

THE EFFECT OF L-ARGININ ON THE HEPATIC ENZYMES IN RATS WITH BILE DUCT LIGATION

Nikola Jankulovski¹, Velimir Stojkovski² and Jordanka Dimovska³

¹Surgery Clinics, Medical Faculty, Vojnaska 17, MK-91000 Skopje, Macedonia

²Faculty of Veterinary Medicine, Lazar Pop Trajkov 5-7, MK-91000 Skopje, Macedonia

³Institute of Biology, Faculty of Natural Sciences, P.O.Box 162, MK-91001 Skopje, Macedonia

ЕФЕКТОТ НА L-АРГИНИНОТ ВРЗ ЦРНОДРОБНИТЕ ЕНЗИМИ КАЈ СТАОРЦИ СО ЛИГАЦИЈА НА ЖОЛЧНИТЕ ВОДОВИ

Никола Јанкуловски¹, Велимир Стојковски² и Јорданка Димовска³

¹Клиники за хируршки болести, Медицински факултет, Водњанска 17, МК-91000 Скопје

²Ветеринарен факултет, Лазар Поп Трајков 5-7, МК-91000 Скопје

³Институт за Биологија, Природно-математички факултет, п.ф. 162, МК-91001 Скопје

INTRODUCTION

Extrahepatic biliary obstruction, commonly seen in abdominal pathology needs early recognition and treatment of its causes. All the consequences of extrahepatic biliary obstruction are multisystemic and are not well defined yet. On the other site, there are numerous surgical complications with relatively high morbidity and mortality rate. Considerable effort has been made in the past for identification of the main factors responsible for morbidity and mortality in these patients. Moreover, animal studies showed the negative influence of obstructive jaundice on cardiovascular, renal and immunological function. (Carlos and al. 1987).

Duration of obstruction and correlation between immunological and biochemical alterations in patients with obstructive jaundice was subject of investigations of many authors (Agaev and al. 1989, Megison and al. 1991 and Watanapa 1996). Their common conclusion is that recovery of hepatocellular function (estimated by functional hepatobiliary testing) closely follow up the recovery of immunological function. All the authors are stressing out the importance of internal biliary drainage for quickest

ВОВЕД

Билијарната екстрахепатична опструкција, претставува честа појава во абдоминалната патологија и бара релативно брзо решавање на нејзината причина. Промените и последиците што настануваат заради стопиран проток на жолчка низ екстрахепатичните жолчни патишта во дигестивниот тракт се мултисистемски и се сеуште недоволно проучени. Од друга страна компликациите од оперативниот третман се многубројни, а морбидитетот и морталитетот се уште релативно високи. Значаен напор е направен во минатото за да се идентифицираат главните фактори кои придонесуваат за морталитетот и морбидитетот на овие пациенти. Уште повеќе, студиите на животни покажуваат дека опструктивната жолтица има негативни ефекти врз кардиоваскуларната, реналната и имунолошката функција (Carlos и сор., 1987).

Времетраењето на опструкцијата и корелацијата помеѓу имунолошките и биохемиските промени кај пациентите со опструктивна жолтица ги испитувале повеќе автори како, Agaev и сор. (1989), Megison и сор. (1991) и Watanapa (1996). Нивна заедничка констатација е дека враќањето на хепатоцелуларната функција, мерена со функционалните црнодробни тестови, паралелно го следи

recovery of immunological and biochemical parameters.

Recently, experimental models are becoming more and more commonly accepted for investigation of obstructive jaundice, particularly in regard to its noninvasive treatment. Moreover, studies on rats can be critically extrapolated to human population and can lead to clarification of many aspects of this condition.

Many substances, given orally or parenterally have been investigated for their effects on conditions related to obstructive jaundice. Some positive effects of lactulose (Greve and al. 1990), vitamin A (Karan and al. 1996), ursodeoxycholic acid (Hori and Ohyanagi 1997) and L-arginin have been reported.

The positive effect of L-arginin in literature has been explained as an immunomodulator (Kennedy and al. 1994) and in improving of hepatic biochemical parameters (Fiori and al. 1994).

