

Viacheslav Poletai



## EXCRETORY FUNCTION OF THE LIVER OF FISH AS AN INDICATOR OF ANTHROPOGENIC CHEMICAL POLLUTION OF WATER BODIES

ЕКСКРЕТОРНА ФУНКЦІЯ ПЕЧІНКИ РИБ ЯК ПОКАЗНИК ХІМІЧНОГО АНТРОПОГЕННОГО ЗАБРУДНЕННЯ ВОДОЙМ

DOI: 10.5281/zenodo.7110933

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© Poletai, V., 2022

### ABSTRACT

The results of the study of the excretory function of the liver in the detoxification of exogenous toxins of the aquatic environment are considered in the article. The ratios of the main pigment fractions of the carp gallbladder of different age groups were determined under the conditions of toxicant action of different chemical composition.

**Article's purpose.** To show the presence of fish in an environment with high concentrations of toxic substances (herbicides and phosphates) affects the liver excretory function and can serve as an indicator of chemical anthropogenic contamination of water bodies.

**Methodology.** Biotesting, ichthyotoxicological experiment, physiological and biochemical method, thin-layer chromatography, densitometry, statistical methods of processing results.

**Scientific novelty** is to determine changes in the ratio of pigment constituents of bile in response to anthropogenic contamination of reservoirs with toxicants of different chemical structure

**Conclusions.** In conditions of exogenous toxicosis, which was caused by different concentrations of chemicals of different chemical composition, namely herbicides and phosphate-containing substances on fish of different ages, we observed a significant decrease in the content of dominant fractions and the total amount of bile pigments in bile. These changes can be caused by the corresponding qualitative and quantitative changes in the course of their biosynthesis, conjugation in hepatocytes and translocation through the canalicular membranes. But, at the same time, there was an increase in the content of individual pigment fractions in the gallbladder, in particular biliverdin monoglucuronide and carbohydrate compounds of this substance, which may indicate activation in the liver and the reticulo-endothelial system of alternative detoxifying mechanisms in conditions of toxicosis. The established changes in the excretory function of the liver can be used as one of the indicators of chemical anthropogenic pollution of reservoirs.

**Key words:** bile, pigments, excretory function of the liver, anthropogenic pollution of reservoirs, detoxification.

### АНОТАЦІЯ

У статті розглядаються результати дослідження екскреторної функції печінки при детоксикації екзогенних токсинів водного середовища. Визначались співвідношення основних пігментних фракцій міхурової жовчі коропів різних вікових груп за умов дії токсикантів різного хімічного складу.

**Мета роботи.** Показати, що перебування риб в середовищі з підвищеними концентраціями токсичних речовин (гербіцидів та фосфатів) позначається на екскреторній функції печінки і може слугувати показником хімічного антропогенного забруднення водойм.

Методологія. Біотестування, іхтіотоксикологічний експеримент, фізіолого-біохімічний метод, тонкошарова хроматографія, денситометрія, статистичні методи обробки результатів.

Наукова новизна полягає у визначенні змін співвідношення пігментних складових жовчі у відповідь на антропогенне забруднення водойм токсикантами різної хімічної будови.

Висновки. В умовах екзогенного токсикозу, який був викликаний різними концентраціями хімічних речовин різного хімічного складу, а саме гербіцидами та фосфатвмісними речовинами на рибу різного віку ми спостерігали вірогідне зменшення вмісту домінуючих фракцій та сумарної кількості жовчних пігментів у жовчі. Вищевказані зміни можуть бути обумовлені відповідними якісними та кількісними змінами в перебігу процесів їх біосинтезу, кон'югації в гепатоцитах та транслокації через каналікулярні мембрани. Але, водночас мало місце зростання вмісту окремих пігментних фракцій в міхуровій жовчі, зокрема моноглюкуроніду білівердину та вуглеводних сполук цієї речовини, що може вказувати на активацію в печінці та ретикуло-ендотеліальній системі альтернативних детоксуючих механізмів в умовах токсикозу. Встановлені зміни екскреторної функції печінки може бути використано як один із показників хімічного антропогенного забруднення водойм.

