

ЗНАЧЕННЯ ПОКАЗНИКІВ МЕТАБОЛІЗМУ ПЕЧІНКИ ДЛЯ АДАПТАЦІЇ РИБ В УМОВАХ ГЕРБІЦИДНОГО ЗАБРУДНЕННЯ ВОДОЙМ

А.О. Жиденко, К.В. Бібчук, В.М. Полетай, В.В. Кривопиша

Чернігівський національний педагогічний університет імені Т.Г. Шевченка,
вул. Гетьмана Полуботка, 53, Чернігів, 14000, Україна, chnpu@chnpu.edu.ua, zaa2006@ukr.net

Зроблено порівняльний аналіз впливу віку риб, кількісних змін основних метаболітів різних напрямків обміну речовин на формування адаптації в печінці коропа в умовах гербіцидного забруднення водойм. Виявлено, що цьоголітки коропа є більш пластичними до формування адаптації обмінних процесів печінки риб в умовах дії гербіцидів, порівняно з дволітками. Зниження кількості еритроцитів і вмісту гемоглобіну молоді риб під дією гербіцидів не призводить до збільшення рівнів жовчних пігментів в печінці внаслідок зниження фракції альбумінів у плазмі (порушення транспорту), використання глюкуронової кислоти для детоксикації продуктів розпаду білків з метою кращого здійснення репаративних процесів у печінці. Формування адаптації у цьоголіток на 21 добу експерименту виявляється у збільшенні кількісних показників еритроцитів і гемоглобіну.

Ключові слова: короп, гербіциди, адаптація, метаболіти, обмін речовин.

Вступ. Для збільшення сільськогосподарської продукції у великих масштабах та з мінімальними затратами ресурсів і часу, необхідна індустріалізація сільського господарства, переведення його на промислову основу, що веде до збільшення використання пестицидів. Потрапляючи у водойми, гербіциди, особливо розчинні у воді, призводять до зміни гідрохімічного режиму, негативно впливають на кормову базу і фізіолого-біохімічні показники риб. Відомо, що адаптація організму забезпечується компонентами метаболізму клітини, в тому числі речовинами ліпідної, вуглеводної і білкової природи, в обміні яких провідну роль грає печінка (Романенко, 1978; Крючков, 2004). Крім того, печінка, приймаючи активну участь у знезараженні або трансформації токсикантів, відчуває їх негативний вплив. У зв'язку з цим, виникає необхідність всебічного дослідження обмінних процесів в печінці водних організмів при здійсненні адаптації до токсичних умов навколишнього середовища.

Об'єкт і методи. Дослідження впливу гербіцидів проведено на цьоголітках і двохлітках коропа лускатого (*Cyprinus carpio* L.), які були вирощені в ВАТ "Чернігіврибгосп". Досліди з вивчення впливу гербіцидів проводили в 200-літрових акваріумах із відстояною водопровідною водою. Дослідження проводили в осінньо-зимовий період впродовж 14, 21 діб. Риба перебувала в акваріумах в умовах голодування при температурі води $8 \pm 2^\circ\text{C}$, рН $7,80 \pm 0,28$, вміст у воді O_2 становив $5,8 \pm 0,5$ мг/л. Воду змінювали кожні три доби, в усіх випадках використовували контрольну групу риб і підтримували постійний гідрохімічний режим води. Для проведення ек-

сперименту були взяті 2 гербіциди у кількості 2 і 4 ГДК (гранично допустима концентрація) (зенкор $0,2-0,4$ мг/дм³ та раундап $0,04-0,08$ мг/дм³) різної хімічної природи та властивостей. Зенкор – метрибузин (4-аміно-6-третбутил-3(метилтіо)-1,2,4-триазин-5(4Н)-ОН), препарат, який використовується як ґрунтовий гербіцид під посадку пасльонових культур. Раундап – діюча речовина ізопропіламінної солі гліфосату, 480 г/дм³, фосулен (N-фосфометилгліцин) широко застосовується як гербіцид системної та вибіркової дії для боротьби з одно- та багаторічними бур'янами, особливо під посіви кукурудзи та сої, насіння якої містять модифікований ген стійкості до цієї речовини, що приводить до накопичення гліфосату в рослинах.

Кров у риб відбирали шляхом пункції серця (Давыдов и др., 2006). Кров збирали в пробірку та стабілізували шляхом додавання гепарину – офіційного розчину (1мл – 5000 ОД) (Справочник ..., 1986). З печінки після додавання фізрозчину (0,6% NaCl для холонокровних) готували гомогенат тканини. Відібрані біологічні матеріали готували до диференціальної екстракції окремих груп органічних сполук згідно схем (Патент ..., 2001). Вміст пігментів у міхуровій жовчі і тканині печінки визначали за методикою (Спосіб ..., 2009), згідно якої 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 цієї суміші вводили охолоджені бутанол та ацетон, дотримуючись об'ємного співвідношення 1:2:7. 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 папір або пластини 2-4 рази наносили по 5 мкл водної частини екстракту.

