

**УДК 612.35 + 612.357.15**

## **ВПЛИВ L-АРГІНІНУ НА СПЕКТР ХОЛАТІВ У ЖОВЧІ ЩУРІВ**

***Бондзик О.В., Решетнік Є.М., Весельський С.П., Янчук П.І.***

*ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка,  
Київ, Україна  
E-mail: elena\_physiology@ukr.net*

В умовах гострого експерименту на щурах досліджувався вплив L-аргініну на спектр холатів у жовчі з використанням методу тонкошарової хроматографії. Показано, що L-аргінін (10 мг/кг, внутрішньопортально) викликав збільшення концентрації дигідроксихоланових вільних та кон'югованих з таурином жовчних кислот (порівняно з вихідним рівнем показників), разом з тим спостерігалось зменшення концентрації глікохолевої кислоти. L-аргінін на фоні блокади NO-синтаз за допомогою L-NAME (20 мг/кг) зумовлював збільшення концентрації кон'югованих жовчних кислот.

**Ключові слова:** L-аргінін, жовчні кислоти, L-NAME.

### **ВСТУП**

Численні джерела літератури свідчать про значні, переважно гепатопротективні властивості L-аргініну [1-6]. Виходячи з цього, інтенсивно вивчаються ефекти L-аргініну на різні біохімічні, цитологічні, гістологічні показники стану печінки та жовчовивідних шляхів за умов експериментальної патології різної етіології [6-8]. Наголошується на можливості зміни антиоксидантно-прооксидантної рівноваги за участю L-аргініну [9-12], його здатності впливати на білковий обмін при ураженні печінки [13], індукції ним цитохрому P-450 [8] та запобіганні апоптичній загибелі гепатоцитів при ішемії-реперфузії печінки [2]. Загалом, можна вважати, що L-аргінін, виявляючись залученим до цілої низки життєво важливих метаболічних процесів, здатен істотно змінювати функціонування гепато-біліарної системи людини і тварин. Провідним механізмом впливу аргініну на структурно-функціональний стан печінки при різних патологіях вважають перш за все те, що ця амінокислота виступає як субстрат для синтезу важливої поліфункціональної регуляторної сполуки – NO [1, 2, 6, 13]. В свою чергу, оксид азоту за фізіологічних умов виявляє цитопротекторну дію, забезпечує розширення судин у печінці, запобігає розвитку тромбозу, виступає у якості антиоксиданта, проте при надлишковому його утворенні виявляє цитотоксичну дію [14], а також виявляє гальмівний вплив на транспорт жовчних кислот у гепатоцитах [15].

Не зважаючи на все вищезазначене, питання про механізми дії L-аргініну на таку специфічну функцію печінки як жовчосекреторна лишається маловивченим. Значною мірою інтенсивність секреції жовчі об'єктивно свідчить про функціональний стан печінки, а зміни вмісту в жовчі специфічних органічних компонентів – жовчних кислот відображають перебіг багатьох обмінних процесів у гепатоцитах [16, 17].

Попередньо нами встановлено, що L-аргінін при внутрішньопортальному введенні у дозі 5 мг/кг виявляє гіпохолеретичну дію та змінює співвідношення жовчних кислот та ліпідів у жовчі [18]. Тому метою нашої подальшої роботи стало дослідження впливу L-аргініну на жовчосекреторну функцію печінки щурів як окремо, так і на тлі блокади NO-синтази за допомогою L-NAME.