Muriel and Gonzales (1998) investigated the alterations of the enzymes in rats with obstructive jaundice and the effect of L-arginin and L-NAME (NG-nitro-L-arginin). They found out that contrarily to L-NAME, pure L-arginin has favorable effect on all the enzyme markers in hepatic lesions.

Similarly, Mayoral and al. (1999) proved that nitric oxide is the key factor leading to hepatic fibrosis in rats after ligation of the common hepatic duct. Furthermore, they showed improvement in bilirubin concentration and normalization of hepatic serum enzyme markers in rats treated with L-arginin.

The particular interest of our investigation was the effect of L-arginin on the serum activity of specific hepatic enzymes in rats.

опоравувањето на имуната функција и сите автори ја потенцираат корисноста на интерната билијарна дренажа во однос на најбрзото нормализирање на имунолошките и биохемиските параметри.

Во последно време се повеќе се актуелизира воведувањето на експерименталните модели во истражувањата во врска со опструктивната жолтица и добар дел од нив се однесуваат на испитувањето на неинвазивниот третман на ваквата состојба. Од друга страна добиените резултати од испитувањата вршени на стаорци, со оглед на тоа што стаорецот и човекот се цицачи, можат критички да се екстраполираат во хуманата популација и да дадат свој придонес во разрешувањето на споменатите состојби.

Испитувани се повеќе супстанции внесени во организмот по ентерален и парентерален пат и нивното дејство врз состојбите предизвикани од опструктивната жолтица. Така на пример, констатирани се одредени позитивни ефекти на лактулозата (Greve и сор., 1990), витаминот А (Karan и сор., 1996), урсоеоксихолната киселина (Hori и Ohyanagi, 1997), L-аргининот и сл.

Литературните податоци укажуваат на дејството на L-аргининот врз две основи: како имуномодулатор (Kennedy и сор., 1994) и врз подобрување на хепатичните биохемиските параметри (Fiori и сор., 1994).

Muriel и Gonzalez (1998) ги испитувале промените на ензимскиот статус кај стаорци со опструктивен иктерус и ефектот на L-аргининот и L-NAME (NG-нитро-L-аргинин) и дошле до констатација дека за разлика од L-NAME, L-аргининот даден во чиста форма има корисен ефект врз сите ензимски маркери кај црнодробна лезија.

Слично на нив, дејството на L-аргининот и L-NAME го испитувале и Mayoral и сор. (1999) при што докажале дека азотниот оксид е клучниот фактор во развојот на црнодробната фибрози кај стаорци со лигиран главен жолчен вод. Исто така покажале дека кај стаорците третирани со L-аргинин доаѓа до подобрување на концентрацијата на билирубинот и нормализирање на серумските ензимски маркери на црниот дроб.

Токму затоа, од посебен интерес во нашето истражување ќе биде ефектот на L-аргининот врз промената на активноста на специфичните црнодробни ензими во серумот на стаорец.

MATERIAL AND METHODS

In our study we included 27 Wistar male rats with body weight of 130 – 180 grams, raised in standard conditions for laboratory animals and fed ad libitum.

Animals were divided in three groups:

1. Control group (falsely operated);
2. Group with common bile duct ligation (BDL);
3. Group with ligation of common bile duct, treated with L-arginin (1 g/kg bw p.o.).

Surgery was performed after light ether narcosis with consecutive laparotomy, preparation and common bile duct ligation.

L-arginine was administered through orally placed gastric tube. Treatment was conducted on the first day of ligation and lasted for 14 days.

After the day 14th in the all animals blood samples were withdrawn for serum enzyme level measurements of alkali phosphatase (ALKP), alanin aminotransferase (ALT), aspartat aminotransferase (AST), gamma-glutamyl transpeptidase (GGT). All the measurements were done on the automated biochemical analyzer Vitros DT 60-II (Johnson & Johnson).

For the statistical analysis we used Student t-test and for statistical significance we considered p values less than 0.05.

RESULTS AND DISCUSION

Results of our study showed variations in the serum activity of specific hepatic enzymes in rats after BDL and treatment with L-arginin.

