badanymi grupami doświadczalnymi w średnim polu powierzchni zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 12.



Wykres nr 18. Porównanie średniego pola powierzchni w μm^2 zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 12 w grupach doświadczalnych.

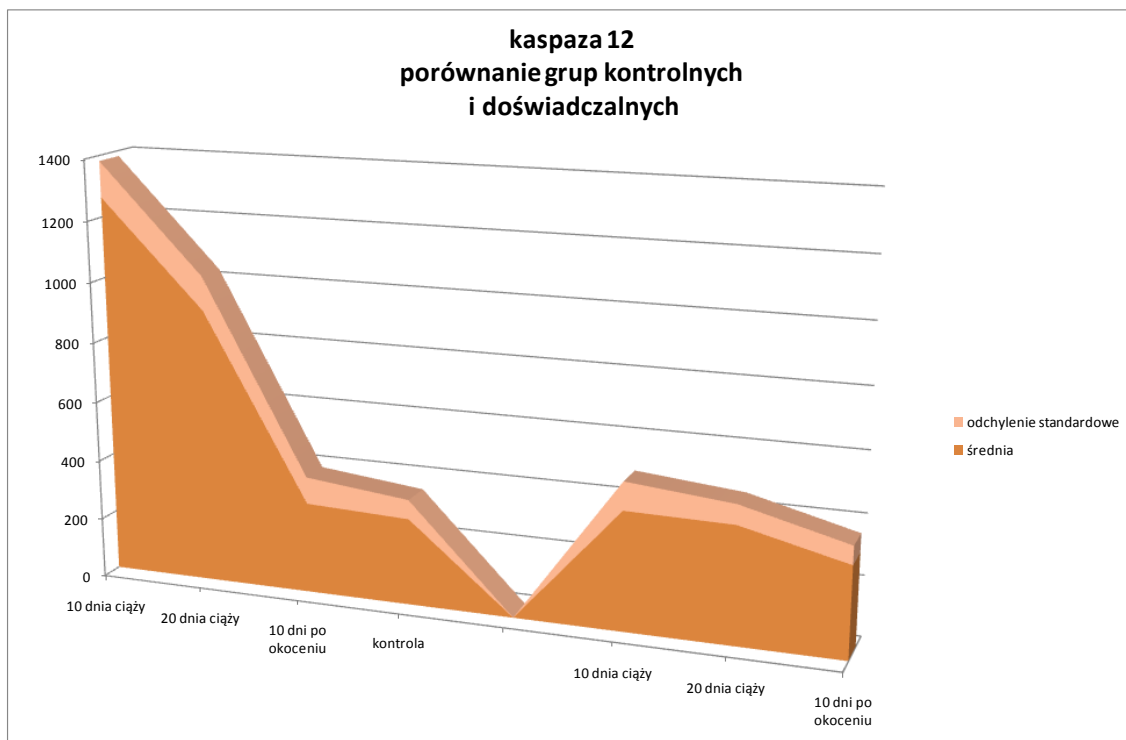
W grupach doświadczalnych odczyn dla kaspazy 12, 20 dnia ciąży był większy niż 10 dnia ciąży. Był on jednak na poziomie podobnym do tego opisywanego 10 dnia ciąży ($p=0,91$). 10 dni po okoceniu utrzymywał się na poziomie podobnym do opisywanego 10 dnia ciąży ($p=0,08$) (Tabela nr 24, 25. Wykres nr 18).

PORÓWNANIE GRUP KONTROLNYCH I DOŚWIADCZALNYCH – wyniki badań statystycznych

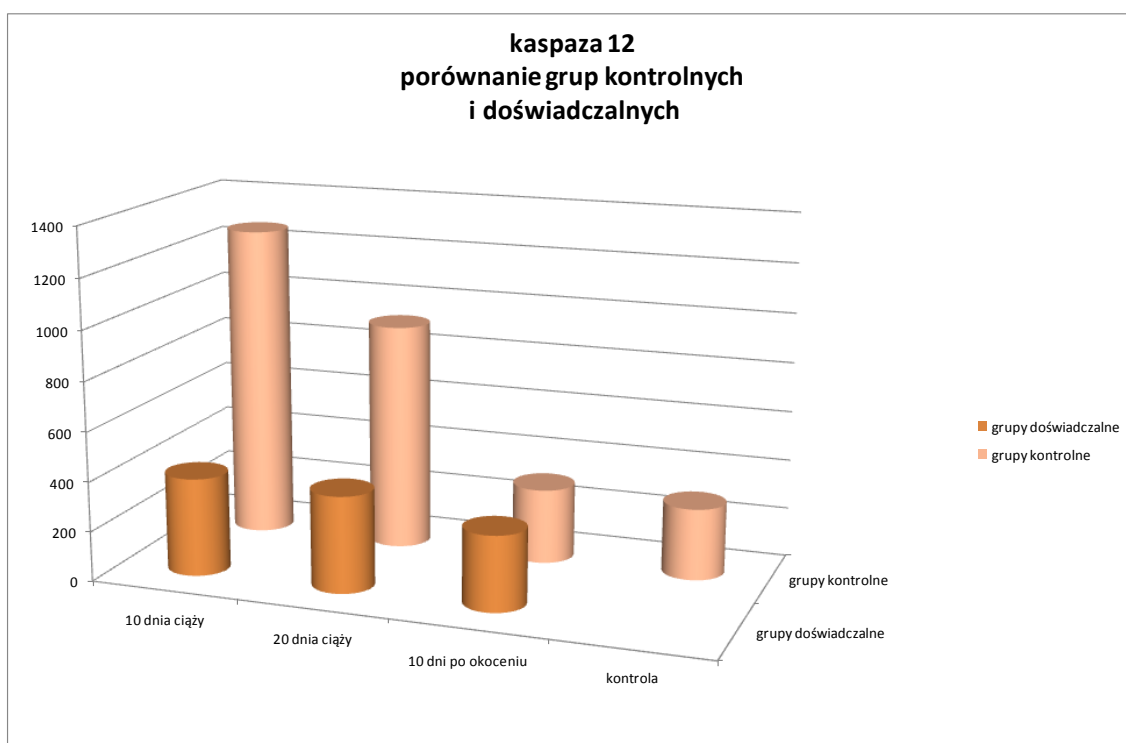
Odczyn dla kaspazy 12 w doświadczalnej ciąży zmniejszył się istotnie we wszystkich grupach w porównaniu z kontrolną grupą badaną 10 dnia ciąży. 20 dnia ciąży kontrolnej był na takim poziomie jak w odpowiadającej grupie doświadczalnej samic ciężarnych 20 dnia ciąży i 10 dni po okoceniu. 10, 20-tego dnia ciąży doświadczalnej oraz 10 dni po okoceniu odczyn dla kaspazy 12 był porównywalny do tego opisanego 10 dni po okoceniu samic grupy kontrolnej. Odczyn w grupie samic nieciążarnych był na takim samym poziomie jak 10 dnia ciąży doświadczalnej i 10 dni po okoceniu samic grupy doświadczalnej. Istotnie różnił się natomiast od odczynu opisywanego 20 dnia ciąży doświadczalnej (Tabela nr 26. Wykres nr 19, 20).

CIAŻA DOŚWIADCZALNA	CIAŻA KONTROLNA			
	II	IV	VI	VII
I	P=0,008	P=0,001	P=0,11	P=0,05
III	P=0,008	P=0,15	P=0,09	P=0,02
V	P=0,006	P=0,12	P=0,97	P=0,69

Tabela nr 26. test t-studenta – istotność statystyczna różnic pomiędzy badanymi grupami kontrolnymi i doświadczalnymi w średnim polu powierzchni zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 12.



Wykres nr 19. Porównanie średniego pola powierzchni w μm^2 zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 12 w grupach kontrolnych i doświadczalnych.



Wykres nr 20. Porównanie średniego pola powierzchni w μm^2 zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 12 w grupach kontrolnych i doświadczalnych.

6. OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ - DYSKUSJA

W przebiegu ciąży pojawiają się zmiany w funkcji wielu narządów, m.in. w układzie krążenia, oddechowym, pokarmowym, moczowym. Do zmian dochodzi także w gruczołach wydzielania wewnętrznego. Zmiany metaboliczne w ciąży są następstwem wysokich stężeń hormonów: 17-beta estradiolu, progesteronu, prolaktyny, laktogenu łożyskowego oraz przyrostu masy tkanki tłuszczowej (Zamłyński i wsp. 2005).

Adaptacja narządów wewnętrznych do zmian związanych z ciążą z pewnością prowadzi do uszkodzenia lub eliminacji komórek oraz do kierowania ich na drogę apoptozy. W niniejszym badaniu zaobserwowano, że fizjologiczna ciąża samic szczura była czynnikiem indukującym komórki wątroby matek do wzmożonej, apoptotycznej śmierci. Do podobnych wniosków lecz w odniesieniu do komórek nerki doszli w przeprowadzonym doświadczeniu Pedrycz i wsp. (Pedrycz i wsp. 2011).

Największe zmiany fizjologiczne związane są ze wzrostem objętości krwi krążącej. Wywołane są one głównie przez aldosteron, estrogeny i progesteron, których stężenie wzrasta podczas ciąży. Osocze krwi zwiększa swoją objętość o ok. 45%, natomiast masa erytrocytarna o ok. 20%, występuje zwiększenie aktywności układu krzepnięcia. Wzrost objętości krwi oraz przerost mięśnia serca zwiększają jego pojemność o 70-80 ml, co w rezultacie prowadzi do zmian w sposobie pracy serca. Działanie progesteronu powoduje rozszerzenie naczyń krwionośnych i zmniejszenie tętniczego oporu obwodowego o ok. 20% (Bręborowicz 2005).

Nerki są organem wcześniej reagującym zmianami w metabolizmie i morfologii komórek podczas ciąży (Bręborowicz 2010). Zmiany te dotyczą głównie miedniczek, których objętość zwiększa się z 10 ml do 60 ml oraz moczowodów, znacznie poszerzających się pod wpływem progesteronu. Zmiany te wpływają na zaleganie moczu w poszerzonych drogach moczowych. Dodatkowo powiększająca się macica w zaawansowanej ciąży uciska na moczowody, powodując zwolnienie przepływu moczu. Wraz ze wzrostem filtracji kłębuszkowej występuje upośledzenie pojemności resorpcyjnej cewek moczowych dla przesączonej glukozy prowadząc do glukozurii. Występujący białkomocz rzędu 200-300mg na dobę uznawany jest za fizjologiczny. Zmiany zachodzące w nerkach są jedną z przyczyn gestozy charakteryzującej się głównie nadciśnieniem tętniczym, obrzękami i białkomoczem (Bręborowicz 2010).

Wymiary i budowa histologiczna wątroby w czasie ciąży nie ulegają zmianie, jednak wyniki prób czynnościowych świadczą o upośledzeniu jej czynności metabolicznej w postaci gorszego wydalania produktów przemiany komórki wątroby i gorszego odpływu żółci. Z uwagi na wysoki poziom estrogenów podczas ciąży może dochodzić do zastoju żółci (Rytlewski 2008). Nieprawidłowe wyniki testów wątrobowych spotyka się u około 3-5% ciężarnych (Ronin-Walknowska 2010). Ciąża wpływając na produkcję i wydalanie kwasów żółciowych może wywoływać zmiany obserwowane w schorzeniach wątroby, takich jak ostre ciążowe stłuszczenie wątroby, czy cholestaza wewnątrzwątrobowa.

W układzie oddechowym na całej długości dróg oddechowych dochodzi do obrzęku i przekrwienia błony śluzowej z powodu rozszerzenia naczyń włosiczkowych. Całkowita pojemność płuc ulega zmniejszeniu o ok. 4-5% z powodu uniesienia przepony. Większa objętość oddechowa i mniejsza objętość zalegająca są przyczyną zwiększenia się wentylacji pęcherzykowej płuc o ok. 65% w czasie ciąży. Zwiększone zużycie tlenu jest spowodowane wzrostem metabolizmu tkanek serca i mięśni oddechowych matki i płodu. Hiperwentylacja jest prawdopodobnie spowodowana działaniem progesteronu na ośrodek oddechowy i wrażliwością chemoreceptorów obwodowych tętnicy szyjnej (Bręborowicz 2005).

Do zmian dochodzi także w gruczołach wydzielania wewnętrznego. Powiększenie gruczołu tarczowego, spowodowane rozsiałym przerostem elementów gruczołowych, stwierdza się u ponad 50% ciężarnych. Metabolizm tarczycy zwiększa się o 10% ok. 16 tygodnia ciąży i o 30% w III trymestrze. Powiększenie gruczołów nadnerczowych związane z przerostem kory nadnerczy prowadzi do zwiększenia stężenia kortykosteroidów. Przedni płat przysadki powiększa swoje rozmiary o 20-40%, a zmiany czynnościowe polegają na zwiększeniu wytwarzania hormonów: somatotropiny, adrenokortykotropiny i tyreotropiny (Bręborowicz 2005).

Do chorób wątroby specyficznych dla okresu ciąży należą (Bręborowicz 2005):

- niepowściągliwe wymioty ciężarnych
- cholestaza wewnątrzwątrobowa ciężarnych
- zespół HELLP
- stan przedrzucawkowy (preeklampsja)
- ostre ciążowe stłuszczenie wątroby.

Stany te są powikłaniami spotykanymi tylko w ciąży i każde z nich występuje w charakterystycznym dla siebie trymestrze ciąży: wymioty występują w I trymestrze

cięży, cholestaza w drugiej połowie ciąży, a preeklampsja, zespół HELLP czy ostre stłuszczenie wątroby występują w III trymestrze ciąży (Hay 2008, Lee i wsp. 2003, Bacq 2010).

W terapii niepowściągliwych wymiotów ciężarnych stosuje się zmiany w diecie i trybie życia, uzupełnianie niedoborów wodno-elektrolitowych i wyrównanie zaburzeń gospodarki kwasowo-zasadowej, leki przeciwwymiotne. Korzystny efekt wywiera także stosowanie kortykosteroidów, wpływających bezpośrednio na ośrodek wymiotów w mózgu. Ponadto stwierdzono, że pozytywny efekt terapii uzyskuje się po podaniu ekstraktu z imbiru. Alternatywą leczenia jest zastosowanie akupunktury oraz psychoterapii (Bręborowicz 2005).

Cholestaza ciężarnych powstaje w wyniku nasycenia organizmu pod koniec ciąży hormonami płciowymi. Duże stężenie estrogenów powoduje zmniejszenie przepuszczalności błony komórkowej hepatocytów, natomiast zwiększone ilości progesteronu atonię dróg żółciowych i pęcherzyka żółciowego, przez co dochodzi do zastoju żółci. Współczesne leczenie farmakologiczne opiera się na stosowaniu kwasu ursodeoksycholowego (UDCA), który jest występującym naturalnie nietoksycznym hydrofilowym kwasem żółciowym. UDCA likwiduje cholestazę przez stymulację wydalania z komórek wątrobowych hydrofobowych kwasów żółciowych i ich metabolitów oraz szkodliwych metabolitów progesteronu. Efekt ochronny UDCA wiąże się ze stabilizacją błony komórkowej i z ochroną przed apoptozą wywołaną hydrofobowymi kwasami żółciowymi (Gorelik i wsp. 2003).

Leczenie stanu przedrzucawkowego i rzucawki ma charakter objawowy i obejmuje postępowanie przeciwdrgawkowe i hypotensyjne, natomiast w przypadku późnej ciąży korzystne jest wcześniejsze jej rozwiązanie. Istnieją doniesienia sugerujące korzystne rezultaty działań profilaktycznych. Jednym z nich jest stosowanie aspiryny, która podawana w niewielkich dawkach, średnio 1 mg/kg m.c./dobę (ok. 60 mg/dobę) ciężarnym z grupy wysokiego ryzyka rozwoju stanu przedrzucawkowego może umiarkowanie zmniejszyć częstość występowania tego powikłania, także w kolejnych ciążach (Panther i wsp. 2008, Hay 2008, Hepburn i wsp. 2008). Aspiryna przywraca równowagę w układzie prostacyklina / tromboksan zaburzoną w stanie przedrzucawkowym, hamuje cyklooksygenazę w płytkach i śródbłonku naczyń, a także ogranicza tworzenie wolnych rodników tlenowych i nadtlenków lipidowych (Ruano i wsp. 2005). W profilaktyce stanu przedrzucawkowego i rzucawki podkreśla się także rolę diety ubogosodowej, zawierającej związku wapnia, wielonienasycone kwasy

tłuszczowe omega-3 jako prekursory prostaglandyn, antyoksydanty . Podejmowane są również próby zastosowania substratów do syntezy tlenu azotu, m.in. L-argininy (Leszczyńska-Gorzelał i wsp. 2009).

