

Експериментальні дослідження як ключова частина вивчення фізіології людини та тварин.

В статті проаналізовано експериментальну методикою, за допомогою якої можливо проводити розподіл похідних жовчних пігментів при дослідженні екскреторної та дезінтоксикаційної функції печінки в процесі вивчення фізіології людини та тварин для кращого сприймання студентами поданого матеріалу.

Ключові слова: жовч, жовчні пігменти, білірубін, білівердин хроматографія, кон'югати білірубіну.

Актуальність проблеми дослідження. Економічне зростання країни, її науково-технічний розвиток, культура, освіта неможливі без участі професійно підготовлених учителів біології. Авторитет вчителя, бажання наслідувати його – це суттєвий мотив діяльності, під впливом якого учень може розвиватися та удосконалюватися. Ідеалом виховання є різнобічно та гармонійно розвинена, національно свідома, високоосвічена особистість здатна до саморозвитку і самовдосконалення. Тому метою кожного вчителя є виявити і допомогти дитині розвинути інтелектуальні та творчі здібності для кращої адаптації до реалій сьогодення. І відповідно професійна готовність майбутнього вчителя біології стає дуже актуальною: уміння подати навчальний матеріал, уміння організувати експериментальне дослідження.

Кожний майбутній вчитель біології повинен вміти побудувати навчальний процес у такий спосіб, щоб учні активно заглиблювалися у пошук, розв'язування поставлених проблем. Саме тому актуально, щоб кожний студент володів методикою організації та проведення експериментальних досліджень, що допомагає краще висвітлювати теоретичний матеріал з навчального предмету, в той час, коли має місце незадовільне матеріально-технічне забезпечення. Дешевизна, доступність деяких методів та значимий результат – в пріоритеті серед інших, навіть

традиційних. Біохімічні методики дослідження, а саме хроматографія, яка для здешевлення собівартості виконується не в тонких шарах на пластинках „Sylufol”, а на хроматографічному папері, може бути використана для проведення експериментальної частини вивчення фізіології людини та тварин при дослідженні функцій печінки та пігментного обміну.

За кількістю жовчних пігментів, що виділяються у складі жовчі, можна судити про стан екскреторної функції печінки [1]. Жовчні пігменти – білірубін та білівердін – є кінцевими продуктами розпаду гемоглобіну. Некон’югований білірубін практично нерозчинний у воді і є ендogenous токсином. Детоксикація ендogenous та екзогенних токсинів є однією з провідних функцій печінки і здійснюється різними механізмами, при яких активно залучаються процеси гідроксилювання, метилювання, відновлення, етерифікації, кон’югації та інші трансформації токсичних сполук з метою позбавлення їх агресивних властивостей [2].

У здоровому організмі білірубін у крові зв’язаний з альбуміном, в такому вигляді він не проходить через тканинні бар’єри та не проявляє токсичного ефекту. За значної гіпербілірубінемії альбумін не зв’язує весь некон’югований білірубін, в результаті чого підвищується його токсичний ефект, переважно на головний мозок [1]. Гіпербілірубінемія переважно може розвиватися за рахунок некон’югованого білірубину, наприклад, за хвороби Жільбера, гемолітичної анемії, деяких форм хронічного гепатиту. Гіпербілірубінемія, пов’язана із зростанням кон’югованого білірубину, зустрічається при захворюванні на гострий гепатит (вірусний, алкогольний тощо), при загостренні хронічних гепатитів та цирозу печінки, а також при підпечінкових жовтяницях, обумовлених каменем чи пухлиною жовчних протоків [2].

Печінка виконує в організмі ряд найважливіших функцій в обміні жовчних пігментів, зокрема забезпечує захоплення їх із крові гепатоцитами та за участю різних поліферментних систем клітини здійснює кон’югацію білірубину з глюкуроною та іншими кислотами та моноцукрами, що сприяє

їх виведенню з жовчю у дванадцятипалу кишку. В процесі вище приведених функцій печінкою задіяна ціла низка білків-транспортів, як на синусоїдальних, так і на каналікулярних мембранах, а також безпосередньо в цитоплазмі клітин даного органу [6].

При дії екзогенних токсичних чинників на організм у печінці відбувається активація окремих поліферментних систем, які беруть участь в їх детоксикації, що певним чином позначається на екскреторній функції даного органу. Детоксикаційна функція печінки визначається за співвідношенням фракцій жовчних пігментів, які зв'язані з глюкуроною кислотою. Цим механізмом знешкоджується більшість токсичних речовин. Особливу увагу у зазначеній функції приділяють вмісту диглюкуроніду білірубину. Зменшення його вмісту в жовчі свідчить про зниження детоксикаційної функції печінки [3].