#### **МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ**

Досліди проведено на білих щурах-самцях масою 200–300 г у гострих спробах. Під час досліду тварини перебували під тіопенталовим наркозом (6 мг/100 г, внутрішньочеревино). Для дослідження функції жовчовиділення здійснювали лапаротомію і канюлювання жовчної протоки. Через 30 хв. після канюлювання визначали вихідний рівень жовчовиділення шляхом збору трьох 10-хвилинних порцій жовчі. Після цього піддослідним щурам у ворітну вену болюсно вводили розчин L-аргініну (10 мг/кг маси тіла). Тваринам контрольної групи аналогічним способом вводили фізіологічний розчин (1мл/кг маси тіла). Для дослідження дії L-аргініну на фоні блокади NO-синтаз неселективний блокатор NO-синтаз L-NAME (20 мг/кг маси тіла) вводили внутрішньопортально за 5 хвилини до ін'єкції L-аргініну. Також варто зазначити, що інфузія L-аргініну безпосередньо у кров є набагато ефективнішою, ніж пероральний прийом, оскільки ця амінокислота погано всмоктується в кишечнику внаслідок метаболізування кишковою мікрофлорою [19].

У зібраних впродовж двох півгодинних проміжків досліду пробах жовчі визначали жовчні кислоти за методикою Весельського та ін. [20]. Цей метод дає змогу виявити в жовчі такі жовчні кислоти: кон'юговані таурохолеву (ТХК), таурохенодезоксихолеву і тауродезоксихолеву в суміші (ТХДХК+ГДХК), глікохолеву (ГХК), глікохенодезоксихолеву і глікодезоксихолеву в суміші (ГХДХК+ГДХК), а також вільні жовчні кислоти холеву (ХК) та хенодезоксихолеву і дезоксихолеву в суміші (ХДХК+ДХК). Чутливість методу – 1–3 мкг органічного компонента в пробі. Показник концентрації кожної із зазначених жовчних кислот у пробах жовчі, отриманих після введення досліджуваних речовин, порівнювали із значеннями вмісту відповідної жовчної кислоти у першій півгодинній пробі жовчі, яку вважали вихідним рівнем.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою пакету програм STATISTICA 6.0 (Stat-Soft, USA). Для оцінки нормальності розподілу використовували тест Шапіро–Вілка. Для оцінки значущих відмінностей між вибірками з нормальним розподілом даних використовували критерій Ст'юдента для залежних вибірок. Відмінності між групами вважали вірогідними при рівні значущості  $p < 0,05$ .

#### **РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ**

У щурів контрольної групи виявлено, що концентрації всіх фракцій кон'югованих жовчних кислот знижувалися впродовж досліду. Найбільш вираженим було зменшення вмісту ГХДХК+ГДХК. Концентрація цих дигідроксихоланових глікокон'югатів у жовчі в останній півгодинній пробі (90 хв. досліду) була на 19,7% ( $p < 0,05$ ) меншою, ніж у першій півгодинній пробі жовчі (табл.1). Концентрація вільних (некон'югованих) три- і дигідроксихоланових

**ВПЛИВ L-АРГІНІНУ НА СПЕКТР ХОЛАТІВ У ЖОВЧІ ЩУРІВ**

жовчних кислот (ХК, ХДХК+ДХК) статистично значимо не змінювалася впродовж досліду порівняно із вихідним рівнем.

**Таблиця 1**

**Концентрація жовчних кислот у жовчі щурів після внутрішньопортального введення фізіологічного розчину (1 мл/кг), M±SD, n=8**

Жовчні кислоти						
Час досліджу, хв	ТХК	ТХДХК +ТДХК	ГХК	ГХДХК +ГДХК	ХК	ХДХК +ДХК
30 хв; № 1	185,3 ±14,26	115,42 ±8,91	140,62 ±25,85	34,53 ±16,16	22,41 ±10,05	8,9 ±3,22
Внутрішньопортальне введення фізіологічного розчину (1 мл/кг)						
60 хв; №2	179,81 ±13,99 *	112,04 ±9,88	138,41 ±27,59	32,47 ±16,65	21,88 ±9,02	8,36 ±2,38
90 хв; №3	177,32 ±16,85	105,7 ±9,32 *	131,61 ±26,63 *	27,74 ±12,23 *	18,44 ±5,62	7,72 ±1,79