W zespole HELLP ryzyko zgonu matki szacuje się na ok. 3-25%. Główną przyczyną jest wykrzepianie śródnacyniowe, oddzielenie łożyska, ostra niewydolność nerek, rzadziej wodobrzusze, obrzęk płuc, mózgu oraz naczyniopochodna niewydolność oddechowa. Ryzyko śmierci płodu ocenia się w granicach 7–60% i jest uzależnione od ciężkości choroby w czasie porodu. Najskuteczniejszym postępowaniem jest szybkie rozwiązanie ciąży, o ile płód osiągnął wystarczającą dojrzałość. W celu indukcji dojrzałości płuc płodu stosowane są kortykosteroidy. Ryzyko zespołu HELLP w kolejnych ciążach jest zmienne i wynosi od 4 do 27% (Hay 2008, Jaroszewicz 2002, Hepburn i wsp. 2008).

W ostrym ciążowym stłuszczeniu wątroby współczynnik umieralności dla matek szacuje się na 12-15% (Pereira i wsp. 1997). Najczęstszą przyczyną śmiertelności płodów, która wynosi ok. 36% jest hypoglikemia płodowa. Brak jest swoistego leczenia schorzenia. Stosowane jest wielokierunkowe leczenie objawowe mające na celu podtrzymanie funkcji zajętych narządów oraz wczesne leczenie powikłań, zwłaszcza infekcyjnych. Istotne znaczenie ma wczesne rozpoznanie schorzenia i decyzja o bezzwłocznym przyspieszeniu rozwiązania cesarskim cięciem, co zwiększa szanse na przeżycie matki i płodu. Jeśli po porodzie nie obserwuje się poprawy w zakresie funkcji wątroby, wskazane jest rozważenie transplantacji narządu (Hay 2008).

Każda ciążarna, u której występuje choroba wątroby jest wyzwaniem dla lekarza leczącego. Trafne rozpoznanie, współpraca z lekarzami różnych specjalności i podjęta w porę właściwa terapia może poprawić stan zdrowia oraz zmniejszyć śmiertelność zarówno matki jak i płodu. Prowadzone w ostatnich latach badania nad zastosowaniem L-argininy w leczeniu schorzeń występujących podczas ciąży m.in. hypotrofii płodu (Pardej i wsp. 2009), rzucawce porodowej (Leszczyńska-Gorzelał i wsp. 2009), preeklampsji (Zdebski i wsp. 1996), czy nadciśnieniu indukowanym ciążą (Rytlewski i wsp. 2005) przynoszą obiecujące wyniki. Wykazano także możliwe oddziaływanie NO na zapobieganie porodowi przedwczesnemu poprzez wpływ na relaksację mięśni gładkich oraz na krążenie maczyno-płodowe (Skrzypulec-Plinta i wsp. 2010).

Wiele badań potwierdza także istotne znaczenie apoptozy w chorobach wątroby nieswoistych dla okresu ciąży, które mogą wystąpić w czasie jej trwania. Należą do nich m.in. wirusowe zapalenia wątroby, autoimmunologiczne zapalenia wątroby,

cholestatyczne choroby wątroby, rak pierwotny wątroby, choroba alkoholowa wątroby (Chmielewski i wsp.2003).

Istnieje wiele doniesień opisujących rolę i działanie tlenku azotu w schorzeniach wątroby wywołanych m.in. przez niedotlenienie (Peralta i wsp. 1997) , alkohol (Nanji i wsp. 1995), schorzenia immunologiczne (Wang i wsp. 1995), czy w zespołach chorobowych związanych z ciążą, m.in. w preeklampsji (Hudicek-Martinić i wsp. 2004). Niewiele jest natomiast prac wyjaśniających jak NO, którego donorem jest L-arginina, wpływa na tor indukcji sygnału do apoptozy w poszczególnych narządach ciążarnych. Obecna praca analizuje przebieg apoptozy w wątrobie ciążarnych. Wyniki badań mogą okazać się pomocne w wyborze przyszłych leków działających skutecznie w schorzeniach wątroby ciążarnych lecz mających jak najmniej efektów ubocznych.

Ciąża fizjologiczna.

Celem obecnej pracy była ocena wpływu L-argininy na tor indukcji sygnału do apoptozy wywołanej zmianami hormonalnymi w hepatocytach wątroby ciążarnych samic szczura uwzględniająca czynnik czasu.

W niniejszym doświadczeniu fizjologiczna ciąża samic szczura była czynnikiem indukującym komórki wątroby matek do wzmożonej, apoptotycznej śmierci. Potwierdził to oceniany odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 3, który wzrósł istotnie statystycznie w połowie ciąży (10 dnia) i pod koniec ciąży (20 dnia) w porównaniu z grupą samic nieciążarnych i badanych 10 dni po okoceniu. 10-tego dnia ciąży pole powierzchni wątroby zajętej przez odczyn immunohistochemiczny dla badanego białka było porównywalne do badanego 20 dnia ciąży. Nie było statystycznie istotnych różnic między polem powierzchni odczynu dla kaspazy 3 badanym w grupie samic nieciążarnych i w grupie ocenianej 10 dni po okoceniu. Indeks apoptozy w hepatocytach grup samic ciążarnych w połowie i pod koniec ciąży był istotnie większy niż w grupie samic nieciążarnych i 10 dni po okoceniu. 10 dnia ciąży indeks apoptozy był na takim samym poziomie jak 20 dnia ciąży. Nie było także istotnych statystycznie różnic między grupą samic nieciążarnych i 10 dni po okoceniu.

10 dnia ciąży apoptoza w hepatocytach w grupie samic ciążarnych przebiegała wszystkimi badanymi w niniejszym doświadczeniu drogami, tj. drogą mitochondrialną i siateczkową oraz drogą zewnętrzną. Potwierdziły to badania immunohistochemiczne,

w których odczyn dla kaspaz 9, 12 i 8 był istotnie statystycznie większy w połowie ciąży w porównaniu do grup samic nieciążarnych i 10 dni po okoceniu.

20 dnia ciąży dominowała droga wewnętrzna – mitochondrialna. Odczyn dla kaspazy 9 był na takim samym poziomie jak 10 dnia ciąży, natomiast droga siateczkowa i zewnętrzna były mniej zaangażowane jednak odczyn dla kaspaz 12 i 8 był istotnie wyższy niż w grupach samic nieciążarnych i 10 dni po okoceniu.

10 dni po okoceniu zmniejszyła się istotnie aktywacja wszystkich badanych w niniejszym doświadczeniu kaspaz 9, 12, 8 i była istotnie mniejsza w porównaniu do grup samic ciężarnych w połowie ciąży i pod koniec ciąży oraz była na takim samym poziomie jak u samic nieciążarnych.

W badaniu immunohistochemicznej oceny zewnętrznej drogi indukcji sygnału do apoptozy, przeprowadzonym przez Pedrycz i wsp.(Pedrycz i wsp. 2011) wykazano, że fizjologiczna ciąża samic szczura jest czynnikiem indukującym komórki nerek matki do wzmożonej, apoptotycznej śmierci co potwierdziło także niniejsze doświadczenie w odniesieniu do hepatocytów. Oceniając zewnętrzną drogę indukcji sygnału do apoptozy w komórkach nerek ciężarnych samic szczura Pedrycz i wsp. stwierdzili, że aktywacja kaspazy 8 nastąpiła głównie pod koniec ciąży (20 dnia), natomiast w połowie ciąży (10 dnia) droga zewnętrzna była zaangażowana jednak na poziomie istotnie mniejszym niż pod koniec ciąży (20 dnia), a na podobnym jak po okresie połogu. W niniejszym badaniu aktywacja kaspazy 8 w hepatocytach podczas fizjologicznej ciąży samic szczura wystąpiła głównie w połowie ciąży, natomiast pod koniec ciąży była istotnie mniejsza niż w połowie ciąży, ale istotnie większa niż po okresie połogu.

Po zastosowaniu L-argininy.

Zastosowanie L-argininy spowodowało istotne nasilenie apoptozy w połowie ciąży (10 dnia) w porównaniu do tego samego dnia w grupach kontrolnych, co potwierdziło badanie odczynu immunohistochemicznego kaspazy 3. 20 dnia ciąży nastąpiło istotne zmniejszenie aktywności kaspazy 3 w porównaniu do aktywności w połowie ciąży w grupie doświadczalnej i było nieznacznie mniejsze niż w grupie kontrolnej pod koniec ciąży (20 dnia). W okresie połogu (10 dni po okoceniu) nasilenie apoptozy było porównywalne do badanego pod koniec ciąży (20 dnia) w grupie doświadczalnej i było istotnie wyższe niż 10 dni po okoceniu w grupie kontrolnej i grupie samic nieciążarnych.

Indeks apoptozy w grupie doświadczalnej potwierdził nasilenie apoptozy w połowie ciąży oraz jej istotne zmniejszenie pod koniec ciąży i po okoceniu.

Zastosowanie L-argininy spowodowało **10 dnia ciąży** istotne zmniejszenie aktywności toru wewnętrznego – siateczkowego w porównaniu do grup kontrolnych badanych w tym samym czasie. Zmniejszenie aktywności drogi siateczkowej utrzymywało się na podobnym poziomie we wszystkich badanych grupach doświadczalnych. Apoptoza przebiegała głównie drogą zewnętrzną, której nasilenie było porównywalne do grupy kontrolnej badanej 10 dnia ciąży. Istotna była także droga mitochondrialna jednakże jej nasilenie po zastosowaniu L-argininy uległo istotnemu zmniejszeniu.

Pod koniec ciąży (**20 dnia**) dominowała droga zewnętrzna, która utrzymywała się na poziomie badanej 10 dnia ciąży doświadczalnej i była istotnie bardziej nasiloną niż w grupie kontrolnej 20 dnia ciąży. Istotna była także droga wewnętrzna-mitochondrialna, jednak pod wpływem NO odczyn dla kaspazy 9 uległ istotnemu zmniejszeniu w stosunku do obserwowanego 10 dnia ciąży doświadczalnej a także do badanego 20 dnia ciąży w grupie kontrolnej. Zaangażowanie drogi siateczkowej utrzymywało się na poziomie porównywalnym z badanym 10 dnia ciąży i 10 dni po okoceniu w grupie doświadczalnej oraz było na podobnym poziomie jak 10 dni po okoceniu w grupie kontrolnej i w grupie samic nieciążarnych.

W okresie położu aktywność drogi zewnętrznej była istotnie mniejsza niż w połowie i pod koniec ciąży doświadczalnej i utrzymywała się na podobnym poziomie jak w badanej 10 dni po okoceniu w grupie samic w fizjologicznej ciąży i grupie samic nieciążarnych. Nasilenie drogi mitochondrialnej w okresie położu było na poziomie badanej pod koniec ciąży doświadczalnej (20 dnia) i 10 dni po okoceniu w grupie kontrolnej oraz mniejsze niż w grupie samic nieciążarnych. Aktywność kaspazy 12 utrzymywała się na poziomie badanej 10 i 20 dnia ciąży doświadczalnej i 10 dni po okoceniu w grupie kontrolnej. Odczyn dla kaspazy 12 w grupie samic nieciążarnych był na takim samym poziomie jak 10 dnia ciąży i 10 dni po okoceniu w grupie doświadczalnej oraz różnił się istotnie od odczynu opisywanego 20 dnia ciąży doświadczalnej.

Pedrycz i wsp. w przeprowadzonym badaniu hepatocytów szczura zaobserwowali, że L-arginina w dawce 40mg/kgm.c. nie wywoływała apoptozy (Pedrycz i wsp. 2010).

Z kolei w innym badaniu wykazano, że L-arginina jako prekursor egzogenego tlenu azotu, zastosowana u szczurów w takiej samej dawce nie aktywowała mitochondrialnej drogi indukcji sygnału do apoptozy przez pośrednie i bezpośrednie uszkodzenie mitochondriów w hepatocytach, aktywację kaspazy 9 i białka bax. (Pedrycz i wsp. 2011)

W niniejszym doświadczeniu ciąża fizjologiczna aktywowała tor mitochondrialny, natomiast zastosowanie L-argininy w ciąży zmniejszyło istotnie nasilenie drogi mitochondrialnej.

NO wywiera podwójną rolę w patologii chorób wątroby. Jedną korzystną związaną jest m.in. z rozszerzaniem naczyń krwionośnych, hamowaniem agregacji trombocytów i adhezji neutrofilii oraz hamowaniem apoptozy. Drugą bardziej negatywną jest efektem lokalnego toksycznego działania wynikającego z tworzenia wysocze reaktywnych substancji podczas stresu oksydacyjnego (Battista i wsp. 2002).

W normalnych warunkach w wątrobie obecna jest tylko śródbłonkowa syntaza tlenu azotu (eNOS) a wytwarzany NO w małych ilościach reguluje perfuzję. Z kolei indukowalna syntaza NO (iNOS) znajduje się w gotowości w wątrobie i jest aktywowana m.in. w przypadku endotoksemii, wstrząsu krwotocznego, niedokrwienia / reperfuzji, sepsy, infekcji, zapalenia wątroby, ekspozycji na ozon, czy regeneracji wątroby. Podczas zapalenia i infekcji iNOS jest aktywowana a NO jest produkowany w dużych ilościach w wątrobie długotrwale. W odpowiedzi na endotoksyny, polisacharydy lub prozapalne cytokiny, jak TNF- α , interleukiny, interferon- γ lub ich kombinacje, iNOS jest gwałtownie stymulowany w ciągu godzin w hepatocytach i komórkach Kupfera. Ponadto endotelialne komórki wątrobowe i Ito mogą także produkować NO poprzez ekspresję iNOS (Li i wsp. 1999).

Liczne badania prowadzone na zwierzętach doświadczalnych nad działaniem tlenu azotu w schorzeniach wątroby potwierdziły jego ochronne działanie.

Ozsoy i wsp. stosując L-argininę w dawce 500mg/kg m.c. 2x dziennie w cholestazie wywołanej u szczurów wykazali, że L-arginina ochraniała wątrobę przed uszkodzeniem poprzez stymulację iNOS i syntezę NO. W badaniu histopatologicznym stwierdzono mniej pyknotycznych jąder oraz mniejszą infiltrację leukocytów wokół sinusoid (Ozsoy i wsp. 2011). Inni badacze w prowadzonych doświadczeniach na szczurach z cholestazą przebiegającą z niedokrwieniem stwierdzili niedobór iNOS,

potwierdzając hipotezę, że NO wpływa na regulację przepływu krwi przez wątrobę (Muriel 2000, Baron i wsp. 2000).

Jeszcze inne prace wskazują na zwiększone zużycie L-argininy podczas cholestazy wywołanej utrudnieniem odpływu żółci i podczas endotoksemii oraz na ochronne działanie suplementacji L-argininy na wątrobę (Soeters i wsp. 2002, Nahavandi i wsp. 2001).

Li i wsp. wykazali zmniejszenie nasilenia apoptozy, po zastosowaniu NO, badając aktywność kaspazy 3 i określając index apoptozy w hepatocytach w doświadczalnej ischemii przeprowadzonej na szczurach (Li i wsp. 2003).

Inne badania pokazują, że NO może chronić hepatocyty przed uszkodzeniem w przypadku działania na wątrobę czterochlorku węgla (Muriel 1998), acetaminofenu (Kuo i wsp. 1994), alkoholu (Nanji i wsp. 1995).

W niniejszej pracy zaobserwowano natomiast nasilenie apoptozy w połowie ciąży po zastosowaniu L-argininy. Niewielkie lecz nieistotne zmniejszenie nasilenia nastąpiło pod koniec ciąży jednak utrzymywało się na tym samym poziomie także po okoceniu. Można więc przypuszczać, że wpływ na takie działanie mogły mieć zmiany metaboliczne i hormonalne jakie zaszły podczas ciąży.