Хроматографічний розподіл екстрагованих пігментів проводили на пластинах "Silufol" або ж на хроматографічному папері FN-16 фірми "Filtrak", використовуючи 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 розділення похідних білівердину розчинник з хроматограм видаляли у витяжній шафі. Останні попередньо аналізували в ультрафіолетовій області світла, яке активує флюоресценцію пірольних груп в молекулах пігментів, використовуючи хроматоскоп та лампу типу А-FC-301. Фарбування хроматограм проводили за допомогою скляного лабораторного оприскувача, 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.

Для кількісного визначення вмісту похідних білівердину і білірубину проводили денситометричну пряму оцінку як в ультрафіолетовому, так і у видимому діапазоні світла на денситометрах ДО-1М або "Самас-2" (Швейцарія) та відповідних калібрувальних кривих, побудованих з використанням чистих стандартних речовин з урахуванням максимумів поглинання світла досліджуваними метаболітами. Проводили визначення білкових фракцій та їх співвідношення (Колб, Камышников, 1976).

Статистичну обробку результатів проводили методами статистичного аналізу даних за допомогою комп'ютерної програми Microsoft Excel (результати вважали достовірними і статистично значущими при $p \leq 0,05$): достовірне розходження між середніми арифметичними величинами показників експериментальних і контрольних груп коропів визначали за допомогою t-критерію Стьюдента. Розходження між порівнюваними групами вважали вірогідними при * - $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Виконаний раніше порівняльний аналіз впливу віку риб на активність ферментів вуглеводного обміну в нормальних умовах і під дією гербіцидів показав значне переважання ферментативної активності в печінці цьоголіток (амілолітичної, лактатдегідрогеназної, ізоцитратдегідрогеназної, глюкозо-6-фосфатдегідрогеназної і т.д.) (Жиденко, 2009; Жиденко, Бибчук, 2009). Висока активність ферментів в органах молоді риб, на перший погляд,

грає негативну роль – неекономічне витрачання поживних субстратів, але, з точки зору пластичності адаптаційних процесів, більш перспективною для дослідження є молодь коропа. Так, на 14 добу дії раундапу і зенкору (табл. 1), в крові цьоголіток кількість еритроцитів зменшується майже в 2 рази, що супроводжується розпадом гемоглобіну з утворенням вердоглобіну. У подальшому, від цієї молекули відщеплюється атом заліза і білок глобін, в результаті утворюється білівердин (БВ), який здатний відновлюється до білірубину (БЛ). Співвідношення цих речовин (БВ і БЛ) в печінці цьоголіток коропа у нашому дослідженні становило від 97,3-97,1% до 2,7-2,9%. При визначенні вмісту гемоглобіну на 14 добу експерименту (табл. 1), було встановлено, що під дією зенкору також відбувається зниження його рівня в 1,5 рази, під дією раундапу – тільки тенденція до зменшення, так як здійснюється зворотний синтез гемоглобіну, який призводить до деякої зміни вмісту заліза в цьому органі. В результаті цього процесу, на 21 добу експерименту зростає рівень гемоглобіну та еритроцитів у крові цьоголіток коропа по відношенню до 14 діб, що можна розглядати як свідчення адаптивних перебудов в організмі молоді риб.

Таблиця 1
Зміни кількості еритроцитів і вмісту гемоглобіну в крові цьоголіток коропа в умовах гербіцидного навантаження, $M \pm m, n=12$

Table 1
Changes in the number of red blood cells and hemoglobin in the blood fingerling carp in herbicide load, $M \pm m, n = 12$

Умови досліджу	7 доба	14 доба	21 доба
Еритроцити (тис./мм ³)			
Контроль	870±81	490±67	520±22
Зенкор	750±43	410±55	780±31*
Раундап	540±30*	500±38	540±18
Гемоглобін (г/л)			
Контроль	57±10	42±9	49±5
Зенкор	50±9	33±6	43±4
Раундап	47±8	46±7	50±6

Розходження між порівнюваними групами вважали вірогідними при * - $P < 0,05$.