Ключові слова: жовч, пігменти, екскреторна функція печінки, антропогенне забруднення водойм, детоксикація.

## Постановка проблеми

Впродовж життя гідробіоти постійно зазнають дії несприятливих екологічних чинників. На відміну від природних чинників, антропогенні, особливо хімічні, становлять для водяних організмів небезпеку, так як більша частина їх отруйна для гідробіотів. До них в ряді випадків відносять: пестициди, миючі засоби, радіонукліди, синтетичні барвники, поліароматичні вуглеводні та ін. Серед шляхів потрапляння токсикантів у водне середовище є змиви сміттєвих полігонів та стихійних сміттєзвалищ, стічні води промислових підприємств, ґрунтові води, каналізаційні стоки, забруднення побутовими відходами тощо. Таке забруднення викликає евтрофікацію водойм, і, як наслідок, погіршення якості води, розвиток деструктивних змін в організмах гідробіотів, загибель гідробіотів тощо [1].

Один зі специфічних методів моніторингу забруднення навколишнього середовища є біоіндикація – визначення ступеня забруднення геофізичних середовищ за допомогою живих організмів – біоіндикаторів. Біоіндикація використовується в екологічних дослідженнях, як метод виявлення антропогенного навантаження на біоценоз. У якості біоіндикаторів вибирають найбільш чутливі до досліджуваних факторів біологічні системи або організми. Зміни в поведженні

тест-об'єкта оцінюють у порівнянні з контрольними ситуаціями, прийнятими за еталон. Оцінку стану середовища проводять за зміною біохімічних і фізіологічних реакцій, що супроводжується накопиченням токсикантів в органах або тканинах, за характером анатомічних, морфологічних, біоритмічних і поведінкових реакцій та за зміною видового складу флористичних та фауністичних комплексів.

Серед організмів-біоіндикаторів не можна не відмітити внесок риб в процес індикації вмісту токсичних речовин у водному середовищі. Вплив концентрацій токсичних речовин, що перевищують гранично допустимі (ГДК) в декілька разів викликає у риб формування компенсаторних реакцій-відповідей, які забезпечують толерантність організму до неспецифічних чинників [2]. Ці компенсаторні реакції можна спостерігати в органах та середовищах організму вже за 3–14 діб і за ступенем їх прояву оцінювати стан водного середовища.

Детоксикація ендогенних та екзогенних токсинів є однією з провідних функцій печінки і здійснюється різними механізмами, при яких відбувається активація окремих поліферментних систем, які беруть участь в детоксикації, що певним чином може позначатись 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, в тому числі і некон'юговані жовчні пігменти. Жовчні пігменти білірубін та білівердин є кінцевими продуктами розчеплення 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 токсичні ефекти за нормальних умов життєдіяльності організмів. 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 [3]. У процесі зазначених функцій печінкою задіяна ціла низка білків-транспортів, як на синусоїдальних, так і на каналікулярних мембранах, а також безпосередньо в цитоплазмі клітин даного органу [4]. Особливу увагу у зазначеній функції приділяють вмісту диглюкуроніду білірубину. Зменшення його вмісту в жовчі свідчить про зниження детоксикаційної функції печінки [5].

Внаслідок надмірного накопичення в організмі як ендогенних, так і екзогенних токсичних речовин, що може спостерігатися при хімічному забрудненні водойм, порушується природний каскад перетворень жовчних пігментів у печінці, оскільки багато метаболічних ланок його залучається для відтворення детоксикуючої функції даного органу [6].

*Метою статті* є показати, що перебування риб в середовищі з підвищеними концентраціями токсичних речовин (гербіцидів та фосфатів) позначається на екскреторній функції печінки і може слугувати показником хімічного антропогенного забруднення водойм.

*Наукова новизна* полягає у визначенні змін співвідношення пігментних складових жовчі у

відповідь на антропогенне забруднення водойм токсикантами різної хімічної будови.