Uważa się, że estrogeny, dla których rezerwuarem są mitochondria, hamując wpływ jonów wapnia z tych organelli stymulują aktywność mitochondrialnej syntazy NO (mtNOS) (Tatoyan i wsp. 2008). W zależności od stężenia, estrogeny mogą pełnić rolę antyoksydantów lub prooksydantów. Wiadomym jest, że warunkach fizjologicznych mitochondria wytwarzają niewielkie ilości wolnych rodników i taki ich poziom pozwala na aktywację procesów komórkowych takich jak proliferacja i różnicowanie, nie wpływając na śmierć komórki (Świtalska i wsp. 2007). W warunkach ciąży dochodzi natomiast do wzrostu hormonów, głównie estrogenów i progesteronu. Być może stymulacja mtNOS przez estrogeny powoduje wzrost stężenia NO i wraz z podanym egzogennym donorem może powodować jego nadmiar i nasilenie apoptozy.

W badaniach na zwierzętach stwierdzono również, że estradiol zwiększa ekspresję białka Bcl-2 i Bcl-xl, które pełnią rolę antyapoptotyczną hamując aktywność kaspaz (Dziedziejko i wsp. 2009), co również może wpływać na przebieg procesu apoptozy w niniejszym badaniu.

Z kolei Graboń w swojej publikacji podaje, że arginina może mieć istotny wpływ na wydzielanie hormonów (Graboń 2006). Zastosowana więc w doświadczeniu L-arginina mogła wpłynąć dodatkowo na poziom hormonów.

Jednym z czynników regulujących poziom tlenu azotu może być także arginaza, gdyż zużywając wspólny substrat, jakim jest L-arginina chroni komórkę przed nadmiernym wytwarzaniem NO, który w zbyt dużych stężeniach wykazuje działanie cytotoksyczne (Mielczarek-Puta i wsp. 2008). Arginaza występuje jako enzym cytosolowy, wykazujący najwyższą aktywność w wątrobie oraz jako arginaza mitochondrialna (Graboń 2006). Jest enzymem katalizującym hydrolizę L-argininy do L-ornityny i mocznika, zapewniając usuwanie toksycznego amoniaku z organizmu. Razem z syntazą NO arginaza konkuruje o wspólny substrat – argininę. Duża dostępność arginazy w komórkach ogranicza dostępność argininy do syntezy NO, np. w ranach, czy makrofagach. Wzrost aktywności NOS oraz poziomu azotynów i azotanów w warunkach *in vitro* wiąże się z zahamowaniem aktywności arginazy. Zużywanie przez arginazę i NOS wspólnego substratu decyduje o pewnych zależnościach pomiędzy tymi enzymami (Ścibor i wsp. 2004). Z pewnością do takich zależności doszło w niniejszym doświadczeniu, w którym badano hepatocyty w przebiegu ciąży, podczas której występuje wzmożony metabolizm.

W niniejszej pracy użyto egzogennej L-argininy do oceny toru indukcji sygnału do apoptozy w hepatocytach. Liczni badacze udowodnili, że podawana egzogenicznie L-arginina zostaje przetworzona do NO (Howard i wsp. 1987) o czym świadczył m.in. wzrost cGMP w osoczu (Gryglewski 1993).

Prowadząc badania nad działaniem tlenu azotu na różne narządy zwierząt doświadczalnych oraz ludzi autorzy prac używali różnych prekursorów NO, m.in.:

- Nitroprusydek sodu (SNP) – Chae i wsp. (Chae i wsp. 2004) -podawali szczurom SNP w stężeniach 0,5 - 4mmol/l,
- Nitroglicerynę (Kuźlik 2005),
- S-Nitroso-N-acetyl-d,l-penicillaminę (SNAP) – Török i wsp. (Török i wsp. 2002) badając wpływ NO na apoptozę w komórkach rakowych w cholangiocarcinoma, Kwon i wsp. zauważyli, że SNAP przechodzi w organizmie w NO po ok. 24 godzinach od podania (Kwon i wsp. 2000),
- N(omega)-hydrokso-l-argininę (NOHA) (Singh i wsp. 2002),
- L-argininę (Raff i wsp. 2005).

Trójzotan glicerolu – klasyczny donator NO zastosowany w badaniach szczurów ograniczał uszkodzenie żołądka występujące po podaniu NLPZ (niesteroidowe leki przeciwzapalne) oraz zmniejszał krwawienie z przewodu pokarmowego po zastosowaniu aspiryny (Dzielska-Olczak 2011).

Na początku XXI wieku wprowadzono do badań przedklinicznych preparaty NLPZ sprzężone z NO, które ograniczają uboczne skutki terapii NLPZ. W badaniach doświadczalnych udowodniono, że NO uwalniany przez śródbłonek naczyń, nerwy czuciowe lub komórki nabłonka powierzchni błony śluzowej odznacza się silnym działaniem gastroprotekcynym oraz chroni błonę śluzową żołądka przed uszkodzeniami przez różne czynniki drażniące, jak etanol, aspiryna, czy stres. NO-diklofenak, NO-ketoprofen, NO-ibuprofen, NO-rofekoksyb są poddawane badaniom przedklinicznym lub klinicznym. Badania dotyczące NO-aspiryny zostały przerwane w 2007 roku, gdyż jeden z głównych metabolitów okazał się mutageny in vitro (Dzielska-Olczak 2011). NO-NLPZ w doświadczeniach przeprowadzonych na zwierzętach doświadczalnych (szczurach) łagodziły skutki niedokrwienia mięśnia serca, poprawiały kurczliwość serca oraz nie wywierały działań niepożądanych ze strony nerek, takich jak obrzęki i wzrost ciśnienia tętniczego. Ponadto powstrzymywały skurcz naczyń i obniżały ciśnienie tętnicze (Mackenzie i wsp. 2008, Muscara i wsp. 2006).

L-arginina jest dość często używanym donorem tlenu azotu w badaniach zwierząt doświadczalnych i ludzi. Została także zastosowana w niniejszym doświadczeniu w dawce 40mg/kg m.c.

Z kolei badając wpływ zmniejszonego stężenia tlenu azotu autorzy prac używali inhibitorów syntazy NO.

Coob i wsp. zaobserwowali, że u zwierząt doświadczalnych z wywołanym wstrząsem septycznym podaż inhibitorów NOS przywracała normotensję, co potwierdzało hipotezę, że obniżenie oporu naczyniowego w przebiegu wstrząsu septycznego było związane z nadmierną produkcją endogennego NO pod wpływem krążących cytokin i endotoksyn (Coob i wsp.1995)

Zastosowanie inhibitora syntazy NO – L-NAME (L-nitroarginine methyl ester) u samicy szczura w ciąży spowodowało znaczący wzrost ciśnienia krwi, wzrost stężenia białek w moczu i zmniejszoną wagę szceniąt (Liu i wsp. 1997, Vanderleli i wsp. 2006).

Biliar i wsp. wykazali, że zastosowanie inhibitorów NOS (L-NAME) znacząco powiększało uszkodzenie komórek wątrobowych (Billiar i wsp.1990), podczas gdy infuzja farmakologicznych dawek donorów NO przynosiła ochronę hepatocytów (Ou i wsp. 1997).

Tlenek azotu jest silnie dyfundującym i reaktywnym związkiem odgrywającym ważną rolę w wielu procesach fizjologicznych i patologicznych. Lipofilność cząsteczki

sprzyja przenikaniu NO przez błonę komórkową. W niektórych komórkach NO może sprzyjać indukcji apoptozy (efekt pro-apoptotyczny), w innych może hamować apoptozę (efekt anty-apoptotyczny). Funkcja NO zależy od jego stężenia, miejsca wytwarzania oraz powiązań z innymi cząsteczkami jak tione, reaktywne formy tlenu i białka (Bieńkowska-Haba 2005).

Tlenek azotu reagując z rodnikami nadtlenkowymi tworzy związki nieszkodliwe. Jednak zbyt duże stężenia NO stają się szkodliwe dla organizmu, gdyż hamuje on peroksydazę glutationową uniemożliwiając jej unieszkodliwienie nadtlenków.

Na ogół indukcja apoptozy wymaga dużego stężenia NO, zaś w małych fizjologicznych stężeniach związek ten hamuje programowaną śmierć komórki (Lind 2004). Kronon i wsp. (Kronon i wsp. 1999) opisali tzw. paradoks tlenu azotu, polegający na tym, że L-arginina zastosowana w małych dawkach (roztwór L-argininy o stężeniu 4 mmol/L) działała ochronnie na mięsień serca noworodków poprzez redukcję wolnych rodników tlenowych. Natomiast w dużych dawkach (roztwór L-argininy o stężeniu 10 mmol/L) powodowała ich wzrost, wywołując uszkodzenie naczyń i mięśnia serca.

Conrad i wsp. w przeprowadzonym badaniu zaobserwowali wzrost endogennego NO podczas ciąży samic szczura, co prowadziło do rozszerzenia naczyń krwionośnych i odgrywało ważną rolę w przystosowaniu do zmian hemodynamicznych, które występują podczas ciąży (Conrad i wsp. 1993). Biorąc pod uwagę powyższe obserwacje można sądzić, że dawka 40mg/kg m.c. L-argininy mogła być zbyt duża i spowodowała nasilenie apoptozy.

W licznych badaniach używano także różne dawki L-argininy. Lampariello i wsp. zachęcające wyniki uzyskali stosując u ciężarnych preparat doustny L-argininy w dawce 6 g /dobę w leczeniu wewnątrzmacicznej hypotrofii płodu (Lampariello i wsp. 1997). Rytlewski i wsp. w przeprowadzonym badaniu na ciężarnych z preeklampsją, którym podawano 3g/dobę L-argininy przez 3 tygodnie, zauważyli że jest to dawka wystarczająca aby obniżyć nadciśnienie indukowane ciążą (Rytlewski i wsp.2005). Gupta i wsp. określili dawkę egzogenego NO - 100mg/kg/dobę jako najmniejszą adaptogenną i antystresową (Gupta i wsp. 2005). Natomiast inni naukowcy zauważyli, że takie dawki doprowadzają do zwiększenia ilości wolnych rodników (Kronon i wsp. 1999). Z kolei Evans i wsp. zauważyli, że użycie dawki 9 lub 21g/dobę L-argininy

wywoływało dopiero podwyższenie jej stężenia w organizmie, zaś dawka 3g/dobę wywoływała niewiele skutków ubocznych (Evans i wsp. 2004).

W niniejszej pracy dawka 40 mg/kg/dobę L-argininy była zbliżona do stosowanej u kobiet ciężarnych, powinna więc być bezpieczna zarówno dla matki jak i dla płodu.

Tlenek azotu fizjologicznie powstaje m.in. w śródbłonku naczyń, stymulowany poprzez stres, bradykininę, histaminę, trombinę, acetylocholinę, serotoninę, norepinefrynę. W niniejszym doświadczeniu nie można wykluczyć obecności podwyższonej syntezy endogennego NO, równocześnie z podwyższonym stężeniem egzogenego NO po podaniu L-argininy.

W literaturze nie ma jednoznacznej odpowiedzi na pytanie jak tlenek azotu, zarówno endogeny jak i egzogeny, wpływa na proces apoptozy i proliferacji komórek. Nadprodukcja endogennego tlenku azotu jest przyczyną zaburzeń w procesie apoptozy prowadzących do wielu chorób. Także niedobór tlenku azotu jest przyczyną licznych schorzeń.

Zwiększona produkcja NO obserwowana jest we wstrząsie septycznym, reumatoidalnych i zapalnych artropatiach (Wimalawansa 2008), podczas dializy u pacjentów z niewydolnością nerek, wykazujących niedociśnienie (Nakayama i wsp. 1998). Nadmiar NO wpływa na poszerzenia uszkodzenia mózgu podczas udaru (Wimalawansa 2008).

Zmniejszona produkcja NO może prowadzić do nadciśnienia, stanów niedokrwienia mięśnia serca (Wimalawansa 2008), nadciśnienia u kobiet w ciąży (Rytlewski i wsp. 1997), hipercholesterolemii, miażdżycy (Gryglewski 1990, Rang i wsp. 2000), nadciśnienia płucnego (Giaid i wsp. 1995), cukrzycy.

Możliwość kierowania apoptozą przy pomocy egzogenego NO zależy od rodzaju komórek apoptotycznych, co potwierdzają liczne badania. Najlepiej zbadanymi komórkami pod względem działania egzogenego NO są komórki śródbłonka naczyń krwionośnych. Z licznych badań wynika, że NO działa antyapoptotycznie (Chae i wsp. 2004, DeMeester i wsp. 1998). Działanie antyapoptotyczne wykazano także w badaniach na komórkach błony śluzowej żołądka (Bersimbaev i wsp. 2001), komórkach okrężnicy (Madesh i wsp. 1999).

Naukowcy potwierdzili także działanie antyapoptotyczne egzogenego NO na komórki, w których apoptoza była pobudzona przez: niedotlenienie (Madesh i wsp.

1999), aspirynę (Fiorucci i wsp. 1999), czy zmniejszoną ilość surowicy krwi (Kwon i wsp. 2000).

Opisanych zostało kilka mechanizmów działania zarówno antyapoptoycznego, jak i proapoptycznego egzogenego tlenku azotu. Działanie antyapoptyczne NO polegało najczęściej na:

- S-nitrozylacji kaspazy 3 i 8 (Kim i wsp. 1997, Kim i wsp. 2000, Dash i wsp. 2003). Inni badacze stwierdzili, że działanie antyapoptyczne tlenku azotu ma charakter mieszany. Li i wsp. (Li i wsp. 1999) w przeprowadzonym doświadczeniu wykazali antyapoptyczne działanie NO na hepatocyty *in vitro* i *in vivo* wywołane S-nitrozylacją kaspaz i prokaspaz, a także pobudzeniem syntezy cGMP i kinaz zależnych od cGMP. Z kolei Mannick i wsp. zaobserwowali, że przyłączenie ligandu do receptora FAS spowodowało aktywację apoptozy poprzez udział w przechodzeniu prokaspazy 3 w jej formę aktywną poprzez denitrozylację formy nieaktywnej (Mannick i wsp. 1999). Uważa się, że S-nitrozylacja jest jednym z czynników regulujących proces aktywacji kaskady kaspaz.
- Nadprodukcji cGMP. Dash i wsp. prowadząc badania na ludzkim trofoblaście zauważyli, że NO wykazywał działanie antyapoptyczne, spowodowane zwiększoną produkcją cyklicznego GMP a nie S-nitrozylacją kaspazy 3 (Dash i wsp. 2003).
- Zahamowaniu uwalniania cytochromu c z mitochondriów, co zostało spowodowane zależną od NO zmniejszoną produkcją energetyczną mitochondriów. Potwierdzili to w swoich badaniach na hodowanych hepatocytach Li i wsp. (Li i wsp. 1999). Z kolei Török i wsp. zaobserwowali, że egzogeny NO hamował uwalnianie cytochromu c poprzez bezpośrednie blokowanie aktywności kaspazy 9 (Török i wsp. 2002).

Opisano także mechanizmy działania proapoptycznego egzogenego NO, polegające m.in. na:

- Aktywacji kaspazy 3 co opisano w komórkach nabłonkowych prostaty ludzkiej (Huguenin i wsp. 2004).
- Wzroście ekspresji białka p53, uwalnianiu cytochromu c z mitochondriów i aktywacji kaskady kaspaz, aktywacji kinaz aktywowanych stresem (Krzyżowska 2005).

- Spadku ekspresji antyapoptotycznego białka Bcl-2 (Brune i wsp. 2002).

W niniejszym doświadczeniu zauważono, że w hepatocytach ciężarnych samic szczura po zastosowaniu L-argininy doszło do zwiększenia aktywności kaspazy 3 w połowie ciąży oraz niewielkiego zmniejszenia pod koniec ciąży, natomiast zmniejszeniu uległa aktywność kaspaz 12 i 9 biorących udział w wewnętrznej drodze apoptozy, podczas gdy wzrosła aktywność kaspazy 8 uczestniczącej w drodze zewnętrznej. Potwierdzenie, jaki mechanizm spowodował powyższe działanie zapewniłyby szczegółowe badania biochemiczne, które nie były celem tego doświadczenia.