Specifically, we registered highly significant increasement of 138.7% ($p < 0.001$) of the activity of ALKP in rats with BDL in comparison with control group (155 ± 21 U/L in control to 370 ± 52 U/L in group with ligation) – fig.1. However, after the treatment with L-arginin in the appropriate group,

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

Во експериментот беа употребени 27 стаорци од машки пол од сојот Wistar, со телесна маса од 130 - 180 g, чувани во стандардни услови за лабораториски животни и хранети ad libitum.

Животните беа поделени на три експериментални групи:

1. контролна група (лажно оперирана);
2. група со лигација на главен жолчен вод (bile duct ligation - BDL),
3. група со лигација на главен жолчен вод и третирана со L-аргинин (1 g/kg т.м. р.о.).

Хируршката процедура кај животните беше вршена така што по воведувањето во лесна етерска наркоза беше правена лапаротомија, препарирање на главниот жолчен вод и негово лигирање.

L-аргининот беше администриран преку гастрична сонда која што беше пласирана *per os*. Третманот беше спроведен од првиот ден на лигирањето и траеше 14 дена).

По 14. ден кај сите животни беше земена крв за анализа и по издвоениот серум беа определувани следните ензими: алкална фосфатаза (ALKP), аланин аминотрансфераза (ALT), аспартат аминотрансфераза (AST), гама-глутамил транспептидаза (GGT). Анализите беа извршени на автоматскиот биохемиски анализатор Vitros DT 60-II (Johnson & Johnson).

Добиените резултати статистички беа анализирани со Student-овиот t-тест, при што како сигнификантни беа земени сите вредности каде што p беше помало од 0.05.

РЕЗУЛТАТИ СО ДИСКУСИЈА

Резултатите од испитувањата на ефектот на терапијата со L-аргинин врз активноста на специфичните црнодробни ензими во серумот на стаорец со BDL, покажуваат дека доаѓа до промени во сите испитувани параметри.

Имено, констатирано е високосигнификантно покачување од 138,7% ($p < 0,001$) на активноста на ALKP кај стаорците со BDL во споредба со контролната група и тоа од $155 \pm$

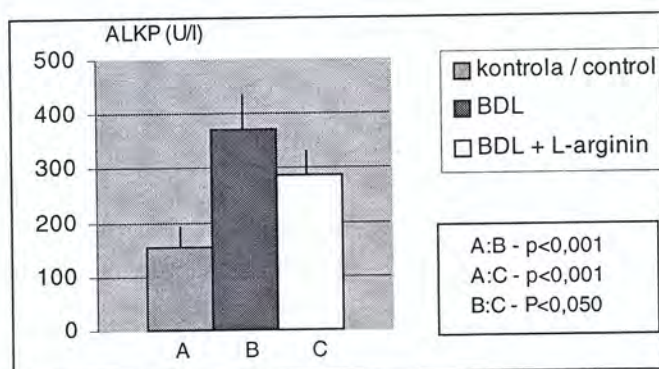


Fig. 1. The effect of treatment with L-arginin on the activity of serum ALKP in BDL rats

Сл. 1. Влијание на препрејманот со Л-аргинин врз активността на серумската ALKP кај BDL синаорци

we registered significant decrease to the value of 285 ± 32.0 U/L, that means 23.0% less in comparison to the group with BDL only ($p < 0.005$).

Evaluation of aminotransferases showed similar results considering both ALT and AST. As we can see on Fig. 2 and 3, after the ligation of common bile duct, the activity of ALT increases for 400% in regard to control group (from 38 ± 4.5 U/L to 38.5 U/L; $p < 0.001$), while the activity of AST for 253.3% in comparison with control (from 75 ± 11.2 U/L to 265 ± 41.5 U/L, $p < 0.001$). Also, after 14 day treatment with L-arginin there was decrease in the activity of both enzymes in comparison with the ones from the BDL group: for ALT 124 ± 21.3 U/L, 34.7%, $p < 0.025$ and for AST 189 ± 36.4 U/L, 28.7%, $p < 0.025$.

21 U/L кај контролата, на 370 ± 52 U/L кај групата со лигација (сл. 1). Меѓутоа, по третирањето со Л-аргинин кај третираната група доаѓа до сигнификантно намалување на вредноста на $285 \pm 32,0$ U/L, што е за 23,0% помала во однос на групата само со BDL ($p < 0,050$).