Згідно з загальною схемою метаболізму ксенобіотиків в організмі тварин, основна кількість токсикантів, що надходять, акумулюється в печінці. Печінка у риб, як і в багатьох інших організмів, виконує основну роль в детоксикації та зберіганні поллютантів. (Крючков, 2004). Основним місцем утворення білірубину також є печінка, але цей процес можливий також в селезінці та еритроцитах. Подальші перетворення метаболітів розпаду гемоглобіну повинні відбуватися в печінці, а для цього необхідний альбумін плазми, який здійснює цей транспорт, але його вміст у

крові під дією раундапу зменшується в 1,8 рази (рис. 1), що може ускладнити цей процес.

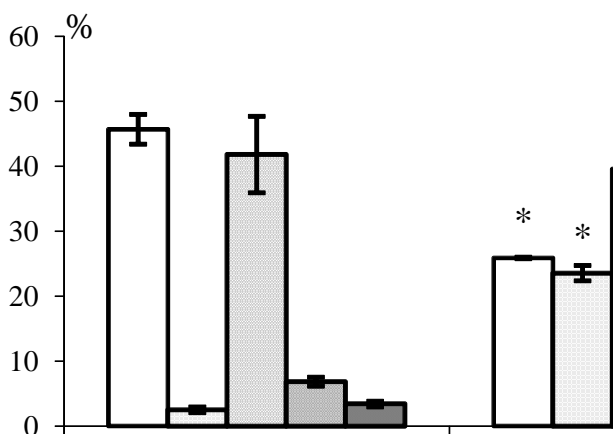


Рис. 1. Зміни вмісту білкових фракцій у сироватці крові цьоголіток коропа за умов дії раундапу ($M \pm m$, $n = 12$, * – $P < 0,05$)

Fig. 1. Change content of protein fractions in the blood serum of fingerling carp under the effect of Roundup ($M \pm m$, $n = 12$, * – $P < 0,05$)

Вільні білівердин (ВБВ) і білірубін (ВБЛ) мають значну токсичність, тому в печінці взаємодіють з глюкуроноювою кислотою, утворюючи моно- і диглюкуронід білівердина (МГ БВ, ДГ БВ) і білірубину (МГ БЛ, ДГ БЛ). Очікуваного збільшення цих фракцій в печінці не спостерігається (рис. 2), а, навпаки, в умовах дії зенкору і раундапу відбувається зниження вмісту загального білівердину і білірубину як за рахунок зменшення ВБВ, так і більшою мірою фракцій МГ БВ, ДГ БВ, МГМГ БВ, ДГ БЛ (рис. 2).

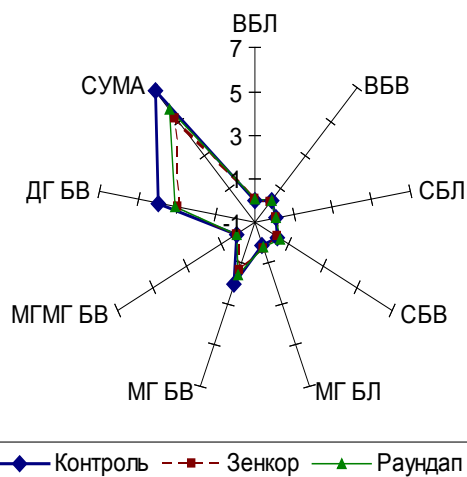


Рис. 2. Вміст основних фракцій жовчних пігментів (mg%) у печінці коропа лускатого при дії зенкору і раундапу (4 ГДК, $M \pm m$, $n = 14$)

Fig. 2. Content of main fractions of bile pigments (mg%) in the liver of flake carp when exposed Zenkor and Roundup (4 MPC, $M \pm m$, $n = 14$)

Поясненням останньої тези може бути можливість збереження вихідних субстратів для син-

тезу гемоглобіну та еритроцитів в процесі адаптації, а також перерозподіл частини глюкуроноювої кислоти на знешкодження продуктів метаболізму білків печінки. Глюкуронова кислота утворює з ними парні сполуки, забезпечуючи детоксикації цих метаболітів, які інтенсивно утворюються під дією досліджуваних гербіцидів, про що свідчить кількісне зменшення білка в органі, більш характерне для дволіток коропа (Жиденко, 2009). Крім того, виявлено, що у коропів різного віку гербіцидне навантаження значно пригнічує екскрецію жовчних пігментів. Ступінь пригнічення екскреторної функції печінки значно вище у коропів-двохліток в умовах впливу зенкору, при дії якого спостерігається часткове, не характерне для риб, відновлення білівердину до білірубину, порівняно з цьоголітками (Полетай, 2011), що є ще одним підтвердженням гірших адаптаційних можливостей двохліток коропа.