W dostępnej literaturze egzogeny NO jest najczęściej opisywany przez badaczy jako czynnik hamujący apoptozę lub nie wpływający na jej zwiększenie. Najczęstszym mechanizmem działania jest S-nitrolizacja cysteiny, która wchodzi w skład kaspaz (Liu i wsp. 1999). W niniejszym doświadczeniu L-arginina, jako substrat tlenu azotu w hepatocytach nasiliła apoptozę w połowie ciąży, zmniejszając ją pod koniec ciąży jednak nieistotnie. Ponadto zmieniła tor indukcji sygnału do apoptozy. Wzrost reakcji immunohistochemicznej dla kaspazy 8 po zastosowaniu L-argininy pod koniec ciąży świadczy o zmianie toru indukcji sygnału do apoptozy z toru wewnętrznego na tor zewnętrzny.

Różnice w działaniu na apoptozę endo- i egzogenego tlenu azotu zauważyli Dilworth i wsp. (Dilworth i wsp. 2001), którzy używali w badaniu hodowli hepatocytów. W przypadku izolacji hepatocytów zaobserwowali wzrost produkcji endogenego tlenu azotu, który hamował apoptozę. Po zastosowaniu inhibitora syntazy NO nastąpiło zmniejszenie produkcji NO oraz znaczny wzrost apoptozy. Endogeny tlenek azotu, którego synteza jest katalizowana przez endotelialną syntazę eNOS, działa protekcyjnie na wątrobę. Z kolei NO egzogeny, produkowany przez indukowaną syntazę iNOS, może być zarówno ochronny jak i toksyczny dla wątroby w zależności od warunków. W ostrym stanie zapalnym wątroby, związanym z działaniem cytokin tlenek azotu hamuje apoptozę w wątrobie. W warunkach stresu oksydacyjnego indukowany NO przyczynia się do uszkodzenia wątroby (Li i wsp. 1999).

Zarówno apoptoza, jak i tlenek azotu regulują wiele ważnych procesów życiowych. Mogą więc wpływać na siebie nawzajem. Można przypuszczać, że także zmiany metaboliczne i hormonalne występujące podczas ciąży mają istotny wpływ na przebieg apoptozy, co mogą potwierdzać wyniki niniejszego badania.

Z roku na rok rozszerzają się możliwości klinicznego zastosowania argininy w leczeniu różnych schorzeń. Wyniki wielu badań klinicznych wskazują, że arginina może być stosowana zarówno w terapii, jak i w profilaktyce wielu patologii.

Dokładne poznanie działania NO na narządy ciężarnych może przyczynić się do opracowania nowych strategii terapeutycznych poprzez wprowadzenie do użycia leków działających na różne tory indukcji sygnału do apoptozy.

Zastosowanie leków wpływających na proces apoptozy na poziomie kaskady kaspaz jest dużym wyzwaniem ze względu na wiele dróg aktywacji tych enzymów oraz nie do końca wyjaśnione połączenia między różnymi szlakami enzymatycznymi prowadzącymi do apoptozy. Należy jednak podchodzić z ostrożnością do uzyskiwanych wyników badań, gdyż w ostatnich latach stwierdzono, że NO może być potencjalnym czynnikiem genotoksycznym i mutagennym. W przeprowadzanych badaniach obserwowano po podaniu NO deaminację zasad nukleotydowych i DNA izolowanego z cielęcej grasicy, a także efekt mutagenny in vitro z użyciem *Salmonella typhi* murium oraz in vivo w tkance płucnej szczura (Baumert 2005).

7. WNIOSKI

1. Fizjologiczna ciąża samic szczura jest czynnikiem indukującym komórki wątroby matek do wzmożonej, apoptotycznej śmierci począwszy od połowy ciąży. Po okresie połogu (10 dni po okoceniu) nasilenie apoptozy uległo istotnemu obniżeniu i było na podobnym poziomie jak w grupie samic nieciążarnych.
2. W połowie ciąży fizjologicznej (10 dnia) apoptoza przebiegała wszystkimi badanymi w niniejszym doświadczeniu drogami, tj. drogą mitochondrialną, siateczkową i zewnętrzną.
3. Pod koniec ciąży fizjologicznej (20 dnia) dominowała droga mitochondrialna, natomiast nasilenie drogi siateczkowej i zewnętrznej uległo zmniejszeniu.
4. Po okresie połogu (10 dni po okoceniu) w grupie samic w fizjologicznej ciąży przebieg wszystkich badanych torów indukcji sygnału do apoptozy uległ istotnemu osłabieniu i był na podobnym poziomie jak w grupie samic nieciążarnych.
5. L-arginina nasiliła istotnie apoptozę komórek wątroby ciężarnych samic szczura w połowie ciąży, która na podobnym poziomie utrzymywała się do końca ciąży i po okresie połogu.
6. L-arginina zmieniła tor indukcji sygnału do apoptozy w połowie ciąży z zewnętrznego, mitochondrialnego i siateczkowego na zewnętrzny i mitochondrialny.
7. L-arginina pod koniec ciąży zmieniła tor indukcji sygnału do apoptozy z mitochondrialnego na zewnętrzny.
8. Egzogenny tlenek azotu podany ciężarnym samicom szczura osłabił siateczkowy tor indukcji sygnału do apoptozy w nasilonej apoptozie komórek wątroby.

8. STRESZCZENIE

Zainteresowanie wielu badaczy apoptozą – zaprogramowaną śmiercią komórki oraz procesami jej pobudzenia i hamowania wynika z potencjalnych możliwości leczenia wielu schorzeń.

L-arginina od dawna była stosowana w leczeniu jako lek hepatoprotekcyjny i antyasteniczny. Jednak odkrycie, że tlenek azotu powstaje z argininy zmieniło spojrzenie na rolę argininy w wielu procesach fizjologicznych i patologicznych.

Tlenek azotu wywołuje apoptozę działając poprzez wolne rodniki oraz wywołując stres oksydacyjny. Tlenek azotu może także działać antyapoptotycznie usuwając wolne rodniki z organizmu. Nie do końca znana jest jednak natura tlenku azotu. Wiadomo, że w zależności od dawki może on chronić komórkę przed śmiercią lub też może tą śmierć indukować. Tlenek azotu działa różnie, zależnie od typu komórek i narządów. Na przestrzeni ostatnich lat pojawiło się i nadal pojawia się wiele doniesień zarówno na temat korzystnego, jak i niekorzystnego działania tlenku azotu w wielu chorobach.

W przebiegu ciąży pojawiają się zmiany w funkcji wielu narządów. Czynność metaboliczna wątroby ulega upośledzeniu czego wynikiem jest gorsze wydalanie produktów przemiany hepatocytów i zmniejszony odpływ żółci. Cięża wpływając na produkcję i wydalanie kwasów żółciowych może wywoływać zmiany obserwowane w schorzeniach wątroby, takich jak ostre ciążowe stłuszczenie wątroby, czy cholestaza wewnątrzwątrobowa.

Nie znane są do tej pory zmiany jakich może dokonać tlenek azotu w wątrobie ciężarnych, chociaż NO w postaci L-argininy jest stosowany w patologii ciąży, m.in. w nadciśnieniu tętniczym indukowanym ciążą, czy w hypotrofii płodu.

Użyta w doświadczeniu L-arginina, jako substrat tlenku azotu jest lekiem, którego wpływ na apoptozę nie jest w pełni poznany.

Obecna praca analizuje przebieg apoptozy w wątrobie ciężarnych. Wyniki badań mogą okazać się pomocne w wyborze przyszłych leków działających skutecznie w schorzeniach wątroby ciężarnych lecz mających jak najmniej efektów ubocznych.

Cel:

Celem pracy była histologiczna i immunohistochemiczna ocena toru indukcji sygnału do apoptozy w hepatocytach w fizjologicznej ciąży oraz ciąży poddanej działaniu L-argininy uwzględniająca czynnik czasu.

W/w komórki przebadano pod kątem:

- Obecności nasilonej apoptozy oceniając indeks apoptozy, ekspresję kaspazy 3.
- Oceny toru wewnętrznego-mitochondrialnego indukcji sygnału do apoptozy – kaspaza 9.
- Oceny toru wewnętrznego-siateczkowego indukcji sygnału do apoptozy – kaspaza 12.
- Oceny toru zewnętrznego-receptorowego indukcji sygnału do apoptozy – kaspaza 8.

Material i metody:

Badaniami objęto dobrane losowo szczury, samice szczepu Wistar o początkowej masie ciała 200-250 g, w wieku 2,5 do 3 miesięcy. Na początku doświadczenia samice parowano z samcami.

Samice podzielono na 7 równolicznych grup – po 10 samic w każdej grupie, 3 grupy doświadczalne i 4 grupy kontrolne. Samicom z grup doświadczalnych I, III, V podano per os 40mg/kg m.c.L-argininy co 2-gi dzień począwszy od 7 dnia ciąży (7x). Samicom z grup kontrolnych II, IV, VI podano per os 2 ml wody destylowanej co 2-gi dzień począwszy od 7 dnia ciąży (7x).

Samice z grupy I doświadczalnej i II kontrolnej dekapitowano 10 dnia trwania ciąży. Samice z grupy III doświadczalnej i IV kontrolnej dekapitowano 20 dnia trwania ciąży. Samice z grupy V doświadczalnej i VI kontrolnej dekapitowano 10 dnia po okoceniu. Samice z VII grupy kontrolnej, które nie były zapłodnione, dekapitowano 30 dnia od początku doświadczenia.

Do badań histopatologicznych pobrano wycinki prawego płata wątroby szczurów. Zabarwione preparaty oglądano pod mikroskopem świetlnym oceniając hepatocyty. Zwrócono szczególną uwagę na cechy apoptozy widoczne na preparatach. Dokumentacji fotograficznej dokonano przy użyciu aparatu fotograficznego do zdjęć mikroskopowych – Jenaval Contrast Carl Zeiss a wyniki badań przedstawiono w formie opisowej.

Do określenia ilościowego stopnia nasilenia apoptozy w preparatach posłużono się indeksem apoptozy.

Badano po 3 preparaty pochodzące od każdego osobnika. Ciemno wybarwione Hematoksyliną jądra komórkowe o zmniejszonym obwodzie i średnicy uznano za jądra pyknotyczne, będące jednym z wykładników zachodzącej w komórce apoptozy.

Podczas liczenia posługiwano się mikroskopem projekcyjnym (MP3 Nr 1185, PZO Poland). Pod uwagę brano jedynie hepatocyty a wyniki badań poddano analizie statystycznej. Wyniki przedstawiono w %. Do badań immunohistochemicznych użyto po dwa preparaty z badanego narządu od każdego osobnika. W badaniach posłużono się metodą trójstopniową:

- oczyszczenie badanego skrawka z endogennych peroksydaz, stosując nadtlenek wodoru oraz reakcja antygen-przeciwciało (antygen reaguje z pierwotnym przeciwciałem)
- reakcja przeciwciała pierwotnego z biotynylowanym przeciwciałem wtórnym
- reakcja biotyny ze streptawidyną sprzęgniętą z peroksydazą chrzanową.

Dodanie barwnika AEC, który jest utleniany przez peroksydazę chrzanową w miejscu reakcji antygen-przeciwciało, dało czerwone zabarwienie w miejscu występowania poszukiwanego antygenu.

Do każdego badanego preparatu robiono kontrolę negatywną. Był to preparat, do którego nie dodano przeciwciała pierwotnego.

Przebadano immunohistochemicznie metodą jakościową i ilościową hepatocyty na obecność białek biorących udział w apoptozie, w której sygnał do śmierci przebiegał:

- drogą zewnętrzną – kaspazy 8, 3
- drogą mitochondrialną- kaspazy 9, 3
- droga siateczkową – kaspazy 12, 3.

Dokumentacji fotograficznej dokonano przy użyciu Colour Video Camera CCD-IRIS (Sony) połączonej z komputerem. Do każdego badanego preparatu robiono kontrolę negatywną.

Wyniki badań oceniano przy użyciu komputerowego analizatora obrazu i przedstawiono statystycznie w postaci średnich pól powierzchni zajętej (w badanym polu) przez dodatnie odczyny immunohistochemiczne dla poszczególnych badanych białek. Istotność statystyczną różnic określano przy $p \leq 0,05$.

Wyniki badań:

Indeks apoptozy

Indeks apoptozy w kontrolnej ciąży wzrósł 10 dnia i utrzymywał się na podobnym poziomie do 20 dnia ciąży. Istotnie statystycznie zmniejszył się 10 dni po okoceniu. Był wtedy porównywalny z obserwowanym w grupie samic doświadczalnych 20 dnia ciąży i 10 dnia po okoceniu. W ciąży, w której stosowano L-argininę indeks apoptozy był nasilony 10 dnia podobnie jak w tym czasie w ciąży kontrolnej, zmniejszył się 20 dnia, i był podobny do tego obserwowanego 10 dni po okoceniu i istotnie niższy niż w tym samym dniu w ciąży kontrolnej

Kaspaza 3

Odczyn dla kaspazy 3 w kontrolnej ciąży wzrósł 10 dnia i utrzymywał się na podobnym poziomie do 20 dnia ciąży. Istotnie statystycznie zmniejszył się 10 dni po okoceniu. Był wtedy najniższy wśród obserwowanych we wszystkich badanych grupach doświadczalnych i kontrolnych oraz porównywalny z obserwowanym w grupie nieciążarnych samic.

W ciąży, w której stosowano L-argininę odczyn dla kaspazy 3 był nasilony 10 dnia bardziej niż w tym czasie w ciąży kontrolnej, zmniejszył się 20 dnia, i był podobny do tego obserwowanego 10 dni po okoceniu i niższy niż tego samego dnia w ciąży kontrolnej

Kaspaza 8

Różowy odczyn immunohistochemiczny w wątrobie badanych samic szczura z grup doświadczalnych w miejscach aktywności kaspazy 8 różnił się istotnie statystycznie od tego opisywanego w grupach kontrolnych.

10 dnia ciąży był podobny i w kontroli i w grupie doświadczalnej ale 20 dnia wzrósł znacznie w grupie doświadczalnej w stosunku do grupy samic w fizjologicznej ciąży.

W grupach doświadczalnych 10 dnia po okoceniu odczyn dla kaspazy 8 był podobny do tego opisywanego 10 dnia po okoceniu w grupach kontrolnych oraz do tego opisywanego w grupie samic nieciążarnych.

Kaspaza 9

Odczyn dla kaspazy 9 pod wpływem NO zmniejszył się istotnie statystycznie w stosunku do kontroli już 10 dnia ciąży.

20 dnia ciąży również był istotnie statystycznie mniejszy w stosunku do obserwowanego w tym samym dniu w grupie kontrolnej. Utrzymywał się wtedy na poziomie porównywalnym z tym obserwowanym 10 dni po okoceniu w grupie kontrolnej oraz w grupie samic nieciążarnych.

10 dnia po okoceniu odczyn dla kaspazy 9 był podobnie natężony w grupie kontrolnej i doświadczalnej oraz statystycznie istotnie mniejszy niż w grupie samic nieciążarnych.

Kaspaza 12

Odczyn dla kaspazy 12 w doświadczalnej ciąży zmniejszył się istotnie we wszystkich grupach w porównaniu z kontrolną grupą badaną 10 dnia ciąży. 20 dnia ciąży kontrolnej był na takim poziomie jak w odpowiadającej grupie doświadczalnej samic ciężarnych 20 dnia ciąży i 10 dni po okoceniu. 10, 20-tego dnia ciąży doświadczalnej oraz 10 dni po okoceniu odczyn dla kaspazy 12 był porównywalny do tego opisanego 10 dni po okoceniu samic grupy kontrolnej. Odczyn w grupie samic nieciążarnych był na takim samym poziomie jak 10 dnia ciąży doświadczalnej i 10 dni po okoceniu samic grupy doświadczalnej. Istotnie różnił się natomiast od odczynu opisywanego 20 dnia ciąży doświadczalnej.

