

УДК 612.357.13+591.132.5

В.М. ПОЛЕТАЙ¹, А.О. ЖИДЕНКО¹, С.П. ВЕСЕЛЬСЬКИЙ²,
М.Ю. МАКАРЧУК²

¹ Чернігівський національний педагогічний університет імені
Т.Г. Шевченка, вул. Гетьмана Полуботка, 53, м. Чернігів, 14038, Україна

² Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 64, м. Київ, 01601, Україна

ВПЛИВ ГЕРБІЦИДІВ НА ПРОМІЖНИЙ ОБМІН ЖОВЧНИХ ПІГМЕНТІВ В ОРГАНІЗМІ КОРОПА

Ключові слова: білірубін, білівердин, гербіциди, проміжний обмін

Жовчні пігменти білірубін та білівердин є кінцевими продуктами розщеплення гемоглобіну та інших гемовмісних сполук. Ці метаболіти практично нерозчинні у воді і тому в організмі людини та тварин знаходяться у зв'язаному комплексі з альбуміном, завдяки чому не можуть здолати тканинні бар'єри і проявити токсичних ефектів за нормальних умов життєдіяльності організмів [3, 7].

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 білірубіну з глюкуроною та іншими кислотами та моноцукрами, що сприяє їх виведенню з жовчю у дванадцятипалу кишку [4, 6]. 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 [6,7].

Однак, метаболічні процеси у печінці можуть порушуватись при певних патологічних станах організму внаслідок надмірного накопичення як ендогенних, так і екзогенних токсичних речовин. Часто за таких умов порушується природний каскад перетворень жовчних пігментів у печінці, оскільки багато метаболічних ланок його залучається у відтворення детоксуючої функції даного органу [1, 4].

Організм прісноводних риб, в тому числі коропа, піддається значному екзогенному навантаженню гербіцидами у зв'язку з їх інтенсивним застосуванням у сільському господарстві та подальшим потраплянням до природних і штучних водойм [2]. В зв'язку з вищезазначеним є важливим дослідити особливості обміну жовчних пігментів в організмі коропа при перебуванні його в середовищі з підвищеними концентраціями гербіцидів різної хімічної структури.

Матеріали та методи. Об'єктом дослідження слугував лускатий короп (*Surginus carpio* L.) однорічного віку масою 85-120 г та дворічного віку масою 210-245 г. Рівень досліджуваних гербіцидів задавали у 200-літрових акваріумах з розрахунку 0,04 - 0,08 мг/дм³ для раундапа (гліфосата) та 0,2 - 0,4 мг/дм³ для зенкора, що дорівнює відповідно двом та чотирьом гранично допустимим концентраціям (ГДК) для риб. Дослід проводився в осінньо-зимовий період впродовж 14 діб при температурі води в межах 8-10°C.

Вміст пігментних складових проводили за розробленою у нашій лабораторії методикою [5]. До отриманої в експерименті проби жовчі, крові та гомогенату печінки (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 до співвідношення 2:2:7. Після перемішування, центрифугування та упарювання ацетонової складової проводили хроматографічний розподіл екстрагованих пігментів на пластинах «Silufol» або «Сорбфіл», використовуючи комбіновану суміш розчинників для хроматографії, яка складалась з амілового ефіру оцтової кислоти, концентрованої оцтової кислоти, пропанолу, води та етиленгліколю у відповідному об'ємному співвідношенні 21:10:5:5:3. Після фарбування хроматограм модифікованим діазореактивом і збагаченням отриманої суміші 1,0 мл мурашиного альдегіду проводили денситометричну кількісну оцінку окремих фракцій

похідних білірубіну та білівердину як в ультрафіолетовому, так і у видимому діапазоні світла із залученням денситометрів ДО-1М або «Самас-2». Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою аналітичного пакета «Statistika 5.0», використовуючи t-критерій Стьюдента для даних, які мали нормальний розподіл згідно критерію Шапіро-Уїлка.