*Примітка:* \* – p<0,05 порівняно з вихідним рівнем (концентрація жовчної кислоти у півгодинній пробі жовчі, отриманій до введення досліджуваної сполуки)

Натомість, після внутрішньопортального введення L-аргініну (10 мг/кг) спостерігалися різнонаправлені зміни концентрації жовчних кислот у жовчі щурів. Так, концентрація ТХДХК+ТДХК на 90 хв. досліджу була вищою від вихідного рівня на 10,1% (p<0,05) (табл. 2). Концентрація ХДХК+ДХК у жовчі щурів через 30 хв. після внутрішньопортального введення L-аргініну (60 хв. досліджу) вірогідно збільшувалася порівняно з вихідним рівнем на 36,8% (p<0,05). Лише концентрація ГХК виявилася нижчою від вихідного рівня на 12,1% (p<0,05). При цьому не спостерігалось статистично значимого зниження концентрацій ТХК, ГХДХК+ГДХК порівняно із значеннями, зафіксованими у першій півгодинній пробі, отриманій до введення амінокислоти.

**Таблиця 2**

**Концентрація жовчних кислот у жовчі щурів після внутрішньопортального введення L-аргініну (10 мг/кг), M±SD, n=6**

Жовчні кислоти						
Час досліджу, хв	ТХК	ТХДХК +ТДХК	ГХК	ГХДХК +ГДХК	ХК	ХДХК +ДХК
30 хв; № 1	171,28 ±10,14	96,33 ±15,44	152,78 ±51,92	22,68 ±6,32	19,1 ±8,94	8,83 ±1,51
Внутрішньопортальне введення розчину L-аргініну (10 мг/кг)						
60 хв; №2	171,5 ±3,4	105,2 ±20,52	152,93 ±65,69	23,6 ±9,23	21,65 ±15,37	12,08 ±2,93 *
90 хв; №3	167,43 ±6,86	106,05 ±20,46 *	134,3 ±64,73 *	21,8 ±6,92	21,17 ±11,23	10,38 ±1,93

*Примітка:* \* – p<0,05 порівняно із вихідним рівнем (концентрація жовчної кислоти у півгодинній пробі жовчі, отриманій до введення досліджуваної сполуки)

Блокада NO-синтази за допомогою L-NAME (20 мг/кг) не викликала змін концентрації всіх досліджуваних фракцій глікокон'югатів, вільних жовчних кислот та ТХК порівняно з вихідним рівнем (табл. 3). Лише наприкінці досліду (90 хв.) зареєстровано збільшення концентрації суміші ТХДХК+ТДХК на 10,6 % ( $p < 0,01$ ).

**Таблиця 3**  
**Концентрація жовчних кислот у жовчі щурів після внутрішньопортального введення L-NAME (20 мг/кг),  $M \pm SD$ ,  $n=6$**

Жовчні кислоти						
Час досліджу, хв	ТХК	ТХДХК +ТДХК	ГХК	ГХДХК +ГДХК	ХК	ХДХК +ДХК
30 хв; № 1	182,35 $\pm 14,34$	97,18 $\pm 16,15$	135,77 $\pm 85,49$	29,6 $\pm 10,16$	21,90 $\pm 17,69$	10,85 $\pm 3,21$
Внутрішньопортальне введення розчину L-NAME (20 мг/кг)						
60 хв; №2	183,6 $\pm 31,01$	101,62 $\pm 23,17$	137,92 $\pm 103,61$	28,66 $\pm 12,95$	21,58 $\pm 12,39$	11,23 $\pm 2,86$
90 хв; №3	188,92 $\pm 27,25$	107,45 $\pm 15,46$ **	138,48 $\pm 95,27$	27,13 $\pm 10,27$	22,68 $\pm 12,88$	12,03 $\pm 3,35$

*Примітка:* \*\* –  $p < 0,01$  порівняно із вихідним рівнем (концентрація жовчної кислоти у півгодинній пробі жовчі, отриманій до введення досліджуваної сполуки)

При введенні L-аргініну на тлі попередньої блокади NO-синтаз спостерігалось виключно збільшення концентрації кон'югованих жовчних кислот порівняно з вихідним рівнем, а концентрація вільних жовчних кислот підтримувалася на рівні близькому до такого у першій півгодинній пробі жовчі (табл.4).