Wnioski:

1. Fizjologiczna ciąża samic szczura jest czynnikiem indukującym komórki wątroby matek do wzmożonej, apoptotycznej śmierci począwszy od połowy ciąży. Po okresie połogu (10 dni po okoceniu) nasilenie apoptozy uległo istotnemu obniżeniu i było na podobnym poziomie jak w grupie samic nieciążarnych.
2. W połowie ciąży fizjologicznej (10 dnia) apoptoza przebiegała wszystkimi badanymi w niniejszym doświadczeniu drogami, tj. drogą mitochondrialną, siateczkową i zewnętrzną.
3. Pod koniec ciąży fizjologicznej (20 dnia) dominowała droga mitochondrialna, natomiast nasilenie drogi siateczkowej i zewnętrznej uległo zmniejszeniu.

4. Po okresie połogu (10 dni po okoceniu) w grupie samic w fizjologicznej ciąży przebieg wszystkich badanych torów indukcji sygnału do apoptozy uległ istotnemu osłabieniu i był na podobnym poziomie jak w grupie samic nieciążarnych.
5. L-arginina nasiliła istotnie apoptozę komórek wątroby ciężarnych samic szczura w połowie ciąży, która na podobnym poziomie utrzymywała się do końca ciąży i po okresie połogu.
6. L-arginina zmieniła tor indukcji sygnału do apoptozy w połowie ciąży z zewnętrznego, mitochondrialnego i siateczkowego na zewnętrzny i mitochondrialny.
7. L-arginina pod koniec ciąży zmieniła tor indukcji sygnału do apoptozy z mitochondrialnego na zewnętrzny.
8. Egzogenny tlenek azotu podany ciężarnym samicom szczura osłabił siateczkowy tor indukcji sygnału do apoptozy w nasilonej apoptozie komórek wątroby.

9. ABSTRACT

The interest of many researchers apoptosis - programmed cell death and the processes of stimulation and inhibition due to the potential treatment of many diseases. L-arginine has long been used as hepatoprotective and antiasthenic medicine. But discovery, that nitric oxide is produced in the organism from L-arginine, changed the perspective on the role of arginine in many physiological and pathological processes.

Nitric oxide induces apoptosis in influencing the free radicals and causing oxydative stress. Nitric oxide can also act anti-apoptotic removing free radicals from the body. The nature of nitric oxide is not exactly known. Depending on the dose, NO may induce apoptosis or may protect cells from death. Nitric oxide activity depends on the type of cells and organs. In recent years there and still there are many reports about beneficial and negative influence nitric oxide in many diseases.

In the course of pregnancy there are changes in the function of many organs. Metabolic liver function is impaired resulting in the deterioration of excretion hepatocytes metabolic products and reduced bile drainage. Pregnancy affects the production and excretion of bile acids may induce the changes observed in liver diseases such as acute fatty liver of pregnancy, or intrahepatic cholestasis.

So far changes that can make nitric oxide in the liver pregnant are unknown, although the NO as L-arginine is used in the pathology of pregnancy, including pregnancy-induced hypertension, or fetus hypotrophia.

L-arginine, a nitric oxide substrate, used in present experiment is a medicine whose effects on apoptosis are not fully study.

The present work examines the process of apoptosis in the liver pregnant. The results may be helpful in the choice of future medicines in diseases of the liver effective during pregnancy but have the least side effects.

Aim

The aim of this study was histological and immunohistochemical evaluation of the signal to apoptosis induction caused by hormonal changes in hepatocytes during physiological rats pregnancy and after L-arginine therapy, taking into account influence of time.

The hepatocytes were tested for:

- assessing the presence of increased apoptotic index , expression of caspase-3
- assessment of the intrinsic- mitochondrial pathway of apoptosis - caspase 9
- assessment of the intrinsic –reticular pathway of apoptosis -caspase 12
- assessment of the extrinsic - receptor pathway of apoptosis - caspase 8.

Material and methods

The study material involved randomly selected white Wistar female rats of the baseline body weight - 200-250 g, aged 2.5-3 months. At the beginning of examination the female rats were fertilized. The animals were divided into 7 equal groups - 10 individuals each, 3 experimental groups and 4 control. Experimental groups I, III, V – rats which were fertilized and treated with a dose of L-arginine - 40mg/kg body weight, given orally every other day beginning from 7day of pregnancy (7 times). Control groups II, IV, VI – rats which were fertilized and treated with 2 ml of distilled water orally every other day starting on 7 day of pregnancy (7 times).

Animals in group I- experimental and II - control decapitated in 10 day of pregnancy, females in the experimental group III and control IV- decapitated in 20 day of pregnancy. Animals of group V- experimental and VI - control decapitated in 10 day after delivery. Females of the control group VII, which were not fertilized, decapitated in 30 day of experiment.

After decapitation the specimens from the right hepatic lobe were collected for further histopathological examinations.

The hepatocytes were analysed under a light microscope. Special attention was paid to the features suggesting apoptosis. Photographic documentation was prepared using the Jenaval Contrast Carl Zeiss camera, and the results were presented in the descriptive form.

The degree of apoptosis in the specimens collected from the liver was determined quantitatively using the apoptotic index (AI).

Three specimens from each individual were examined. The nuclei stained dark with haematoxylin with reduced perimeter and diameter were accepted as the pyknotic ones, i.e. being one of possible manifestations of apoptosis. The projection microscope (MP3 No. 1185, PZO Poland) was used. The examinations included only hepatocytes. The results were statistically analyzed. The results were presented as percentage.

For immunohistochemical investigation two specimens from each individual were examined. The three step method was used in immunohistochemical investigation, comprises:

- clarifying of explored specimen from endogenic peroxidase and reactions antigen-primary antibody
- reaction of primary antibody with biotinylated secondary antibody
- reaction of biotin with streptavidine connected with horseradish peroxidase.

The addition of pigment AEC, which is oxidized by horseradish peroxidase in place of antigen-antibody reaction, gave a red color at the incidence of the antigen sought.

Negative control was made for each test preparation. This was a preparation to which no primary antibody added.

According to the immunohistochemical method hepatocytes were examined in terms of quality and quantity for the presence of proteins involved in apoptosis to which the signal to death ran through:

- extrinsic pathway - caspase 8, 3
- intrinsic- mitochondrial pathway - caspase 9, 3
- intrinsic- reticular pathway - caspases 12, 3.

Photographic documentation was made using a Color Video Camera CCD-IRIS (Sony) connected to a computer. Negative control was made for each test specimen.

The results were evaluated using a computerized image analyzer and presented statistically in the areas occupied (in the test field) by positive immunohistochemical staining for each protein studied. Statistical significance of differences was determined at $p \leq 0.05$.

Results of study:

Apoptotic index

Apoptotic index in the control group increased in 10 day of pregnancy and remained at a similar level to 20th day. Statistically significantly decreased in 10 day after delivery. It was then comparable to those observed in the experimental group in 20 day of pregnancy and in 10 day after delivery.

In pregnancy, treated with L-arginine, apoptotic index was intense in 10 day of pregnancy as in the same time of control group, decreased in 20 day and similar to that observed in 10 day after delivery and significantly lower than in the same day in control group.

Caspase 3

Reaction for caspase 3 in the control group increased in 10 day of pregnancy and remained at a similar level to 20th day. Significantly decreased in 10 day after delivery. It was then among the lowest observed in all tested experimental and control groups, and comparable with that observed in non-pregnant group.

After L-arginine therapy reaction for caspase3 was more increased in 10 day of pregnancy than at this time in control group, decreased in 20 day of pregnancy and was similar to that observed in 10 day after delivery and lower than the same day in control group.

Caspase 8

Immunohistochemical reaction in the liver of experimental group in places caspase-8 activity differed significantly from that described in control group.

In 10 day of pregnancy was similar in control and experimental groups but increased significantly in 20 day of pregnancy in the experimental group compared to the control group.

In the experimental group in 10 day after delivery reaction for caspase 8 was similar to that described in 10 day after delivery in the control group, and similar to that described in the non-pregnant rats.

Caspase 9

Reaction for caspase 9 after L-arginine therapy decreased significantly compared to the control group already in 10 day of pregnancy.

In 20 day of pregnancy was also significantly lower compared to that observed in the same day in the control group. In this day maintained at a level comparable with that observed in 10 day after delivery in the control group and non-pregnant group.

In 10 day after delivery reaction for caspase-9 was similarly intense in the control and experimental groups and significantly lower than non-pregnant females.

Caspase 12

Reaction for caspase12 in experimental group decreased significantly in all groups compared with the control group tested in 10 day of pregnancy. In 20 day of pregnancy in control group was at a level which corresponded to the experimental group in 20 of pregnancy and in 10 day after delivery. In 10, 20 day of pregnancy in experimental group and in 10 day after delivery reaction for caspase12 was comparable to that described in 10 day after delivery in control group.

Reaction for caspase 12 in non-pregnant group was at the same level as in 10 day of pregnancy and in 10 day after delivery in experimental group. Differed significantly from the reaction described in 20 day of pregnancy in experimental group.

Conclusions

1. Pregnancy induced apoptosis in hepatocytes in female rats since 10 day of pregnancy. 10 days after delivery apoptosis was significantly decreased and was at a similar level as not fertilized group.
2. In 10 day of pregnancy apoptosis proceeded all the examine pathways - mitochondrial, recitular and receptor.
3. At the end of pregnancy (in 20 day) dominated mitochondrial pathway, intensification of reticular and receptor pathways declined.
4. 10 days after delivery in the control groups all the tested pathways of apoptosis were significantly reduced and were at a similar level as not fertilized group.
5. L-arginine significantly induced apoptosis in pregnant rats in 10 day of pregnancy, which was maintained at similar level to the end of pregnancy and after delivery.
6. In 10 day of pregnancy L-arginine changed mitochondrial, reticular and extrinsic pathways to extrinsic and mitochondrial pathways of apoptosis..
7. 7. In 20 day of pregnancy L-arginine transformed mitochondrial pathway of apoptosis into extrinsic pathway.
8. Exogenous nitric oxide given to pregnant rats reduced reticular pathway of induced apoptosis in hepatocytes in pregnant rats.

10. LITERATURA

1. Acehan D., Jiang X., Morgan D.G.: Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol. Cell*, 2002; 9: 423-432.
2. Adams J.M.: Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev.*, 2003; 17: 2481 – 2495.
3. Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G.: Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.*, 2001; 357: 593–615.
4. Avrameas S., Lespinats G.: Defection of antibodies in immuno-competent cells of animals immunized with enzymes. *CR Acad. Sci. Hebd. Seances Acad Sci. D.* 1967; 265: 302-304.
5. Bacq Y.: Liver diseases unique to pregnancy: a 2010 update. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.*, 2010; 35(3): 182-193.
6. Baron V., Hernandez J., Noyola A., et al.: Nitric oxide and inducible nitric oxide synthase expression are down regulated in acute cholestasis in the rat accompanied by liver ischemia. *Comp. Biochem. and Physiol.*, 2000; 127: 243-249.
7. Bates C.A i Silkoff P.E.: Exhaled nitric oxide in asthma: from bench to bedside. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2003; 111: 256 – 62.
8. Battista S., Bar F., Pollet C., Mengozzi G., Molino G.: Pathophysiological and therapeutic implications of nitric oxide in hepatology., *Minerva Gastroenterol. Dietol.*, 2002; 48(4): 309-318).
9. Baumert M.: Tlenek azotu-lekarz czy zabójca?. *Wiadomości Lekarskie* 2005; LVIII: 7-8.
10. Bellamy C.O., Malconsom R.D., Harrison D.J., Wyllie A.H.: Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Semin. Cancer Biol.*, 1995; 6: 3-16.
11. Bersimbaev R.I., Yugai Y.I., Hanson P.J., Tzoy I.G.: Effect of nitric oxide on apoptotic activity in the rat gastrointestinal tract. *Eur.J.Pharmacol.*, 2001; 423: 9-16.
12. Bielak-Żmijewska A. : Mechanizmy odporności komórek nowotworowych na apoptozę. *Kosmos. Problemy Nauk Biologicznych.*, 2003; 52: 157-171.

13. Bieńkowska-Haba M.: Tlenek azotu wytwarzany przez leukocyty płucne w astmie oskrzelowej. *Post.Hig.Med.Dośw.*, 2005; 59: 584-601.
14. Billiar T. R., Curran R. D., Harbrecht B. G., Stuehr D. J., Demetris A. J., Simmons R. L.: Modulation of nitrogen oxide synthesis in vivo: N^G-monomethyl-L-arginine inhibits endotoxin-induced nitrate/nitrite biosynthesis while promoting hepatic damage. *J. Leukoc. Biol.*, 1990; 48: 565–569.
15. Boger R.H., Bode-Boger S.M.: The clinical pharmacology of L-arginine. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2001; 41: 79–99.
16. Boucher J.L., Moali C., Tenu J.P.: Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. *Cell Mol. Life Sci.*, 1999; 55: 1015–1528.
17. Bratton S.B., Walker G., Roberts D.L., Cain K., Cohen G.M.: Caspase3 cleaves Apaf-1 into an approximately 30 kDa fragment that associates with an inappropriately oligomerized and biologically inactive approximately 1,4 MDa apoptosome complex. *Cell Death Differ.*, 2001; 8: 425–433.
18. Bręborowicz G.H.: *Położnictwo i ginekologia*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL W-wa, 2005: 42-53; 99-102.
19. Bręborowicz G.: *Położnictwo i ginekologia-Repetytorium 2010*; 12-16: 75-81.
20. Brune B., von Knethen A.: The role of nitric oxide and cyclooxygenase – 2 in attenuating apoptosis. *J.Environ.Pathol.Toxicol.Oncol.*, 2002; 21: 103-112.
21. Bursch W., Taper H.S., Lauer B., et al.: Determination of length of the histological stages of apoptosis in normal liver and in altered hepatic foci of rats. *Carcinogenesis*, 1990; 11: 847-853.
22. Cain K., Bratton S.B., Cohen G.M.: The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie*, 2002; 84: 203–214.
23. Castedo M., Hirsch T., Susin S.A., Zamzami N., Marchetti P., Macho A., Kroemer G.: Sequential acquisition of mitochondrial and plasma membrane alterations during early lymphocyte apoptosis. *J. Immunol.* 1996; 157: 512-521.
24. Chae I.H., Park K.W., Kim H.S., Oh B.H.: Nitric oxide-induced apoptosis is mediated by BAX/Bcl-2 gene expression, transition of cytochrome C, and activation of caspase-3 in rat vascular smooth muscle cells. *Clin.Chim. Acta*, 2004; 341: 83-91.

25. Chmielewski M., Linke K., Zabel M., Szuber L.: Apoptosis in liver. *Gastroent Pol.* 2003; 10 (5): 453 – 462.
26. Chmielewski M., Linke K., Zabel Z.: Metody wykrywania zjawiska apoptozy w komórkach wątrobowych in situ. *Nowiny Lekarskie* 2008; 77 (3): 223-226.
27. Clarke P.G.: Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat. Embriol.*, 1990; 181: 195-213.
28. Conrad K.P., Joffe G.M., Kruszyna R., Rochelle L.G., Smith R.P., Chavez J.E., Mosher M.D.: Identification of increased nitric oxide biosynthesis during pregnancy in rats. *FASEB J.*, 1993; 7:566-571.
29. Coob J.P., Natanson C., Qezado Z., Hofman W.D., Koev C.A., Banks S., Correa R. Levi R. i wsp.: Differential hemodynamic effect of L-NMMA in endotoxemic and normal dogs. *Am. J. Physiol.*, 1995; 268: H 1634–1642.
30. Dash P.R., Cartwright J.E., Baker P.N., Johnstone A.P., Whitley G.S.: Nitric oxide protects human extravillous trophoblast cells from apoptosis by a cyclic GMP-dependent mechanism and independently of caspase 3 nitrosylation. *Exp. Cell Res.* 2003; 287: 314-324.
31. De Berrazueta J.R. The Nobel Prize for nitric oxide. The unjust exclusion of dr. Salvador Moncada. *Rev. Esp. Cardiol.*, 1999; 52: 221-226.
32. DeMeester S.L., Oiu Y., Buchman T.G., Hotchkiss R.S., Dunnigan K., Karl I.E., Cobb J.P.: Nitric oxide inhibits stress-induced endothelial cell apoptosis. *Crit.Care Med.*, 1998; 26: 1500-1509.
33. Dighiero G., Maloum K., Desablens B., Cazin B., Navarro M., Leblay R., Leporrier M., Jaubert J., Lepeu G., Dreyfus B., Binet J.L., Trade P.: Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leucemia. *N. Engl.J. Med.*, 1998; 338:1506-1514.
34. Dilworth C., Bigot-Lasserre D., Bars R.: Spontaneous nitric oxide in hepatocyte monolayers and inhibition of compound-induced apoptosis. *Toxicol.In Vitro.*, 2001; 15: 623-630.
35. Domiński Z.: Apoptoza: śmierć komórek w życiu organizmów zwierzęcych. *Kosmos.* 1999; 48: 385-396.