Результати досліджень та їх обговорення. За допомогою тонкошарової хроматографії в екстрактах із тканини печінки, жовчі та крові коропа лускатого було виявлено, ідентифіковано та кількісно визначено до восьми фракцій похідних білірубіну та білівердину. Домінуючим в організмі коропа пігментом, як і в багатьох інших тварин, є білівердин з його кон'югованими похідними, котрі по-різному представлені в досліджуваних нами біоматеріалах. Зокрема, найповніший спектр і найбільші концентрації загальних жовчних пігментів були виявлені у міхуровій жовчі як однорічок, так і дворічок коропа лускатого, котрі в цій біорідині у контрольних групах тварин становили відповідно $171,38 \pm 6,43$ мг% та $142,74 \pm 3,80$ мг%. Із приведених даних в таблицях 1 та 2 видно, що ця біорідина включає всі вісім виявлених фракцій похідних білівердину та білірубіну, тоді як у крові коропа частина фракцій останнього практично присутня лише в слідових кількостях. В тканині печінки коропа за контрольних умов дані метаболіти представлені у невеликих концентраціях повним спектром.

Загальний аналіз отриманих експериментальних даних показує, що при навантаженні організму коропа гербіцидами різної хімічної структури спостерігається односпрямована реакція на зменшення сумарної концентрації та вмісту жовчних пігментів в досліджуваних тканинах та біорідинах, прояв якої був певною мірою залежний від природи діючого чинника, його концентрації та віку тварин. Так, навантаження організму коропа однорічного віку 4 ГДК зенкора вело до зниження у жовчних

мішурах концентрації похідних білірубіну та білівердину на 20,9% ($p < 0,05$) порівняно з контрольними величинами (табл. 1).

Таблиця 1

Склад та кількісний вміст основних фракцій пігментів коропа лускатого (однорічки) при дії гербіцидів (4 ГДК, $M \pm m$, $n=14$)

		Основні пігментні фракції								
Умови досліджу		ВБЛ	ВБВ	СБЛ	СБВ	МГ БЛ	МГ БВ	МГМГ БВ	ДГ БВ	Сума
		в крові, мкмоль / л								
Контроль	M	сліди	14,56	сліди	0,08	0,02	2,89	0,12	5,56	23,24
	m	0,00	1,05	0,00	0,01	0,01	0,12	0,01	0,23	1,05
Дія зенкору	M	сліди	9,62*	сліди	0,12*	0,05*	1,94**	0,07**	3,95**	15,7**
	m	0,00	0,56	0,00	0,01	0,01	0,08	0,01	0,11	0,72
Дія раундапу	M	сліди	10,84	сліди	0,07	0,03	2,20**	0,10	4,29**	17,53**
	m	0,00	0,69	0,00	0,01	0,01	0,14	0,01	0,22	0,77
		в тканині печінки, мг%								
Контроль	M	0,02	0,30	0,03	0,32	0,15	2,02	0,08	3,96	6,88
	m	0,00	0,01	0,01	0,02	0,02	0,10	0,01	0,12	0,13
Дія зенкору	M	0,04**	0,22*	0,05*	0,30	0,30**	1,32**	0,04**	2,95**	5,22**
	m	0,004	0,01	0,01	0,02	0,01	0,14	0,01	0,08	0,16
Дія раундапу	M	0,03	0,24	0,03	0,46*	0,22*	1,53**	0,08	3,13**	5,70**
	m	0,003	0,02	0,004	0,02	0,01	0,08	0,01	0,16	0,24
		в жовчі, мг%								
Контроль	M	0,30	7,12	0,60	4,72	2,51	34,94	6,48	114,68	171,35
	m	0,03	0,40	0,07	0,28	0,20	2,04	0,21	4,20	6,43
Дія зенкору	M	0,50*	5,02*	0,78	3,76*	3,22*	26,84*	5,40*	89,98**	135,5*
	m	0,06	0,21	0,06	0,25	0,21	1,35	0,41	3,71	5,09
Дія раундапу	M	0,30	6,92	0,42	5,12	2,33	23,45**	5,55*	98,33*	142,42*
	m	0,06	0,37	0,05	0,32	0,23	1,57	0,24	3,30	4,52

Примітка. * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$; ВБЛ – вільний білірубін; ВБВ – вільний білівердин; СБЛ – сульфокон'югати білірубіну; СБВ – сульфокон'югати білівердину; МГ – моноглюкуронід; ДГ – диглюкуронід; МГМГ – моноглюкуронідмоноглікозид.