**Таблиця 4**  
**Концентрація жовчних кислот у жовчі щурів після введення L-аргініну (10 мг/кг) на фоні дії L-NAME (20 мг/кг),  $M \pm SD$ ,  $n=6$**

Жовчні кислоти						
Час досліджу, хв	ТХК	ТХДХК +ТДХК	ГХК	ГХДХК +ГДХК	ХК	ХДХК +ДХК
30 хв; № 1	188,62 $\pm 14,09$	96,07 $\pm 17,61$	164,55 $\pm 62,0$	25,97 $\pm 10,58$	20,15 $\pm 8,54$	10,27 $\pm 2,93$
Внутрішньопортальне введення розчинів L-NAME (20 мг/кг) та L-аргініну (10 мг/кг)						
60 хв; №2	207,55 $\pm 21,71$ **	107,73 $\pm 18,99$ **	176,93 $\pm 76,15$ *	29,00 $\pm 10,6$ *	20,7 $\pm 8,19$	10,7 $\pm 2,04$
90 хв; №3	213,25 $\pm 30,25$ *	108,4 $\pm 25,78$ *	171,48 $\pm 113,46$	28,5 $\pm 11,45$	21,32 $\pm 11,59$	10,9 $\pm 1,96$

*Примітка:* \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$  порівняно із вихідним рівнем (концентрація жовчної кислоти у півгодинній пробі жовчі, отриманій до введення досліджуваної сполуки)

Отже, як блокатор NO-синтаз, так і L-аргінін за їх окремої дії сприяли підтриманню концентрації ТХК на рівні, близькому до вихідного. А у серії

експериментів із спільним використанням L-NAME і L-аргініну спостерігалось вірогідне збільшення (на 10-13%;  $p < 0,05$ ) концентрації таурохолевої кислоти у жовчі щурів. Ефекти L-NAME і L-аргініну (у разі їх окремого застосування) на вміст у жовчі дигідроксихоланових таурокон'югатів виявилися односпрямованими, а саме: як блокатор NO-синтази, так і донор NO викликали збільшення концентрації таурокон'югатів дигідроксихоланових жовчних кислот у пробах жовчі. Цікаво, що при спільному застосуванні цих сполук концентрація суміші таурохолатів ТХДХК+ТДХК зростала порівняно з вихідним рівнем на 12,1% ( $p < 0,01$ ) і 12,8% ( $p < 0,05$ ), тобто не спостерігалось сумарної ефектів L-NAME і L-аргініну. Зменшення вмісту в жовчі ГХК під впливом L-аргініну повністю усувалося попереднім введенням L-NAME. Застосування блокатора NO-синтази перед введенням L-аргініну також запобігало стимулюючому впливу амінокислоти на надходження суміші вільних жовчних кислот ХДХК+ДХК у жовч щурів.

Слід відзначити також встановлені нами дозозалежні ефекти L-аргініну на вміст холатів у жовчі. Якщо у дозі 5 мг/кг L-аргінін викликав збільшення концентрації тригідроксихоланової кон'югованої таурохолевої кислоти з одночасним зменшенням такої вільної тригідроксихоланової холевої кислоти [18], то при застосуванні L-аргініну в дозі 10 мг/кг збільшувалась концентрація дигідроксихоланових кислот (таурохенодезоксихолевої, тауродезоксихолевої, хенодезоксихолевої і дезоксихолевої). Це може свідчити про дозозалежний вплив L-аргініну на такі метаболічні перетворення жовчних кислот, як гідроксилювання та кон'югація.