36. Dzieziejko V., Białecka M., Machoy-Mokrzyńska A., Kłodowska-Duda G., Chlubek D.: Rola estrogenów w chorobie Parkinsona. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2009; 63: 627-633.
37. Dzielska-Olczak M.: Inhibitory cyklooksygenaz i inne związki o potencjale przeciwzapalnym w chorobie zwyrodnieniowej stawów (osteoporozie –OA) – część II. *Pol.Merk.Lek.*, 2011; XXX, 175: 82-86.
38. Elliot T. G., Cockcroft J. R., Groop P. H. i wsp.: Inhibition of nitric oxide synthesis in forearm vasculature of insulin – dependent diabetic patients: blunted vasoconstriction in patients with microalbuminuria. *Clin. Sci. (London)* 1993; 85 (6): 687 – 693.
39. Evans R.W., Fernstrom J.D., Thompson J., Morris S.M., Kuller L.H.: Biochemical responses of healthy subjects during dietary supplementation with L-arginine. *J.Nutr.Biochem.*, 2004; 15: 534-539.
40. Fadok V., Bratton D.M., Rose A., Pearson R., Alan B., Ezekewitz P.M., Henson P.M.: A receptor of fosfatidyloserine – specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 2000; 405: 85-90.
41. Fal A.M., Nawak A.A., Nowak M.T., Małolepszy J.: Programowana śmierć komórki i jej rola w patogenezie procesów chorobowych. *Pol. Arch. Med. Wew.* 2003; 1:71-78.
42. Faubel S., Ljubanowic D., Reznikov L., Somerset H., Dinarello C.A., Edelstein C.L.: Caspase – 1 – deficient mice are protected against cisplatin-induced apoptosis and acute tubular necrosis. *Kidney Int.* 2004; 66: 2202-2213.
43. Fiorucci S., Antonelli E., Santucci L., Morelli O., Miglietti M., Federici B., Mannucci R., Del Soldato P., Morelli A.: Gastrointestinal safety of nitric oxide-derived aspirin is related to inhibition of ICE-like cysteine proteases in rats. *Gastroenterology.*, 1999; 116: 1089-1106.
44. Flynn N.E., Meininger C.J., Haynes T.E., Wu G.: The metabolic basis of arginine nutrition and pharmacotherapy. *Biomed. Pharmather.*, 2002; 56: 427 – 438.
45. Foster M.W., McMahon T.J., Stamler J.s.: S-nitrosylation in health and disease. *Trends Mol. Med.* , 2003; 9: 160-168.
46. Furchgott R.F. Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide. *Biosci. Rep.*, 1999; 19: 235-251.

47. Gabai V.L., Mabuchi K., Mosser D.D., Sherman M.Y.: Hsp 72 and stress kinase c-jun N-terminal kinase regulate the bid-dependent pathway in tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Mol. Cell Biol.*, 2002; 22: 3415-3424.
48. Garthwaite G., Batchelor A.M., Goodwin D.A., Hewson A.K., Leerning K., Ahmed Z., Cuzner M.L., Garthwaite J. Pathological implications of iNOS expression in central white matter: an ex vivo study of optic nerves from rats with experimental allergic encephalomyelitis. *Eur. J. Neurosci.*, 2005; 21: 2127-2135.
49. Giaid A., Saleh D.: Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N. Engl. J. Med.* 1995; 333 (4): 214 – 221.
50. Giulivi C., Kato K., Cooper C.E.: Nitric oxide regulation of mitochondrial oxygen consumption I: cellular physiology. *Am.J.Physiol.Cell Physiol.* 2006; 291(6): 1225-1231.
51. Goldsworthy T.L., Conolly R.B., Fransson-Steen R.: Apoptosis and cancer assessment. *Mut. Res.*, 1996; 365: 71–90.
52. Gonzalez F., Pariselli F., Dupaigne P., Budihardjo I., Lutter M., Antonsson B., Diolez P., Manon S., Martinou J.C., Gubern M., Wang X., Bernard S., Petit P.X.: tBid interaction with cardiolipin primarily orchestrates mitochondrial dysfunctions and subsequently activates Bax and Bak. *Cell Death Differ.*, 2005; 12: 614–626.
53. Gorelik J., Shevchuk A.I., Diakonov I. i wsp.: Dexamethasone and ursodeoxycholic acid protect against the arrhythmogenic effect of taurocholate in an in vitro study of rat cardiomyocytes. *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 2003, 110: 467-474.
54. Graboń W.: Arginina – podstawowy aminokwas w procesie nowotworzenia. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2006; 60: 483-489.
55. Gryglewski R. J.: Nitric oxide in arteriosclerosis. *Thromb. Haemorrh. Disorders.*, 1990; 2: 1-9.
56. Gryglewski R. J.: Interactions between Nitric Oxide and Prostacyclin. *Semin.in Thromb. Hemostas.*, 1993; 19: 158-164.
57. Gupta V., Gupta A., Saggu S., Divekar H.M., Grover S.K., Kumar R.: Anti-stress and Adaptogenic Activity of L-Arginine Supplementation. *Evid Based Complement Alternat Med.*, 2005; 2: 93-97.

58. Gyrd-Hansen M., Farkas T., Fehrenbacher N., Bastholm L., Hoyer-Hansen M., Elling F., Wallach D., Flavell R., Kroemer G., Nylandsted J., Jaattela M.: Apoptosome –independent activation of the lysosomal cell death pathway by caspase-9. *Mol. Cell Biol.* , 2006; 26: 7880-7891.
59. Hay J.E.: Liver Disease in Pregnancy, *Hepatology* 2008; 47(3):1067-1076.
60. Hepburn I.S., Schade R.R.: Pregnancy-associated liver disorders. *Dig. Dis. Sci.*, 2008; 53: 2334- 2358.
61. Herr I., Debatin K.M.: Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood.*, 2001; 98: 2603-2614.
62. Holcik M., Korneluk R.G: XIAP, the guardian angel. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2001; 2: 550–556.
63. Honing L.S., Rosenberg R.N.: Apoptosis and neurologic disease. *Am. J. Med.*, 2000; 108: 317–330.
64. Howard R.B., Hosokawa T., Maguire M.H.: Hypoxia induced fetoplacental vasoconstriction in perfused human placental cotyledons. *Am.J.Obstet.Gynecol.*, 1987; 157: 1261-1266.
65. Hudicek-Martincić G., Kusan-Jukić M., Salihagić-Kadić A.: Nitric oxide-an important signalling molecule in normal and pathological pregnancy. *Lijec Vjesn.* 2004; 126(3-4): 80-85.
66. Huguenin S., Fleury-Feith J., Kheuang L., Jourand M.C., Bolla M., Riffaud J.P., Chopin D.K., Vacherot F.: Nitrosulindac (NCX 1102): a new nitric oxide-donating non-steroidal anti-inflammatory drug (NO-NSAID), inhibits proliferation and induces apoptosis in human prostatic epithelial cell lines. *Prostate.*, 2004; 61: 132-141.
67. Husson A., Brasse-Lagnel C., Fairand A., Renouf, Lavoinnee A.: Argininosuccinate synthetase from the urea cycle to the citrulline-NO cycle ., 2003; 270: 1887-1899.
68. Ignarro L.J., Buga G.M., Wood K.S., Byrns R.E., Chaudhuri G. Endothelium derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1987; 84: 9265-9269.
69. Ignarro L.J.: Endothelium derived nitric oxide: actions and properties. *FASEB J.* 1989; 3: 31-36.
70. Igney F.H., Krammer P.H.: Death and anti-death: tumor resistance to apoptosis. *Nat. Rev. Cancer*, 2002; 2: 277-288.

71. Izdebska M., Grzanka A., Ostrowski M.: Rak pęcherza moczowego – molekularne podłoże genetyki i leczenia. *Kosmos*, 2005; 54: 213-220.
72. Jabłoński E.M., Hughes F.M.Jr.: The potential role of Caveolin-1 in inhibition of aquaporins during the AVD. *Biol. Cell*. 2006; 98: 33-42.
73. Jamroziak K., Robak T.: Cytogenetyka i biologia molekularna przewlekłej białaczki limfatycznej B-komórkowej. *Acta Haematol. Pol.*, 2000; 31: 103–112.
74. Jaroszewicz W.: Choroby wątroby w przebiegu ciąży. *Gastroenterol. Pol.*, 2002; 9: 59-65.
75. Jenkinson C.P., Grody W.W., Cederbaum S.M.: Comparative properties of arginases. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1996; 114B: 107 – 132.
76. Jimnez R., Carracedo J., Santamaria R., Soriano S., Madueno J.A., Ramirez R., Rodriguez M., Martin – Malo A., Aljama P.: Replicative senescence in patients with chronic kidney failure. *Kidney Int*. 2005; 68: S11-S15.
77. Kaczmarek E., Górna A., Majewski P.: Techniques of image analysis of quantitative immunohistochemistry. *Ann. Acad. Med. Bialostocensis*. 2004; 49 (suppl.): 155-158.
78. Katsuki S., Arnold W., Mittal C., Murand F. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *Cyclic Nucleotide Res.*, 1977; 3: 23-35.
79. Kawahara A., Enari M., Talanian R.U., Wong W.W., Nagata S.: FAS – induced DNA fragmentation and proteolysis of nuclear proteins. *Genes Cell*, 1998; 3: 297-306.
80. Kerr JRF., Wyllie AH., Currie AR.: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972; 26: 139-257.
81. Kharfi A., Giguere Y., Sapin V., Massae J., Dastugue B., Forest J.C.: Trophoblastic remodeling in normal and preeclamptic pregnancies: implication of cytokines. *Clin. Biochem.*, 2003; 36: 323 – 331.
82. Kiliańska Z.M.: Apoptoza organizmów zwierzęcych. W: *Cytobiochemia*, red. Kłyszewko-Stefanowicz L., Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2002; 772-815, 919-930.
83. Kiliańska Z.M., Miśkiewicz A.: Kaspazy kręgowców; ich rola w przebiegu apoptozy. *Post. Biol. Kom.* 2003; 30: 129-150.

84. Kim Y. M., Kim T. H., Chung H. T., Talanian R. V., Yin X. M., Billiar T. R. Nitric oxide prevents tumor necrosis factor α -induced rat hepatocyte apoptosis by the interruption of mitochondrial apoptotic signaling through S-nitrosylation of caspase-8. *Hepatology*, 2000; 32: 770-778.
85. 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.*, 1997; 272: 31138-31148.
86. Kirszberg C., Rumjanek V.M., Capella M.A.: Methylene blue is more toxic to erytroleukemic cell than to normal peripheral blood mononuclear cells: a possible use in chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2005; 56: 659 – 665.
87. Kohler G., Milistein C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *J. Immunol.* 2005; 174: 2453-2455.
88. Korzeniowska – Dyl I.: Kaspazy – nowy cel w terapii przeciwzapalnej i przeciwnowotworowej. *Pol. Merk. Lek.*, 2008; XXIV, 139: 5-8.
89. Kostka-Trąbka E: Arginina – znany aminokwas o nowych możliwościach zastosowań klinicznych. *Ordynator Leków* 2002; 3: 15–19.
90. Krebs H.A., Henseleit H.: Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. *Z. Physiol. Chem.* 1932; 210:33-66.
91. Kronon M.T., Allen B.S., Halldorsson A., Rahman S., Wang T., Ilbawi M.: Dose dependency of L-arginine in neonatal myocardial protection: the nitric oxide paradox. *Thorac.Cardiovasc.Surg.*, 1999; 118: 655-664.
92. Krzyżowska M.: Regulatorowa rola tlenu azotu w apoptozie, *Post. Biol. Kom.* 2005; 32: 633 – 646.
93. Kusters J.G., van Vliet A.H., Kuipers E.J.: Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Cli. Microbiol. Rev.*, 2006; 19: 449-490.
94. Kuźlik R.: Zastosowanie nitrogliceryny jako donora tlenu azotu we współczesnym położnictwie. *Przegląd Ginek.-Położ.*, 2005; 5(4).
95. Kuo P. C., Slivka A.: Nitric oxide decreases oxidant-mediated hepatocyte injury. *J. Surg. Res.*, 1994; 56:594–600.
96. Kwon Y.G., Min J.K., Kim K.M., Lee D.J., Billiar T.R., Kim Y.M.: Sphingosine 1-phosphate protects human umbilical vein endothelial cells from serum-deprived apoptosis by nitric oxide production. *J.Biol.Chem.*, 2000; 276: 10627-10633.

97. Lampariello C., De Blasio A., Merenda A. i wsp.: Use of arginine in intrauterine growth retardation (IUGR). *Minerva Ginecol.*, 1997; 4(9): 577–581.
98. Laskowska E.: Małe białka szoku termicznego-rola w apoptozie, karcynogenezie i chorobach związanych z agregacją białek. *Postępy Bioch.*, 2007; 53: 19-26.
99. Lee J., Ryu H., Ferrante RJ., Morris SM Jr., Ratan R.R.: Translational control of inducible nitric oxide synthase expression by arginine can explain the arginine paradox. *PNAS* 2003; 100: 4843–4848.
100. Lee N.M., Brady C.W. : Liver disease in pregnancy. *World J. Gastroenterol.* 2009; 15(8): 897-906.
101. Leszczyńska-Gorzela B., Poniedziałek-Czajkowska E. :Rzucawka w ciąży – aktualny problem kliniczny. *Perinatol. Neonatol. Ginekol.*, 2009; 2: 94-101.
102. Li J., Billiar T.R.: Nitric Oxide. IV. Determinants of nitric oxide protection and toxicity in liver. *Am.J.Physiol.*, 1999; 276(5): G1069-1073.
103. Li J., Billiar T.R.: The anti-apoptotic actions of nitric oxide in hepatocytes. *Cell Death Differ.*, 1999; 6: 952-955.
104. Li S.Q., Liang L.J.: Protective mechanism of L-arginine against liver ischemic-reperfusion injury in rats. *Hepatobiliary Pancreat.Dis. Int.*, 2003; 2(4): 549-552).
105. Lind D.S.: Arginine and cancer. *J. Nutr.*, 2004;134: 2837S-2841S.
106. Liu L., Stamler J.S.: NO: an inhibitor of cell death. *Cell Death Differ.*, 1999; 6: 937-942.
107. Liu Y., Song Y., Jiang H.: Role of nitric oxide in pathogenesis of pregnancy induced hypertension. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.*, 1997; 32(12): 738-741.
108. Lockshin R.A., Zakeri Z.: Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2001; 2: 545-550.
109. Lockshin R.A., Zakeri Z.: Apoptosis autophagy and more. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2004;36: 2405-2419.
110. Mackenzie I.S., Rutherford D., MacDonald T.M.: Nitric oxide and cardiovascular effects: new insights in the role of nitric oxide for the management of osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.*, 2008, 10, supl. 2, S3.
111. Madesh M., Ramachandran A., Balasurbramanian K.A.: Nitric oxide prevents anoxia-induced apoptosis in colonic HT29 cells. *Arch.Biochem.Biophys.*, 1999; 366: 240-248.
112. Maleck W.H., Piper S.N., Koetter K. Joseph Priestley, nitrous oxide and oxygen. *Anaesthetist*, 2005; 54: 395-396.