Што се однесува до испитувањата на аминотрансферазите (ALT и AST) двете покажуваат слични резултати. Како што се гледа на сл. 2 и 3 при лигација на жолчните водови активността на АЛТ се покачува за 400,0% во однос на контролната група (од $38 \pm 4,5$ U/L на $190 \pm 38,5$ U/L; $p < 0,001$), додека активността на АСТ за 253,3% во споредба со контролната група (од $75 \pm 11,2$ U/L на $265 \pm 41,5$ U/L, $p < 0,001$). Исто така по 14. дневниот третман со Л-аргинин, кај двата ензими дојде до опаѓање на вредностите во споредба со оние од BDL групата, и тоа кај АЛТ на $124 \pm 21,3$ U/L (34,7%; $p < 0,025$), а кај АСТ на $189 \pm 36,4$ U/L (28,7%; $p < 0,025$).

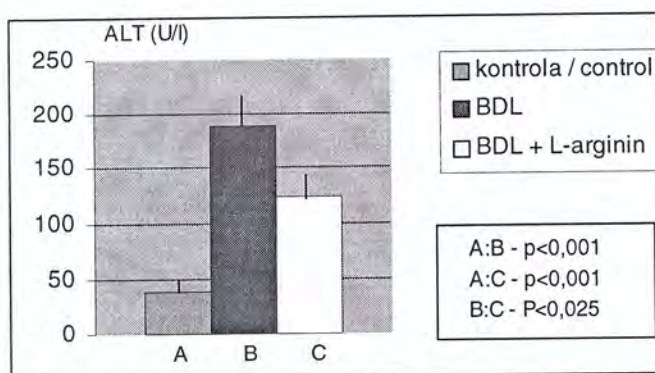


Fig. 2 The effect of treatment with L-arginin on the activity of serum ALT in BDL rats

Сл. 2 Влијание на препрејманот со Л-аргинин врз активността на серумската ALT кај BDL синаорци

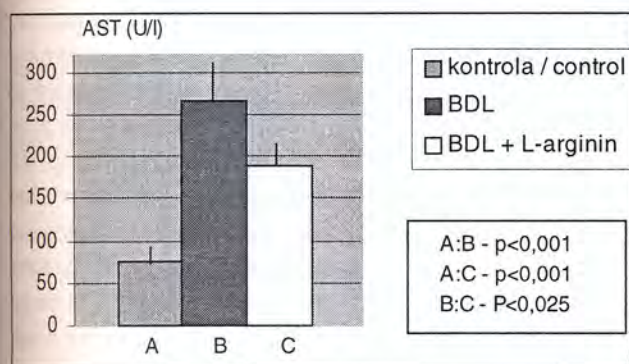


Fig. 3 The effect of treatment with L-arginin on the activity of serum AST in BDL rats

Сл. 3 Влијание на тирејманот со L-аргинин врз активносџа на серумската AST кај BDL сџаорци

Besides above-mentioned enzymes, we evaluated the levels of GGT as well. We have to point out that we were unable with the currently available technique to measure the activity of serum GGT in control group probably because of its very small value, that was not the case in the BDL group where we obtained value of 16 ± 4.1 U/L, that was considered statistically significant change (Fig.4). After the treatment with L-arginin there was significant decrease in the enzyme for 43.8% in comparison with BDL group.

Покрај споменатите ензими, во истражувањето беа мерени и вредностите на GGT. Треба да се напомене дека со техниката со која што располагаваме не бевме во можност да ги детектираме вредностите кај контролната група со оглед на нивните мали концентрации, што не беше случај со BDL групата кај која што добивме вредност од 16 ± 4.1 U/L, за што е евидентно дека станува збор за сигнификантна промена (сл. 4). По третманот со L-аргинин, дојде до сигнификантно намалување на вредностите на ензимот за 43,8% во споредба со групата само со BDL.