При навантаженні організму коропа дворічного віку 2 ГДК зенкора спостерігалось зниження сумарної концентрації жовчних пігментів у міхуровій жовчі на 22,3% ($p < 0,05$), а подальше підвищення концентрації цього препарату у водному середовищі до 4 ГДК зумовило зниження рівня даних метаболітів уже на 32,4% ($p < 0,01$) (табл. 2). Подібним чином змінювався сумарний рівень жовчних пігментів у міхуровій жовчі при застосуванні раундапу, зокрема при навантаженні організму риб 2 ГДК

гербициду їх загальний рівень у цій біорідині коропів дворічного віку знизився лише на 10,6%, а при дії 4 ГДК зниження цього показника склало 20,7% ($p < 0,01$), в той час як у коропів однорічного віку при цій концентрації препарату рівень похідних білірубіну та білівердину у міхуровій жовчі був нижчий на 16,9% ($p < 0,05$), ніж у контрольних тварин. В крові та тканині печінки зміни в сумарному вмісті жовчних пігментів були менш вираженими.

Таблиця 2

Склад та кількісний вміст основних фракцій пігментів коропа лускатого (дворічки) при дії гербицидів (2 та 4 ГДК, мг%, $M \pm m$, $n=12$)

		Основні пігментні фракції								
Умови досліджу		ВБЛ	ВБВ	СБЛ	СБВ	МГ БЛ	МГ БВ	МГМГ БВ	ДГ БВ	Сума
		в жовчі, при 2 ГДК гербицидів								
Контроль	M	0,96	4,74	1,28	5,4	4,16	30,44	4,52	91,24	142,74
	m	0,05	0,27	0,15	0,23	0,24	1,09	0,23	3,35	3,81
Дія зенкору	M	1,22	3,38*	2,24**	4,74*	6,26**	21,62**	3,38*	68,08**	110,92*
	m	0,11	0,16	0,17	0,16	0,28	1,35	0,30	1,55	3,25
Дія раундапу	M	0,88	4,20	1,58	5,54	4,16	26,52	4,90	79,22*	127,00
	m	0,09	0,17	0,20	0,29	0,16	1,43	0,17	1,55	2,52
		в жовчі, при 4 ГДК гербицидів								
Контроль	M	0,74	4,5	1,1	5,62	3,86	28,42	4,92	85,34	134,50
	m	0,03	0,22	0,10	0,23	0,14	1,21	0,17	2,22	3,55
Дія зенкору	M	1,32**	3,18*	2,00**	4,1**	5,4**	19,70**	3,12**	51,96**	90,90**
	m	0,09	0,14	0,14	0,17	0,27	1,15	0,15	2,46	2,51
Дія раундапу	M	0,9	3,73*	1,33	7,08**	2,93**	23,45*	2,13**	65,20**	106,70**
	m	0,09	0,15	0,14	0,18	0,14	1,22	0,18	1,94	3,38

Примітка. * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$; ВБЛ – вільний білірубін; ВБВ – вільний білівердин; СБЛ – сульфокон'югати білірубіну; СБВ – сульфокон'югати білівердину; МГ – моноглюкуронід; ДГ – диглюкуронід; МГМГ – моноглюкуронідмоноглікозид.

Надто важливим для з'ясування особливостей проміжного обміну жовчних пігментів в організмі коропа є встановлення змін окремих фракцій та співвідношення похідних білівердину та білірубіну в різних тканинах та біорідинах з одночасним відслідкуванням їх транслокації через синусоїдальні та каналікулярні мембрани гепатоцитів. З'ясування вмісту окремих фракцій жовчних пігментів між тканиною печінки, кров'ю та жовчю може в певній мірі слугувати критеріями в оцінці їх

внутрішньоклітинних перетворень та характеристик стану транспортних систем відповідних мембран. Наявність в окремих досліджуваних нами біоматеріалах одночасно з білівердином похідних білірубіну, котрі присутні безпосередньо в тканині печінки (2,7 – 2,9%) та частково концентруються в міхуровій жовчі однорічок (1,73 – 1,99%), та в цій же біорідині у коропів-дворічок (4,23 – 4,48% від загального вмісту жовчних пігментів) може вказувати на те, що, можливо, певна частка білівердину при окремих неспецифічних окисно-відновних процесах в клітинах печінки відновлюється до білірубіну.

Аналіз отриманих даних по вмісту окремих фракцій похідних білірубіну та білівердину вказує на те, що відмічене нами вище зниження загального вмісту жовчних пігментів під дією зенкору та раундапу відбулось за рахунок зменшення вмісту як вільного білівердину, так і, особливо, завдяки зниженню рівня найбільш вагомо представлених фракцій моно- та диглюкуронідів білівердину. Однак кожний з досліджуваних гербіцидів специфічно впливав на вміст окремих фракцій білівердину. Зокрема, якщо раундап в досліджуваних концентраціях вірогідно не впливав на рівень вільного білівердину в тканині печінки, крові та в міхуровій жовчі коропів однорічного віку, то навантаження організму риб зенкором достовірно [на 27,3% ($p < 0,05$)] знизило рівень даної фракції пігментів у тканині печінки, крові (на 33,9%, $p < 0,05$) та на 29,5% ($p < 0,05$) і на 29,3% ($p < 0,05$) відповідно в міхуровій жовчі однорічок та дворічок коропа.