Висновки. Таким чином, у дослідженні виявлено, що двохлітки коропа виявилися менш лабільними до формування адаптації обмінних процесів печінки риб до дії гербіцидів, а цьоголітки – більш пластичними. Зниження у них під дією гербіцидів кількості еритроцитів і вмісту гемоглобіну не призводить до збільшення рівнів жовчних пігментів в печінці, внаслідок зниження фракції альбумінів у плазмі (порушення транспорту), використання глюкуроноювої кислоти для детоксикації продуктів розпаду білків з метою кращого здійснення репаративних процесів у печінці. Формування адаптації у цьоголіток на 21 добу експерименту виявляється у збільшенні кількісних показників еритроцитів і гемоглобіну.

Список літератури:

1. Давыдов О.Н. Патология крови рыб / О.Н. Давыдов, Ю.Д. Темниханов, Л.Я. Куровская. – К.: Фирма "ИНКОС", 2006. – 206 с.
2. Жиденко А.О. Морфофізіологічні адаптації різновікових груп *Suiprinus carpio* L. за несприятливої дії екологічних факторів. – Автореф. дис. ... докт. біол. наук зі спеціальності 03.00.16 – «Екологія» / А.О. Жиденко. – Одеса, 2009. – 40 с.
3. Жиденко А.А. Изменения биохимических показателей в печени карпа в условиях действия раундапа / А.А. Жиденко, Е.В. Бибчук // Сучасні проблеми теоретичної і практичної іхтіології: тези II Міжнародної іхтіологічної науково-практичної конференції. – Севастополь, 2009. – С. 50–52.
4. Колб В.Г. Клиническая биохимия: пособие для врачей-лаборантов / В.Г. Колб, В.С. Камышников. – Минск: Беларусь, 1976. – 310 с.
5. Крючков В.Н. Эколого-морфологические особенности патологии и адаптации органов и тканей рыб при воздействии токсикантов: автореф. дис. ... докт. биол. наук со спец. 03.00.16 – «Экология» / В.Н. Крючков. – Махачкала, 2004. – 46 с.
6. Спосіб підготовки проб біорідин для визначення вмісту речовин ліпідної природи: Пат. 99031324

- Україна, МБІ А61В5/14 / С.П. Весельський, П.С. Лященко, С.І. Костенко, З.А. Горенко, Л.Ф. Куровська (Україна). – № 33564А; Заявл. 05.10.99; Опубл. 15.02.2001, Бюл. №1.
7. Полетай В.М. Вплив гербіцидів на проміжний обмін компонентів жовчі у коропа: автореф. дис. ... канд. біол. наук. зі спец. 03.00.13 – «Фізіологія людини і тварин» / В.М. Полетай. – Київ, 2011. – 20 с.
 8. Романенко В.Д. Печень и регуляция промежуточного обмена: (Млекопитающие и рыбы) / В.Д. Романенко. – К.: Наук. думка, 1978. – 183 с.
 9. Спосіб визначення спектра похідних білірубину та білівердину в біологічній рідині: Патент на корисну модель №41602 / Т.П. Гарник, М.Ю. Макачук, С.П. Весельський, Т.І. Крохіна, Г.О. Самохіна, З.А. Горенко, Є.М. Решетнік, В.М. Полетай. – Заявлено 30.01.2009 р, № заявки у 2009 00708; опубл. 25.05.2009. бюл. № 10.
 10. Справочник по физиологии рыб / А.А. Яржомбек, В.В. Лиманский, Т.В. Щербина [и др.]; Под ред. А.А. Яржомбека. – М.: Агропромиздательство, 1986. – 192 с.

THE VALUE OF FISH LIVER METABOLISM INDICATORS FOR ADAPTATION TO THE CONDITIONS OF HERBICIDE CONTAMINATION

A.O. Zhidenko, K.V. Bibchuk, V.M. Poletaj, V.V. Krivopisha

The comparative analysis of influence the age of fishes, the quantitative changes of basic metabolites in different directions of metabolism on forming the adaptation in the carp liver in the conditions of herbicide contamination is done. It was found that carp underyearlings were more plastic to the formation of metabolic adaptation in fish liver to the action of herbicides then two-year carps. Decrease the erythrocyte count and hemoglobin content in them under the influence of herbicides does not lead to increase the levels of bile pigments in the liver because of decrease a fraction of albumin in plasma (violation of transport), using the glucuronic acid for detoxication proteins degradation products for better occurring the reparative processes in the liver. Formation of adaptation in underyearlings on 21 day of experiment is shown in increase the quantitative parameters of red blood cells and hemoglobin.

Keywords: carp, herbicides, adaptation, metabolites, metabolism.

Отримано редколегією 10.07.2012