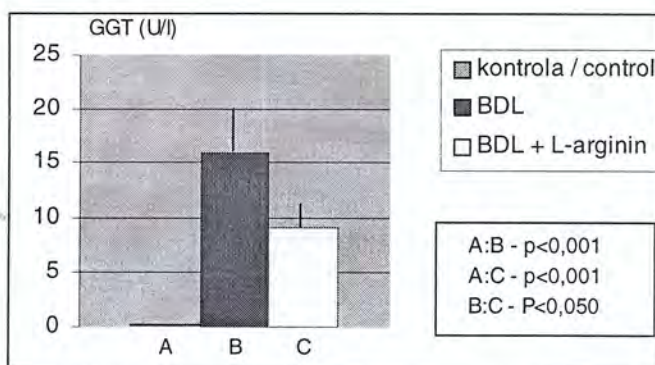


Fig.4 The effect of treatment with L-arginin on the activity of serum GGT in BDL rats

Сл. 4 Влијание на тирејманот со L-аргинин врз активносџа на серумската GGT кај BDL сџаорци

Eventhough there is marked improvement in diagnostic techniques and postoperative and perioperative care, patients with obstructive jaundice, still carry high morbidity and mortality risk after invasive diagnostic and therapeutic procedure. Most commonly reported complications included pure wound closure, gastrointestinal hemorrhage, coagulopathy, sepsis, renal damage, multisystem damage and death.

И покрај напредокот во дијагностичките техники и периоперативната и постоперативната грижа, пациентите со опструктивна жолтица имаат висок морбидитет и морталитет по инвазивни дијагностички и терапевтски процедури. Компликации кои се сретнуваат во литературата вклучуваат слабо зараснување на оперативната рана, гастроинтестинална хеморагија, коагулопатија, сепса, ренално оштетување, мултисистемски оштетувања на повеќе органи и смрт.

According to Kirk (1990), amino acid L-arginin has very complex anabolic and immunomodulatory effect given in pharmacological and supraphysiological doses. The initial studies from the same author in experimental animals, related to wound closure and dietary supplement of L-arginin, demonstrated thymus involution due to its damage and total mass increasement as well as stimulation of prolactin, growth hormone, insulin and glucagon secretion.

Our results after 14 days of treatment with L-arginin referred that this amino acid has favorable effects on the hepatic function, that can be estimated with the normalization of the activity of all specific hepatic enzymes. Muriel and Gonzalez (1998) have reported similar results where L-arginine was found to prevent the increase of enzyme markers of hepatic damage.

However, we would like to point out that more detailed research is needed to clarify our results in the light of complex mechanisms involved in alterations in specific enzymes after some medicaments and invasive procedures (Watanapa, 1996).

CONCLUSION

Several conclusions can be made from the evaluation of the effect of L-arginin on the changes in hepatic enzymes in the serum of rats after ligation of common bile duct.

1. Ligation of the common bile duct in rat leads to significant increase in the activity of specific hepatic enzymes in serum (ALKP, AST, ALT, GGT);

2. Treatment with L-arginin results in significant improvement with decrease of the level of evaluated enzymes in comparison with the group with BDL only;

3. The values of all examined enzymes in rats with BDL treated with L-arginin are significantly elevated in regard to the control group (falsely operated).

Според Kirk (1990), аминокиселината L-аргинин има комплексен анаболичен и имуномодулаторен ефект кога се дава во фармаколошки или супрафизиолошки дози. Иницијалните студии од истиот автор, кај експериментални животни кои се однесуваат на ефектот на диетарната суплементација со L-аргинин врз заздравувањето на раната покажуваат дека аминокиселината ја редуцира инволуцијата на тимусот која што е поврзана со оштетување и покачување на неговата маса, а исто така доведува и до стимулацијата на секрецијата на пролактин, хормонот на растот, инсулин и глукагон.

Нашите резултати од 14. дневниот третман со L-аргинин укажуваат на тоа дека оваа аминокиселина има одредени ефекти врз подобрувањето на функционалната состојба на црниот дроб, кое се гледа со тенденцијата кон нормализирање на активноста на сите испитувани црnodробни ензими. До слични констатации со нашите, дошле и Muriel и Gonzalez (1998), кои докажале дека L-аргининот го превенира покачувањето на ензимските маркери за црnodробно оштетувања.

Сепак, би сакале да напоменеме дека за комплетно објаснување на добиените резултати се потребни поподлабочени испитувања, со оглед на фактот што механизмите на покачување на специфичните ензими, како и нивното намалување по одредени медикаментозни или дренажни постапки, се комплексни (Watanapa, 1996).