#### ВИСНОВОК

Таким чином, L-аргінін та L-NAME як при окремому їх введенні, так і при спільній дії, суттєво змінюють жовчнокислотний склад жовчі щурів, що може свідчити про участь NO в метаболічних перетвореннях і транспорті жовчних кислот до первинних жовчних каналців. Але односпрямованість виявлених нами ефектів амінокислоти і блокатора, а також лише часткове усунення впливу L-аргініну на концентрації деяких жовчних кислот при попередньому введенні L-NAME може вказувати на те, що дія L-аргініну на жовчосекреторну функцію печінки пов'язана не лише з його роллю як донора NO.

#### Список літератури

1. L-arginine reduces liver and biliary tract damage after liver transplantation from non-heart-beating donor pigs / R. Valero, J.C. Garcia-Valdecasas, M. Nieto [et al.] // *Transplantation* – 2000 – Vol.70, №5. – P. 730-737.
2. Li S.Q. Protective mechanism of L-arginine against liver ischemic-reperfusion injury in rats / S.Q. Li, L.J. Liang // *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* – 2003. – Vol.2, №4. – P.549-52.
3. Максимович Н.Е. Аминокислота L-аргинин и перспективы её использования в клинике / Н.Е. Максимович, Д.А. Маслаков // *Здравоохранение*. – 2003. – № 5. – С. 35–37.
4. Pros and cons of L-arginine supplementation in disease / Y.L.J. Vissers, I.B.J.G. Debats, Y.C. Luiking [et al.] // *Nutrition Research Reviews*. – 2004. – V. 17. – P.193–210.
5. Beneficial effects of rutin and L-arginine coadministration in a rat model of liver ischemia-reperfusion injury / R. Acquaviva, R. Lanteri, G. Li Destri [et al.] // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. – 2009. – Vol.296, № 3. – P. G664-70.

6. The effects of L-Arginine on liver damage in experimental acute cholestasis an immunohistochemical study / Y. Ozsoy, M. Ozsoy, T. Coskun [et al.] // *HPB Surgery*. – 2011. – Vol.2011. – P.306069, 5 pages.
7. Bruins M.J. L-arginine supplementation in pigs decreases liver protein turnover and increases hindquarter protein turnover both during and after endotoxemia / M.J. Bruins, P.B. Soeters, W.H. Lamers, N.E. Deutz // *Am J Clin Nutr*. – 2002. – Vol.75, №6. – P.1031-44.
8. Chung H.C. Increase in urea in conjunction with L-arginine metabolism in the liver leads to induction of cytochrome P450 2E1 (CYP2E1): the role of urea in CYP2E1 induction by acute renal failure / H.C. Chung, S.H. Kim, M.G. Lee, S.G. Kim // *Drug Metab Dispos* – 2002. – Vol.30, №6. – P.739-46.
9. Галкин Б.Н. Антиоксидеские свойства аргинина / Г.Б. Галкин // *Соврем.пробл. токсикол.* – 2003. – № 1. – С. 80-86.
10. Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in patients with nonalcoholic steatohepatitis / M. Koruk, S. Taysi, M.C. Savas [et al.] // *Ann Clin Lab Sci* – 2004. – Vol.34, №1. – P.57-62.
11. Nikoli E. Nitric oxide and mitochondrial biogenesis / E. Nikoli, M.O. Carruba // *J. Cell Sci.* – 2006. – Vol.119. – P. 2855–2862.
12. Chattopadhyay P. Attenuation of mitochondrial injury by L-arginine preconditioning of the liver / P. Chattopadhyay, G. Shukla, A. Verma, A.K. Wahi // *Biofactors* – 2007. – Vol.31, №2. – P.99-106.
13. The role of L-arginine in toxic liver failure: interrelation of arginase, polyamine catabolic enzymes and nitric oxide synthase / J. Nikolic, I. Stojanovic, R. Pavlovic [et al.] // *Amino acids*. – 2007. – V. 32, №1. – P. 127–131.
14. Продукція оксиду азоту в печінці за умов впливу ацетату свинцю в експерименті // О.Л. Апихтіна, А.В. Коцюрба, І.М. Андрусишина [та ін.] – 2007. - №2. – С. 22-26.
15. Dufour JF.J. Nitric oxide blocks bile canalicular contraction by inhibiting inositol trisphosphate-dependent calcium mobilization / JF.J. Dufour, T.J. Turner, I.M. Arias // *Gastroenterology* – 1995. – Vol. 108. – P.841–849.
16. Особливості спектру жовчних кислот у людини і тварин / С.П. Весельський, М.Ю. Макарчук, П.І. Янчук [та ін.] // *Наук. вісн. Волин. держ. ун-ту ім. Лесі Українки.* – 2007. – № 5. – С. 65–72.
17. Esteller A. Physiology of bile secretion / A. Esteller // *World J Gastroenterol.* – 2008. – V14, №37. – P.5641-5649.
18. Бондзик О.В. / Дослідження впливу L-аргініну на жовчосекреторну функцію печінки щурів // О.В. Бондзик, Е.Н. Решетник, С.П. Весельський, П.І. Янчук // *Науковий вісник Волинського національного університету імені Лесі Українки*". – 2010. – №12. – С. 9-14.
19. Дмитренко Н.П. Аргинин: биологическое действие, влияние на синтез оксида азота / Н.П. Дмитренко, Т.О. Кишко, С.Г. Шандренко // *Укр.хіміотерапевтичний журнал.* – 2008. – №1–2 (22). – С.137-140.
20. Пат. 99031324 Україна, МБН А61В5/14. Спосіб підготовки проб біорідин для визначення вмісту речовин ліпідної природи / С.П. Весельський, П.С. Лященко, С.І. Костенко, З.А. Горенко, Л.Ф. Куровська. – № 33564А ; заяв. 05.10.1999 ; опубл. 15.02.2001 ; Бюл. № 1.