113. Mannick J.B., Hausladen A., Liu L., Hess D.T., Zeng M., Miao Q.X., Kane L.S., Gow A.J., Stamler J.S.: Fas-induced caspase denitrosylation. *Science*, 1999; 284: 651-654.
114. Marsh N., Marsh A. A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2000; 27: 313-319.
115. Martin L.J.: Neuronal cell death in nervous system development, disease, and injury. *Int J Mol Med* 2001; 7: 455 – 478.
116. Mielczarek-Putka M., Chrzanowska A., Graboń W., Barańczuk-Kuźma A.: Nowe oblicza arginazy. Część II. Rola w fizjologii i patologii. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2008; 62: 214-221.
117. Moncada S., Higgs A.: The L-arginine- nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.* 1993; 329 (27): 2002 – 2012.
118. Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A.: Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109–142.
119. Morris S.M. Jr: Arginine synthesis, metabolism and transport: regulators of nitric oxide synthesis. In: *Cellular and Molecular Biology of Nitric Oxide*. Editors: Laskin JD, Laskin DL, New York Dekker M., 1999: 57–85.
120. Mróz P., Młynarczuk I.: Mechanizmy indukcji apoptozy i zastosowanie TRAIL w terapii nowotworów. *Post. Biol. Kom.*, 2003; 30: 113–128.
121. Mungrue I.N., Brecht D.S., Stewart D.J., Husain M.: From molecules to mammals: what's NOS got to do with it? *Acta Physiol. Scand.*, 2003; 179: 123–135.
122. Muriel P.: Nitric oxide protection of rat liver from lipid peroxidation, collagen accumulation, and liver damage induced by carbon tetrachloride. *Biochem. Pharmacol.*, 1998; 56:773–779.
123. Muriel P.: Regulation of nitric oxide synthesis in the liver. *J. of Applied Toxicology.*, 2000; 20(3): 189-195.
124. Muscara M.N., Wallace J.L.: COX-inhibiting nitric oxide donors (CINODs):potential benefits on cardiovascular and renal function. *Cardiovasc. Hematol.Agents Med. Chem.*, 2006; 4(2): 155-164).
125. Muzio M., Salvesen GS., Dixit VM. i wsp.: FLICE induced apoptosis in a cell-free system. Cleavage of caspase zymogens. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 2952-2956.

126. Muzio M., Stockwell BR., Stennicke HR. i wsp.: An induced proximity model for caspase-8 activation. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 2926-2930.
127. Nahavandi A., Dehpour A.R., Mani A.R., Homayounfar H., Abdoli A.: N(G)-nitro-L-Arginine methylester is protective against ethanol-induced gastric damage in cholestatic rats. *European Journal of Pharmacology.*, 1999; 370(3): 283-286.
128. Nakagawa T., Hhu H., Morishima N. i wsp.: Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- β . *Nature*, 2000; 403: 98-103.
129. Nakayama M., Kawaguchi Y, Numata M., Hagesawa T., Hosoya T. : Role of nitric oxide in hypotension during hemodialysis. *Nephron* 1998; 79: 490-491
130. Nanji A.A., Greenberg S.S., Tahan S.R., et al.: Nitric oxide production in experimental alcoholic liver disease in the rat: role of protection from injury. *Gastroneterology*. 1995; 109(3): 899-907.
131. Orłowski W.: Nauka o chorobach wewnętrznych. Wydawnictwo Lekarskie PZWL W-wa 1992; VI: 238-338.
132. Ostrowski K.: Histologia. Wydawnictwo Lekarskie PZWL W-wa, 1995: 669-670.
133. Ou J., Carlos T. M., Watkins S. C., Saavedra J. E., Keefer L. K., Kim Y. M., Harbrecht B. G., Billiar T. R.: Differential effects of nonselective nitric oxide synthase (NOS) and selective inducible NOS inhibition on hepatic necrosis, apoptosis, ICAM-1 expression, and neutrophil accumulation during endotoxemia. *Nitric Oxide.*, 1997; 1: 404–416.
134. Ozsoy Y., Ozsoy M., Coskun T., Namli K., Var A., Ozyurt B.: The effects of L-arginine on liver damage in experimental acute cholestasis an immunohistochemical study. *HPB Surg*. 2011;2011:306069.Epub 2011 Jun1.
135. Palmer R.M., Ashton D.S., Moncada S.: Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.*, 1988; 333: 664 –666.
136. Panther., Blum H.E.: Liver disease in pregnancy. *Dtsch. Med. Wochenscher.*, 2008; 133: 2283-2287.
137. Pardej A., Gryboś M., Kubicki J., Gamian A., Guzikowski W.: Arginina i cytrulina a hypotrofia płodu – część II. *Gin Poł Med. Project* 2009; 1 (11): 11-16.

138. Pardej A., Gryboś M., Kubicki J., Gamian A., Guzikowski W.: Leczenia L-argininą hypotrofii płodu, *Gin. Poł. Med. Project* 2009; 3 (13): 57- 62.
139. Pedrycz A., Kot K., Olesiński J.: Immunohistochemical evaluation of caspase 3 expression in rats hepatocytes after L-arginine therapy. *Bull Vet. Inst. Puławy.*, 2010; 54: 101-103.
140. Pedrycz A., Zając G., Zwierzyński M., Zając A.: Ocena receptorowej drogi programowanej śmierci komórek nabłonka kanalików nerkowych indukowanej zmianami hormonalnymi w przebiegu ciąży. *Current Problems of Psychiatry.*, 2011; 12(2): 217-220.
141. Pedrycz A., Zwierzyńska E., Orłowski M., Zając A., Zwierzyński M.: Ocena mitochondrialnej drogi indukcji sygnału do apoptozy wywołanej L-argininą w hepatocytach szczura. *Current Problems of Psychiatry.*, 2011; 12(2): 213-216.
142. Peng Y., Gallagher S.F., Haines K., Baksh K., Murr M.M.: Nuclear Factor-kappaB Mediates Kupffer Cell Apoptosis Through Transcriptional Activation of Fas/FasL. *J. Surg. Res.*, 2006; 130: 58-65.
143. Peralta C., Hotter G., Closa D., Gelpi E., Bulbena O., Rosello-Catafau J.: Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia –reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology.* 1997; 25(4): 934-937.
144. Pereira S.P., O'Donohue J., Wendon J., (et al.): Maternal and perinatal outcome in severe pregnancy-related liver disease. *Hepatology.*, 1997; 26:1258-1262.
145. Pinkus G.S.: Diagnostic immunocytochemistry of paraffin – embedded tissues. *Hum Pathol.* 1982; 13: 411-415.
146. Przybylski J.: Światło na NO., *Wiedza i życie*, 2001; 6 (<http://archiwum.wiz.pl/2001/01062800.asp>).
147. Raff U., Schneider R., Gambaryan S., Seibold S., Reber M., Vornberger N., Freund R., Schramm L., Wanner C., Galle J.: L-arginine does not affect renal morphology and cell survival in ischemic acute renal failure in rats. *Nephron. Physiol.*, 2005; 101: p39-p50.
148. Raghavan S.A.V., Dikshit M.: Vascular regulation by the L-arginine metabolites, nitric oxide and agmatine. *Pharmacol. Res.*, 2004; 49: 397–414.

149. Ramsay B., Sooranna S.R., Johnson M.R.: Nitric oxide synthase activities in human myometrium and villous trophoblast pregnancy. *Obstet. Gynecol.*, 1996; 87: 249 – 253.
150. Rang H. P., Dale M. M., Ritter J. M.: Biosynthesis of nitric oxide and its control. W: *Pharmacology (Third Ed.)* Churchill Livingstone 2000: 203 – 213.
151. Rao R.V., Castro-Obregon S., Frankowski H. i wsp.: Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: An Apaf-1 independent intrinsic pathway. *J. Biol. Chem.*, 2002; 227: 21836-21842.
152. Reed J.C.: Mechanisms of apoptosis. *Am. J. Pathol.*, 2000; 157: 1415-1430.
153. Ronin-Walknowska E.: Cholestaza ciężarnych-choroba niedoceniona. *Przegląd piśmiennictwa. Perinat., Neonat. I Ginek.* 2010; 3(3): 165-174.
154. Rosselli M., Keller P.J., Dubey R.K.: Role of nitric oxide in biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Hum. Reprod. Update*, 1998; 4: 3–24.
155. Roy N., Deveraux Q.L., Takahashi R., Salvesen G.S., Reed J.C.: The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J.*, 1997; 16: 6914–6925.
156. Ruano R., Fontes R.S., Zugaib M.: Prevention of preeclampsia with low-dose aspirin – a systematic review and meta-analysis of the main randomized controlled trials. *Clinics.*, 2005; 60: 407-414.
157. Rytlewski K.: Zmiany fizjologiczne w organizmie kobiety ciężarnej I ich znaczenie w praktyce lekarza ogólnego. *Przegląd Lekarski*, 2008; 65(4): 195-202.
158. 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. *Eu.J.Clin.Invest.*, 2005; 35(1): 32-37.
159. Rytlewski K., Olszanecki R., Lauterbach R. et al. Effects of oral L-arginine on the pulsatility indices of umbilical artery and middle cerebral artery in preterm labor. *Eu. J. Obst. Gyn. Reprod.Biol.*, 2008; 138: 23-28.
160. Rytlewski K., Olszanecki R., Zdebski Z.: Badania kliniczne nad znaczeniem egzogennej L-argininy w przebiegu ciąży. W: Z. Zdebski, R. Lauterbach, K. Rytlewski, J. Tomaszczyk (red.): *Probl. Perinat. Klin.*, Wydawnictwo Studio PIN, Kraków 2001: 308-323.

161. Rytlewski K., Zdebski Z.: Cięża a tlenek azotu – wybrane zagadnienia ogólne., Medipress Ginekologia 1997, III wyd.: 2-5.
162. Rytlewski K., Zdebski Z.: Nitric oxide - one of the mechanisms that prevent changes that occur during pregnancy. *Gin. Pol.*, 2001; 72: 738-743.
163. Saleh M., Vaillacourt J.P., Graham R.K. i wsp.: Differential modulation of endotoxin response by human caspase-12 polymorphism. *Nature*, 2004; 429: 75-79.
164. Sawicki. W.: *Histologia*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL W-wa. 2009: 503-510.
165. Scaffidi C., Fulda S., Srinivasan A., Friesen C., Li. F., Tomaselli K.J., Debatin K.M., Krammer P.H., Peter M.E.: Two CD 95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.*, 1998; 17: 1675–1687.
166. Schmitt E., Gehrmann M., Brunet M., Multhoff G., Garrido C.: Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J. Leukoc. Biol.*, 2007; 81: 15-27.
167. Shiraishi H., Okamoto H., Yoshimura A., Yoshida H.: ER stress-induced apoptosis and caspase-12 activation occurs downstream of mitochondrial apoptosis involving Apaf-1. *J. Cell Sci.*, 2006; 119: 3958–3966 .
168. Singh R., Pervin S., Chaudhuri G.: Caspase-8-mediated BID cleavage and release of mitochondrial cytochrome c during Nomega-hydroxy-L-arginine induced apoptosis in MDA-MB-468 cells. Antagonistic effects of L-ornithine. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 37630-37636.
169. Skotnicka E.: Apoptoza – krótkie wprowadzenie. 2003: <http://bioinfo.mol.uj.edu.pl/articles/Skotnicka03>
170. Skrzypulec-Plinta V., Droszol A., Rozmus-Warcholińska W., Michalski M.: Arginina – nowe kierunki oraz możliwości zastosowania w ginekologii i położnictwie., 2010; 1(15): 52-55.
171. Smolewski P.: Rola kaspaz w procesie apoptozy. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2003; 57:335-354.
172. Soeters P.B., Hallemeesch M.M., Bruins M.J., Van Eijk H.M.H., Deutz N.E.P.: Quantitative in vivo assessment of arginine utilization and nitric oxide production in endotoxemia. *Am.J.of Surg.*, 2002; 183(4): 480-488.

173. Solomon S., Mpoke S.S., Wolfe J.: Differential staining of apoptotic nuclei in giving cell: Application to macronuclear elimination in tetrahymena. *J. Histochem. Cytochem.*, 1997; 45: 675 – 684.
174. Stankiewicz A.R., Lachapelle G., Foo C.P., Radicioni S.M., Mosser D.D.: Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 38729-38739.
175. Stevens A., Lowe J.: *Histologia człowieka*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL W-wa 2000;12: 217 – 221.
176. Stuehr D.J., Marletta M.A.: Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia Coli lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad Sci. USA*, 1985; 82: 7738-7742.
177. Sulejczak D: Apoptoza i metody jej identyfikacji. *Post Biol Kom* 2000; 27: 527-568.
178. Ścibor D., Czeczot H.: Arginina – metabolizm i funkcje w organizmie człowieka. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 2004; 58:321-332.
179. Świtalska M., Strządała L.: Niegenomowe działanie estrogenów. *Post. Hig. Med. Dosw.* 2007; 61: 541-547.
180. Takayama S., Reed J.C., Homma S.: Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. *Oncogene*, 2003; 22: 9041-9047.
181. Tatoyan A., Giulivi C.: Purification and characterization of a nitric-oxide synthase from rat liver mitochondria. *J.Biol. Chem.*, 2008;273: 11044-11048.
182. Thornberry N.A., Bull H.G., Calaycay J.R. i wsp.: A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 processing in monocytes. *Nature*, 1992; 356: 768-774.
183. Tong B.C., Barbul A.: Cellular and physiological effects of arginine. *Mini Rev. Med. Chem.*, 2004; 4: 823–832.
184. Török N.J., Higuchi H., Bronk S., Gores G.J.: Nitric oxide inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release by nitrosylating caspase. *Cancer Res.*, 2002; 62: 1648-1653.
185. Tousoulis D., Antoniadis C., Tentolouris C., Goumas G., Stefanadis C., Toutouzias P.: L-arginine in cardiovascular disease: dream or reality? *Vasc. Med.*, 2002; 7: 203–211.
186. Wang G.S., Liu G.T.: Role of nitric oxide in immunological liver damage in mice. *Biochemical Pharmacology*. 1995; 49(9): 1277- 1281.

187. Wimalawansa S.J.: Nitric oxide: new evidence for novel therapeutic indications. *Expert Opin. Pharmacother.*, 2008; 9(11): 1935-1954.
188. Windmueller H.G.: Source and fate of circulating citruline. *Am. J. Physiol.*, 1981; 241: E473-480.
189. Wolter K.G., Hsu Y.T., Smith C.L., Nechushtan A., Xi X.G., Youle R.J.: Movement of BAX from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J. Cell Biol.*, 1997; 139: 1281-1292.
190. Wrzesień-Kuś A., Smolewski P., Sobczak-Pluta A., Wierzbowska A., Robak T.: The inhibitor of apoptosis protein family and its antagonists in acute leukemias. *Apoptosis*, 2004; 9: 705–715.
191. Wu G., Meininger C.J.: Arginine nutrition and cardiovascular function. *J. Nutr.*, 2000; 130: 2626–2629.
192. Wu G., Meininger C.J., Knabe D.A., Bazer F.W., Rhoads J.M.: Arginine nutrition in development, health and disease. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 2000; 3: 59 –66.
193. Wu G., Morris SM Jr: Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem. J.*, 1998; 336: 1-17 .
194. Wyllie A.H. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer Metastasis Rev.*, 1992; 11: 95-103.
195. Wys M., Kaddurah-Daouk R.: Creatine and creatinine metabolism. *Physiol. Rev.*, 2000; 80: 1107 – 1113.
196. Vallance P., Leone A., Calver A. i wsp.: Accumulation of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet*, 1992,;339 (8793): 572 – 575.
197. Vallance P., Collier J.: Biology and clinical relevance of nitric oxide. *Brit. Med. J.*, 1994; 309: 453 – 457.
198. Vanderlelie J.J., Perkins A.V.: Chronic nitric oxide synthase inhibition in pregnant rats does not result in placental oxidative stress. *Hypertens. Pregnancy.*, 2006; 25(2): 103-114).
199. Vousden K.H.: Activation of the p53 tumor suppressor protein. *Biochim. Biophys. Acta*, 2002; 1602: 47–59.
200. Vousden K.H., Prives C.: P53 and prognosis: new insights and further complexity. *Cell*, 2005; 120: 7–10.
201. Young B., Lowe J.S., Stevens A., Heath J.W. : Wheater Histologia Podręcznik i atlas. Elsevier Urban&Partner Wrocław. 2006: 42-44.