ЗАКЛУЧОК

Од истражувањето на ефектот на L-аргининот врз промените на црnodробните ензими во серумот кај стаорци со лигација на главниот жолчен вод може да се заклучи следното:

1. Лигирањето на главниот жолчен вод кај стаорец доведува до сигнификантно покачување на вредностите на црnodробните ензими во серумот (ALKP, AST, ALT и GGT);

2. Третманот со L-аргинин доведува до значајно подобрување на состојбата, со намалување на нивото на испитуваните ензими во споредба со групата само со лигација;

Finally, we can make general conclusion that L-arginin can be used for prevention and temporary improvement of increased levels of hepatic enzymes, until definite treatment of cause of obstruction.

3. Вредностите на испитуваните ензими кај групата со лигација на главниот жолчен вод третирана со L-аргинин се сигнификантно повисоки во споредба со контролната група (лажно оперирана).

На крајот од овој труд може да се донесе општ заклучок дека L-аргининот може да се користи за превентивно и привремено подобрување на покачените вредности на ензимите, се до решавањето на главната причина за опструкција.

REFERENCES

- Agaev, B.A., Gadiev, S.I. and Gasanov, D.A. (1989) Immunologic reactivity of patients with obstructive jaundice of non-neoplastic etiology. *Khirurgiia (Mosk)*, **7**, 69-72.
- Carlos, A., Pellegrini, M.D., Piergiorgion Allegra, M.D., Frederic, S., Bongard, M.D., Lawrence, W. (1987) Risk of biliary surgery in patients with hyperbilirubinemia. *Biliary surgery and hyperbilirubinemia*, **154**: 111-117.
- Fiori, E., Atella, F., Gazzanelli, S., De Masi, E., Lamazza, A., Cangemi, V. and Piat, G. (1994) The usefulness of biliary drainage for restoring liver function in obstructive jaundice. *Panminerva Med*, **36(4)**: 171-178.
- Greve, J.W., Maessen, J.G., Tiebosch, T., Buurman, W.A. and Gouma, D.J. (1990) Prevention of postoperative complications in jaundiced rats. Internal biliary drainage versus oral lactulose. *Ann Surg*, **212(2)**: 221-227.
- Hori, Y. and Ohyanagi, H. (1997) Protective effect of the intravenous administration of ursodeoxycholic acid against endotoxemia in rats with obstructive jaundice. *Surg Today*, **27(2)**: 140-144.
- Karan, B., Kama, N.A., Hascelik, G., Ercan, M. (1996) Effects of vitamin A on immunological deficiencies in rats with obstructive jaundice. *Eur J Surg*, **162(3)**: 217-222.
- Kennedy, J.A., Kirk, S.J., McCrory, D.C., Halliday, M.I., Barclay, G.R., Rowlands, B.J. (1994) Modulation of immune function and weight loss by L-arginine in obstructive jaundice in the rat. *Br J Surg*, **81**: 1199-1201.
- Kirk, S.J., Barbul, A. (1990) A role of arginine in trauma, sepsis, and immunity. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, **14(Suppl)**: 226-229.
- Mayoral, P., Criado, M., Hidalgo, F., Flores, O., Arevalo, M.A., Eleno, N., Sanches-Rodriguea, A., Lopez-Novoa, J.M., Esteller, A. (1999) Effects of chronic nitric oxide activation or inhibition on early hepatic fibrosis in rats with bile duct ligation. *Clin Sci (Colch)*, **96**: 297-305.
- Megison, S.M., Dunn, C.W., Horton, J.W. and Chao, H. (1991) Effects of relief of biliary obstruction on mononuclear phagocyte system function and cell mediated immunity. *Br J Surg*, **78(5)**, 568-571.
- Muriel, P. and Gonzalez, P. (1998) Liver damage induced by acute cholestasis in the rat is ameliorated partially by L-arginine. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*, **120**: 421-4.
- Watanapa, P. (1996) Recovery patterns of liver function after complete and partial surgical biliary decompression. *Am J Surg*, **171(2)**, 230-234.