За допомогою хроматографічного розподілу із міхурової жовчі піддослідної тварини можна виявити, ідентифікувати та кількісно визначити до восьми фракцій похідних білірубину та білівердину. Методика хроматографічного розподілу пігментних складових розроблена у лабораторії НДІ імені академіка Петра Богача [5]. До отриманої в експерименті проби жовчі (50 мкл) додавали 50 мкл стабілізуючого водного розчину, який містить 5,0% карбаміду та 0,5% аскорбінової кислоти. До отриманої суміші, додавали бутанол та ацетон у об'ємному співвідношенні 2:2:7. Після інтенсивного перемішування суміш центрифугували впродовж 10 хвилин при 3000 об/хв на лабораторній центрифугі ОПН-8. Після упарювання ацетонової та бутанольної складових на розмічений хроматографічний папір FN-16 фірми «Filtrak» (або пластини «Silufol» або «Сорбфіл») 2-4 рази наносили по 5 мкл водної частини екстракту. Для кращого насичення хроматографічної камери бокові поверхні стінок обкладали фільтрувальним папером і наливали комбіновану суміш розчинників для хроматографії, яка містить: аміловий ефір оцтової кислоти, концентровану оцтову кислоту, пропанол, воду та етиленгліколь у відповідному об'ємному співвідношенні 21:10:5:5:3.

Після видалення у витяжній шафі розчинника з хроматограм, їх попередньо аналізували у видимій та ультрафіолетовій області світла при спеціальному освітленні, яке активує флюоресценцію пірольних груп в молекулах похідних білірубін, використовуючи лампу типу А-FC-301. Фарбування хроматограм проводили за допомогою лабораторного обприскувача, застосовуючи модифікований діазореактив, який отримували шляхом злиття 10 мл діазорозчину № 1 та 0,25 мл діазорозчину № 2 і збагаченням отриманої суміші 1,0 мл мурашиного альдегіду. Денситометричну кількісну оцінку окремих фракцій похідних білірубін і білівердину проводили, як в ультрафіолетовому діапазоні, так і у видимій області світла із залученням денситометрів ДО-1М або «Самас-2».

При відсутності вказаних денситометрів хроматограми фотографують цифровою фотокамерою, а знімки обробляють комп'ютерною програмою „Відеоденситометр Sorbfil” (ТУ 4436-003-16943778-99).

Отримані хроматограми аналізували у відповідності до R_f чистих стандартних речовин

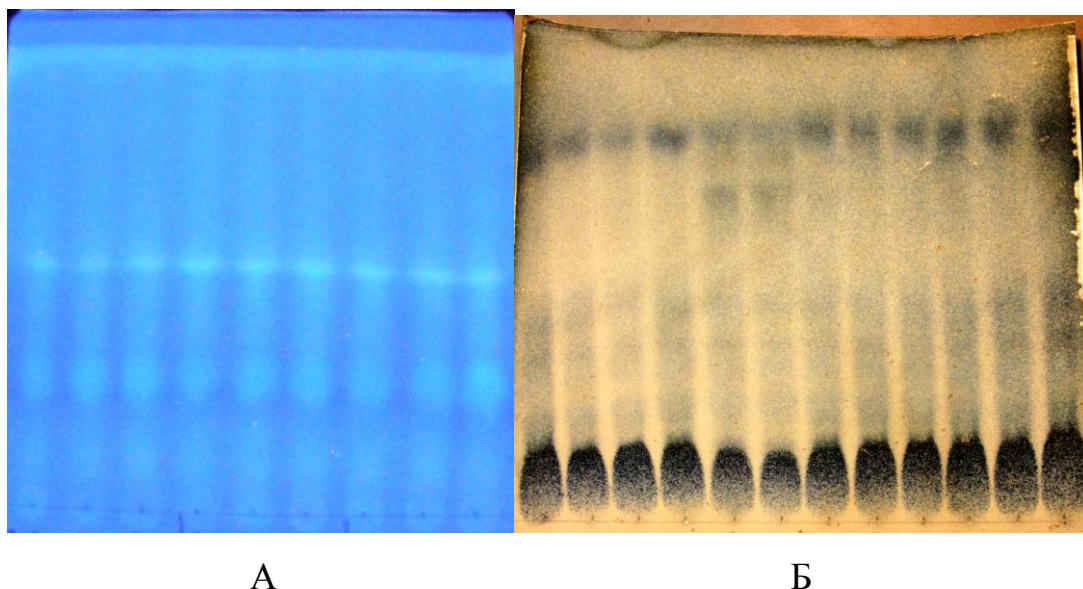


Рис. 1. Хроматографічний розподіл жовчних пігментів коропа

А – в ультрафіолетових променях, Б – при звичайному освітленні

Нанесений в якості свідка вільний білірубін, майже, не рухається в застосованій системі розчинників для хроматографії і залишається недалеко

від лінії старту ($R_f = 0,04$). Поряд з ним виявляється пляма вільного білівердину ($R_f = 0,07$), який є характерним для жовчі курей, деяких риб та рослиноїдних тварин, так як в печінці цих тварин відсутній фермент, що перетворює білівердин у білірубін.