202. Yuste V.J., Sanchez-Lopez I., Moubarak R.S., Bayascas J.R., Dolcet X., Encinas M., Susin S.A., Cornella J.X.: The contribution of apoptosis-inducing factor, caspase-activated Dnase, and inhibitor of caspase-activated Dnase to the nuclear phenotype and DNA. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 35670-83.
203. Zamłyński J., Olejek A., Więcek A., Mańka G., Chudek J., Bodzek P., Damasiewicz-Bodzek A.: Wpływ zmian metabolicznych w ciąży prawidłowej i powikłanej cukrzycą na wewnątrzmaciczne wzrastanie płodu., *Post Hig Med. Dosw*, 2005;59:490-495.
204. Zdebski Z., Gryglewski R.J., Rytlewski K. : L-arginin in pregnancy complicated by hypertension – a preliminary report. *J. Drug Dev. Clin. Pract.* 1996; 7: 327-330
205. Zdziarski P.: Transplantacja komórkowa- alternatywa dla ortotopowego przeszczepu wątroby. *Pol. Merk. Lek.*2007; XXIII, 136:297-301.
206. Zhao C., Wang E.: Heat shock protein 90 suppresses tumor necrosis factor a induced apoptosis by preventing the cleavage of Bid in NIH3T3 fibroblasts. *Cell Sign.*, 2004; 16: 313-321.
207. Zong W.X., Li C., Hatzuvassiliou G. i wsp.: Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J. Cell. Biol.*, 2003; 162: 59 – 69.

11. SPIS FOTOGRAFII

Fot. nr 1. GRUPA KONTROLNA VI. Fragment wątroby ciężarnej samicy szczura dekapitowanej 10 dnia po okoceniu.....	38
Fot. nr 2. GRUPA KONTROLNA VII. Fragment wątroby nieciążarnej samicy szczura dekapitowanej 30 dnia trwania doświadczenia.....	39
Fot. nr 3. GRUPA DOŚWIADCZALNA III. Fragment wątroby ciężarnej samicy szczura, której podano L-argininę i dekapitowano 20 dnia ciąży.	40
Fot. nr 4. GRUPA DOŚWIADCZALNA V. Fragment wątroby ciężarnej samicy szczura, której podano L-argininę i dekapitowano 10 dnia po okoceniu.	41
Fot. nr 5. GRUPA KONTROLNA II. Fragment wątroby ciężarnej samicy szczura dekapitowanej 10 dnia ciąży.....	43
Fot. nr 6. GRUPA KONTROLNA IV. Fragment wątroby ciężarnej samicy szczura dekapitowanej 20 dnia ciąży.....	44
Fot. nr 7. GRUPA DOŚWIADCZALNA I. Fragment wątroby ciężarnej samicy szczura, której podano L-argininę i dekapitowano 10 dnia ciąży.	45
Fot. nr 8. GRUPA KONTROLNA II. Nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 3 we fragmencie wątroby ciężarnej samicy szczura badanej 10 dnia ciąży. Barwienie H+AEC...51	
Fot. nr 9. GRUPA KONTROLNA IV. Nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 3 we fragmencie wątroby ciężarnej samicy szczura badanej 20 dnia ciąży. Barwienie H+AEC.	52
Fot. nr 10. GRUPA KONTROLNA VI. Średnio nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 3 we fragmencie wątroby samicy szczura badanej 10 dnia po okoceniu. Barwienie H+AEC.....	52
Fot. nr 11. GRUPA KONTROLNA VII. Średnio nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 3 we fragmencie wątroby nieciążarnej samicy szczura. Barwienie H+AEC.	53
Fot. nr 12. GRUPA DOŚWIADCZALNA I. Nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 3 we fragmencie wątroby ciężarnej samicy szczura badanej 10 dnia ciąży. Barwienie H+AEC.....	55
Fot. nr 13. GRUPA DOŚWIADCZALNA III. Średnio nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 3 we fragmencie wątroby ciężarnej samicy szczura badanej 20 dnia ciąży. Barwienie H+AEC.....	56

Fot. nr 14. GRUPA DOŚWIADCZALNA V. Średnio nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 3 we fragmencie wątroby samicy szczura badanej 10 dnia po okoceniu. Barwienie H+AEC.	56
Fot. nr 15. GRUPA KONTROLNA II. Średnio nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 8 we fragmencie wątroby ciężarnej samicy szczura oglądanej 10 dnia ciąży. Barwienie H+AEC.....	61
Fot. nr 16. GRUPA KONTROLNA IV. Średnio nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 8 we fragmencie wątroby ciężarnej samicy szczura oglądanej 20 dnia ciąży. Barwienie H+AEC.....	61
Fot. nr 17. GRUPA KONTROLNA VI. Słabo nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 8 we fragmencie wątroby samicy szczura oglądanej 10 dnia po okoceniu. Barwienie H+AEC.....	62
Fot. nr 18. GRUPA KONTROLNA VII. Słabo nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 8 we fragmencie wątroby nieciężarnej samicy szczura. Barwienie H+AEC.	62
Fot. nr 19. GRUPA DOŚWIADCZALNA I. Średnio nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 8 we fragmencie wątroby ciężarnej samicy szczura oglądany 10 dnia ciąży. Barwienie H+AEC.....	65
Fot. nr 20. GRUPA DOŚWIADCZALNA III. Średnio nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 8 we fragmencie wątroby ciężarnej samicy szczura oglądany 20 dnia ciąży widoczny w cytoplazmie hepatocytów, nieobecny w cytoplazmie komórek śródbłonna żyły centralnej. Barwienie H+AEC.	65
Fot. nr 21. GRUPA DOŚWIADCZALNA V. Słabo nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 8 we fragmencie wątroby ciężarnej samicy szczura oglądany 10 dnia po okoceniu. Barwienie H+AEC.....	66
Fot. nr 22. GRUPA KONTROLNA II. Fragment wątroby ciężarnej samicy szczura oglądany 10 dnia ciąży. Nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 9. Barwienie H+AEC.....	70
Fot. nr 23. GRUPA KONTROLNA IV. Fragment wątroby ciężarnej samicy szczura oglądany 20 dnia ciąży. Nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 9. Barwienie H+AEC.....	71
Fot. nr 24. GRUPA KONTROLNA VI. Fragment wątroby samicy szczura oglądany 10 dnia po okoceniu. Średnio nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 9. Barwienie H+AEC.....	71
Fot. nr 25. GRUPA KONTROLNA VII. Fragment wątroby nieciężarnej samicy szczura. Średnio nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 9. Barwienie H+AEC.....	72

Fot. nr 26. GRUPA DOŚWIADCZALNA I. Fragment wątroby ciężarnej samicy szczura oglądany 10 dnia ciąży. Nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 9. Barwienie H+AEC.....	74
Fot. nr 27. GRUPA DOŚWIADCZALNA III. Fragment wątroby ciężarnej samicy szczura oglądany 20 dnia ciąży. Średnio nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 9. Barwienie H+AEC.....	75
Fot. nr 28. GRUPA DOŚWIADCZALNA V. Fragment wątroby samicy szczura oglądany 10 dnia po okoceniu. Średnio nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 9. Barwienie H+AEC.....	75
Fot. nr 29. GRUPA KONTROLNA II. Nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 12 we fragmencie wątroby ciężarnej samicy szczura badanej 10 dnia ciąży. Barwienie H+AEC.	80
Fot. nr 30. GRUPA KONTROLNA IV. Średnio nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 12 we fragmencie wątroby ciężarnej samicy szczura badanej 20 dnia ciąży. Barwienie H+AEC.....	80
Fot. nr 31. GRUPA KONTROLNA VI. Słabo nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 12 we fragmencie wątroby ciężarnej samicy szczura badanej 10 dnia po okoceniu. Barwienie H+AEC.....	81
Fot. nr 32. GRUPA KONTROLNA VII. Słabo nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 12 we fragmencie wątroby nieciężarnej samicy szczura. Barwienie H+AEC.	81
Fot. nr 33. GRUPA DOŚWIADCZALNA I. Słabo nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 12 we fragmencie wątroby ciężarnej samicy szczura badanej 10 dnia ciąży. Barwienie H+AEC.....	84
Fot. nr 34. GRUPA DOŚWIADCZALNA III. Słabo nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 12 we fragmencie wątroby ciężarnej samicy szczura badanej 20 dnia ciąży. Barwienie H+AEC.....	84
Fot. nr 35. GRUPA DOŚWIADCZALNA V. Słabo nasilony odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 12 we fragmencie wątroby nieciężarnej samicy szczura. Barwienie H+AEC.....	85

12. SPIS WYKRESÓW

Wykres nr 1. Porównanie średniej ilości komórek apoptotycznych na 100 w polu widzenia w grupach kontrolnych	47
Wykres nr 2. Porównanie średniej ilości komórek apoptotycznych na 100 w polu widzenia w grupach doświadczalnych.....	48
Wykres nr 3. Porównanie średniej ilości komórek apoptotycznych na 100 w polu widzenia w grupach kontrolnych i doświadczalnych.	50
Wykres nr 4. Porównanie średniej ilości komórek apoptotycznych na 100 w polu widzenia w grupach kontrolnych i doświadczalnych.	50
Wykres nr 5. Porównanie średniego pola powierzchni w μm^2 zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 3 w grupach kontrolnych.	54
Wykres nr 6. Porównanie średniego pola powierzchni w μm^2 zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 3 w grupach doświadczalnych.	58
Wykres nr 7. Porównanie średniego pola powierzchni w μm^2 zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 3 w grupach kontrolnych i doświadczalnych.	59
Wykres nr 8. Porównanie średniego pola powierzchni w μm^2 zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 3 w grupach kontrolnych i doświadczalnych.	60
Wykres nr 9. Porównanie średniego pola powierzchni w μm^2 zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 8 w grupach kontrolnych.	64
Wykres nr 10. Porównanie średniego pola powierzchni w μm^2 zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 8 w grupach doświadczalnych.	67
Wykres nr 11. Porównanie średniego pola powierzchni w μm^2 zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 8 w grupach kontrolnych (strona lewa) i doświadczalnych (strona prawa).....	69
Wykres nr 12. Porównanie średniego pola powierzchni w μm^2 zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 8 w grupach kontrolnych i doświadczalnych.	69
Wykres nr 13. Porównanie średniego pola powierzchni w μm^2 zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 9 w grupach kontrolnych.	73
Wykres nr 14. Porównanie średniego pola powierzchni w μm^2 zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 3 w grupach doświadczalnych.	77
Wykres nr 15. Porównanie średniego pola powierzchni w μm^2 zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 9 w grupach kontrolnych i doświadczalnych.	78

Wykres nr 16. Porównanie średniego pola powierzchni w μm^2 zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 9 w grupach kontrolnych i doświadczalnych.	79
Wykres nr 17. Porównanie średniego pola powierzchni w μm^2 zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 12 w grupach kontrolnych.	83
Wykres nr 18. Porównanie średniego pola powierzchni w μm^2 zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 12 w grupach doświadczalnych.	86
Wykres nr 19. Porównanie średniego pola powierzchni w μm^2 zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 12 w grupach kontrolnych i doświadczalnych.	88
Wykres nr 20. Porównanie średniego pola powierzchni w μm^2 zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 12 w grupach kontrolnych i doświadczalnych.	88

13. SPIS TABEL

Tabela nr 1. Zestawienie grup.....	31
Tabela nr 2. Średnia ilość komórek apoptotycznych na 100 w polu widzenia w grupach kontrolnych. Odchylenie standardowe i One Way ANOVA test.	46
Tabela nr 3. Istotność statystyczna różnic pomiędzy badanymi grupami kontrolnymi w średniej ilości komórek apoptotycznych na 100 komórek w polu widzenia. Test t-studenta.....	46
Tabela nr 4. Średnia ilość komórek apoptotycznych na 100 w polu widzenia w grupach doświadczalnych. Odchylenie standardowe i One Way ANOVA test.....	47
Tabela nr 5. Istotność statystyczna różnic pomiędzy badanymi grupami doświadczalnymi w średniej ilości komórek apoptotycznych na 100 w polu widzenia. Test t-studenta.	48
Tabela nr 6. Istotność statystyczna różnic pomiędzy badanymi grupami kontrolnymi i doświadczalnymi w średniej ilości komórek apoptotycznych na 100 w polu widzenia. Test t-studenta.	49
Tabela nr 7. Średnie pole powierzchni w μm^2 zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 3 na badanej powierzchni: $781193,35 \mu\text{m}^2$ w grupach kontrolnych. Odchylenie standardowe i One Way ANOVA test.	53
Tabela nr 8. Istotność statystyczna różnic pomiędzy badanymi grupami kontrolnymi w średnim polu powierzchni zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 3. Test t-studenta.	54
Tabela nr 9. Średnie pole powierzchni w μm^2 zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 3 na badanej powierzchni: $781193,35 \mu\text{m}^2$ w grupach doświadczalnych. Odchylenie standardowe i One Way ANOVA test.....	57
Tabela nr 10. Istotność statystyczna różnic pomiędzy badanymi grupami doświadczalnymi w średnim polu powierzchni zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 3. Test t-studenta.	57
Tabela nr 11. Istotność statystyczna różnic pomiędzy badanymi grupami kontrolnymi i doświadczalnymi w średnim polu powierzchni zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 3. Test t-studenta.	59
Tabela nr 12. Średnie pole powierzchni w μm^2 zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 8 na badanej powierzchni: $781193,35 \mu\text{m}^2$ w grupach kontrolnych. Odchylenie standardowe i One Way ANOVA test	63

Tabela nr 13. Istotność statystyczna różnic pomiędzy badanymi grupami kontrolnymi w średnim polu powierzchni zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 8. Test t-studenta.	63
Tabela nr 14. Średnie pole powierzchni w μm^2 zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 8 na badanej powierzchni: $781193,35 \mu\text{m}^2$ w grupach doświadczalnych. Odchylenie standardowe i One Way ANOVA test.....	66
Tabela nr 15. Istotność statystyczna różnic pomiędzy badanymi grupami doświadczalnymi w średnim polu powierzchni zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 8. Test t-studenta.	67
Tabela nr 16. Istotność statystyczna różnic pomiędzy badanymi grupami kontrolnymi i doświadczalnymi w średnim polu powierzchni zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 8. Test t-studenta.	68
Tabela nr 17. Średnie pole powierzchni w μm^2 zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 9 na badanej powierzchni: $781193,35 \mu\text{m}^2$ w grupach kontrolnych. Odchylenie standardowe i One Way ANOVA test.	72
Tabela nr 18. Istotność statystyczna różnic pomiędzy badanymi grupami kontrolnymi w średnim polu powierzchni zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 9. Test t-studenta.	73
Tabela nr 19. Średnie pole powierzchni w μm^2 zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 9 na badanej powierzchni: $781193,35 \mu\text{m}^2$ w grupach doświadczalnych. Odchylenie standardowe i One Way ANOVA test.....	76
Tabela nr 20. Istotność statystyczna różnic pomiędzy badanymi grupami doświadczalnymi w średnim polu powierzchni zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 9. Test t-studenta.	76
Tabela nr 21. Istotność statystyczna różnic pomiędzy badanymi grupami kontrolnymi i doświadczalnymi w średnim polu powierzchni zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 9. Test t-studenta.	78
Tabela nr 22. Średnie pole powierzchni w μm^2 zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 12 na badanej powierzchni: $781193,35 \mu\text{m}^2$ w grupach kontrolnych. Odchylenie standardowe i One Way ANOVA test.	82
Tabela nr 23. Istotność statystyczna różnic pomiędzy badanymi grupami kontrolnymi w średnim polu powierzchni zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 12. Test t-studenta.....	82

Tabela nr 24. Średnie pole powierzchni w μm^2 zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 12 na badanej powierzchni: 781193,35 μm^2 w grupach doświadczalnych. Odchylenie standardowe i One Way ANOVA test.....	85
Tabela nr 25. Test t-studenta – istotność statystyczna różnic pomiędzy badanymi grupami doświadczalnymi w średnim polu powierzchni zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 12.....	86
Tabela nr 26. test t-studenta – istotność statystyczna różnic pomiędzy badanymi grupami kontrolnymi i doświadczalnymi w średnim polu powierzchni zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 12.....	87