**Бондзик Е.В. Влияние L-аргинина на спектр холатов в желчи крыс / Е.В. Бондзик, Е.Н. Решетник, С.П. Весельский, П.И. Янчук // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2012. – Т. 25 (64), № 2. – С.37-43.**

В острых экспериментах на крысах исследовали влияние L-аргинина на спектр холатов в желчи, используя метод тонкослойной хроматографии. Показано, что L-аргинин (10 мг/кг, внутривенно) вызывал увеличение концентрации дигидроксихолановых свободных и конъюгированных с таурином желчных кислот (сравнительно с исходным уровнем показателей), при этом наблюдалось уменьшение концентрации гликохолевой кислоты. L-аргинин на фоне блокады NO-синтазы с помощью L-NAME (20 мг/кг) вызывал увеличение концентрации конъюгированных желчных кислот.

**Ключевые слова:** L-аргинин, желчные кислоты, L-NAME.

**Bondzyk O.V. The influence of L-arginine on the spectrum of bile acids in rat bile / O.V. Bondzyk, E.M. Resetnik, S.P. Veselsky, P.I. Yanchuk // Scientific Notes of Taurida V. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No. 2. – P. 37-43.**

The influence of L-arginine on the spectrum of bile acids in rat bile was investigated in acute experiments on rats with using thin-layer chromatography. It was shown that L-arginine after bolus intraportal injection in dose 10 mg/kg body weight increased the concentrations of free and conjugated with taurine dihydroxy cholates compared with baseline of concentrations. Also the concentration of glycocholic acid was decreased. In contrast, after bolus intraportal injection of NO-synthases inhibitor L-NAME (dose 20 mg/kg body weight), this amino acid decreased the concentrations of all fractions of conjugated bile acids.

**Keywords:** L-arginine, bile acids, L-NAME.

*Поступила в редакцію 11.05.2012 з.*