В жовчі собак та щурів в значній кількості присутні сульфокон'югати білірубину, і мають відповідно $R_f = 0,21$ для цієї сполуки.

Домінуючою фракцією є диглюкуронід білірубину ($R_f = 0,37-0,38$).

Похідні білівердину та білірубину, які включали в комплекси молекул вуглеводну складову мали $R_f = 0,34$, $R_f = 0,83$.

Ближче до фронту хроматограми ($R_f = 0,97$) розташовується моноглюкуронід білірубину, що має певну спорідненість до бутанолу.

Розроблений спосіб по визначенню спектрів похідних білірубину та білівердину в біологічних рідинах характеризується більш високою чутливістю до метаболітів пігментного обміну, і дозволяє працювати з мікрооб'ємами біологічних рідин.

В цілому спосіб забезпечує можливість отримання спектру похідних білірубину та білівердину, характерного для жовчі кожного виду тварин, та чітко виявляє дані метаболіти не тільки в цій біорідині, а й, безпосередньо, в слині та сечі людини, що відкриває певні перспективи для неінвазійної діагностики стану гепатобіліарної системи.

За допомогою вказаної методики можна оцінювати не тільки стан гепатобіліарної системи, а і визначати ступінь інтоксикації організму екзогенним токсином та рівень адаптації організму до нього.

Таким чином, у наш час, коли питання підвищення якості освіти постає дуже гостро, експериментальні дослідження все більшою мірою стають невід'ємним елементом навчального процесу. Значно збільшився діапазон, кількість та різноманітність пропонованих методик, засобів та інструментарію для здійснення експерименту. Вдосконалюється технологія реалізації експерименту. Перед дослідником постає проблема вибору і порівняння – яка методика, тест або технологія кращі, більш якісні та

доступні, дозволяють одержати більш об'єктивні результати. Відповідь на це питання отримується на основі показників надійності та валідності відповідних експериментальних процедур.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Саратиков А.С. Желчеобразование и желчегонные средства / А.С. Саратиков, Н.П. Скакун // Томск. – 1991. – 260 с.
2. Комаров Ф.И. Руководство по гастроэнтерологии / Ф.И. Комаров, А.Л. Гребенев – М.: Медицина. – 1995. – 525с.
3. Торицын В.А. Диагностическое значение водорастворимой фракции билирубина / В.А. Торицын, А.В. Криничный.// Лабораторное дело. – 1985. - №2. – С. 280-282.
4. Ганиткевич Я.В. Исследования желчи. Биохимические и биофизические методы. / Я.В. Ганиткевич, Я.И. Карбач – К.:Вища школа. –1985.– 136 с.
5. Спосіб визначення спектра похідних білірубину та білівердину в біологічній рідині: Патент на корисну модель №41602 / Т.П.Гарник, М.Ю.Макарчук, С.П.Весельський, Т.І.Крохіна, Г.О.Самохіна, З.А.Горенко, Є.М.Решетнік, В.М.Полетай. – Заявлено 30.01 2009р, № заявки u 2009 00708; опубл. 25.05.2009. бюл.№ 10.
6. William Spivak, Martin C. Carey. Reverse-phase h. p. l. c. separation quantification and preparation of bilirubin and its conjugates from native bile // Biochem. J. – 1985. - № 225. – P. 787-805.

В.Н. Полетай

Черниговский национальный педагогический университет
имени Т.Г.Шевченко

г. Чернигов, ул. Гетьмана Полуботко, 53

Экспериментальные исследования как ключевая часть изучения
физиологии человека и животных

В статье проанализирована экспериментальная методика, при помощи которой возможно разделение производных желчных пигментов при исследовании экскреторной и дезинтоксикационной функции печени в процессе изучения физиологии человека и животных для лучшего восприятия студентами изучаемого материала.

Ключевые слова: желчь, желчные пигменты, билирубин, биливердин, хроматография, конъюгаты билирубина.

Poletay V.M.

Experimental studies as a key part of the study of human and animal
physiology

The article analyzes the experimental technique by which a separation of derivatives of bile pigments in the study of excretory and detoxifying function of the liver in the process of studying human and animal physiology for better perception studied material by students.

Keywords: bile, bilious pigments, bilirubin, biliverdin, chromatography, conjugates of bilirubin.