Своєрідно впливав раундап на рівень моноглюкуронідмоноглікозиду білірубіна в досліджуваних тканинах. У крові та в тканині печінки його рівень практично не змінювався порівняно з контролем, у міхуровій жовчі однорічок він знизився на 14,4% ($p < 0,05$), а в цій біорідині у дворічок коропа – на 56,7% ($p < 0,01$). Такий розподіл даної фракції пігментів в досліджуваних нами тканинах та біорідинах може свідчити про те, що

раундап змінює стан білків-транспортів в каналікулярній мембрані гепатоцитів, відповідальних за транслокацію даної фракції пігменту. В той же час, застосування зенкору значно гальмує біосинтез моноглюкуронідмоноглікозиду в тканині печінки, про що свідчить достовірне зниження на 53,5% ($p < 0,01$) його рівня в цій тканині з паралельним вірогідним зменшенням даної фракції пігменту як у крові, так і міхуровій жовчі піддослідних риб порівняно з контрольними величинами.

Слід відмітити різноспрямований вплив зенкору та раундапу на біосинтез сульфокон'югатів білівердину та білірубіну в тканині печінки коропа. Якщо перший препарат підвищував на 52,9% ($p < 0,05$) рівень кон'югованого з сірчаною кислотою білірубіну, практично не впливаючи на концентрацію сульфату білівердину в цій тканині, то другий препарат, навпаки, достовірно підвищував на 44% ($p < 0,05$) рівень кон'югованого з цією кислотою білівердину, не змінюючи вмісту сульфату білірубіну порівняно з контролем.

Разом з тим обидва досліджуваних препарати сприяли зміні перебігу обмінних процесів в тканині печінки, за яких складались умови для зростання частки вільного білірубіну та його похідних. Найбільш виражено це проявлялося в достовірних змінах рівня як вільного білірубіну (в 2 рази, $p < 0,01$), так і його кон'югатів з сірчаною та глюкуроною кислотою при дії зенкору. Останнє також підтверджується значним достовірним зростанням частки даних фракцій білірубіну безпосередньо у міхуровій жовчі піддослідних риб при навантаженні їх організму зенкором (табл. 1).

Аналізуючи в цілому дані по зміні вмісту вільних та кон'югованих похідних білівердину та білірубіну в досліджуваних біорідинах та тканині печінки організму коропа лускатого у водному середовищі заданими концентраціями гербіцидів різної хімічної будови можна констатувати, що зенкор і раундап, подібним чином впливаючи на зниження загального

рівня жовчних пігментів, разом з тим по-різному впливають на розподіл та співвідношення в тканинах окремих досліджуваних нами метаболітів пігментного обміну. Встановлені зміни у співвідношенні вільних та кон'югованих похідних білірубину та білівердину в тканині печінки та досліджуваних біорідинах обумовлені відповідними змінами перебігу процесів їх біосинтезу, кон'югації та транслокації через синусоїдальні та каналікулярні мембрани гепатоцитів, що в підсумку впливає на перебіг проміжного обміну даних метаболітів в організмі риб при дії досліджуваних гербіцидів.

Використана література

1. Ганиткевич Я.В., Карбач Я.И. Исследования желчи. Биохимические и биофизические методы. – 1985. – К.:Вища школа. – 136 с.
2. Жиденко А.О. Морфологічні адаптації різновікових груп *Surginus carpio* L. за несприятливої дії екологічних факторів: Автореферат дис. ... д-ра біол. наук / А.О.Жиденко. – Одеса, 2009. – 40с.
3. Романенко В.Д. Печень и регуляция межуточного обмена (млекопитающие и рыбы) / В.Д. Романенко. – К., «Наук.думка», 1978. – 184с.
4. Саратиков А.С., Скакун Н.П. Желчеобразование и желчегонные средства // Томск. - 1991. - 260 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.
7. Goessling W. Role of apolipoprotein D in the transport of bilirubin in plasma / Goessling W., Zucker S.D. // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* – 2000. – V.279. – P. G356-G365.