*Матеріали та методи.* Об'єктом біотестування слугував лускатий короп (*Cyprinus carpio* L.) однорічного віку масою 85–120 г та дворічного віку масою 250–300 г. Досліди з вивчення впливу токсичних речовин на організм риб проводили в 250-літрових акваріумах із водопровідною водою, яка попередньо була відстояна, в осінньо-зимовий період впродовж 14 діб. Температура води була в межах 8-10 °С, що відповідало природному рівню, також проводилась постійна аерація води за допомогою компресора. Рівень досліджуваних токсикантів (найбільш часто вживаний в Україні гербіцид раундап (гліфосат, ГДК для риб 0,02 мг/дм<sup>3</sup>) та солі ортофосфатної кислоти (ГДК для води рибних господарств становить 3,5 мг PO<sub>4</sub>/дм<sup>3</sup>) вносили у воду на початку експерименту та щоразу після заміни води задавали у розрахунку 4 ГДК для гербіциду та 2 і 5 ГДК для фосфатів. Дослідження проводили з додержанням вимог Міжнародних принципів Гельсінської декларації про гуманне ставлення до тварин. Перед забором біоматеріалу рибу знерухомлювали шляхом перерізу спинного мозку біля основи черепа. Жовч забирали після лапаротомії з жовчного міхура шляхом його пункції.

Вміст пігментних складових проводили за розробленою методикою у лабораторії НДІ фізіології імені П. Богача [6]. 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 до співвідношення 2:2:7. Після перемішування, центрифугування та упарювання ацетонової складової проводили хроматографічний розподіл екстрагованих пігментів на пластинах «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 білірубину та білівердину як в ультрафіолетовому, так і у видимому діапазоні світла із залученням денситометру ДО-1М. Цифровий матеріал обробляли методом варіаційної статистики з урахуванням критерію Стьюдента. Вірогідною вважали різницю між дослідом та контролем при  $p < 0,05$ .

### Результати досліджень

За допомогою тонкошарової хроматографії в екстрактах із жовчі коропа лускатого було виявлено, ідентифіковано та кількісно визначено три групи фракцій жовчних пігментів. У коропоподібних риб, як і у деяких інших тварин (курки, кроля), відсутній (або присутній в дуже невеликих кількостях) фермент, що перетворює білівердин на білірубін. Тому у цих тварин вільний білірубін та його похідні за фізіологічних умов в біорідинах організму або відсутні взагалі, або присутні в невеликих кількостях (іноді визначаються лише сліди). Основним пігментом у вказаних тварин є білівердин, який виявляється на хроматограмах з цілою низкою похідних, що вказує на можливу його кон'югацію не тільки з глюкуроновою кислотою [3].

Згідно Walter R. Eberlein до бутанолу має більшу спорідненість моноглюкуронід білірубину та білівердину, а також ефір глюкози із вказаними жовчними пігментами. У вказаних пігментних фракціях положення на хроматограмах ближче до фронту ( $R_f - 0,83$  і  $R_f - 0,97$ ). У водній фазі екстракту ідентифікується диглюкуронід білірубину ( $R_f 0,37 - 0,38$ ) по пірольній та по глюкуроновій складовій даної молекули. Кількість останнього є домінуючою серед пігментних складових. Некон'юговані (вільні) білірубін та білівердин майже не рухаються в

застосованій системі розчинників для хроматографії і залишаються недалеко від лінії старту (відповідно  $R_f - 0,04$  та  $0,07$ ). Між некон'югованими пігментами та їх диглюкуронідами виявляються сульфокон'югати білірубину, які дають позитивну реакцію на метиленовий синій та бромтімоловий синій, та мають відповідно  $R_f - 0,21$  для цих сполук [6].

Відповідно до вищезазначеного, визначені нами пігментні фракції було розподілено на 3 групи: сульфокон'югати білівердину, диглюкуронід білівердину та суму пігментів, що споріднені з бутанольною фазою системи розчинників: моноглюкуронід білівердину та ефіри вказаної сполуки з глюкозою (моноглюкуронідмоноглюкозид білівердину). Найбільш об'ємною фракцією, що нами визначена у міхуровій жовчі контрольної групи тварин, була фракція диглюкуроніду білівердину. В різних групах досліджуваних тварин вона складала 63 – 68 % від загальної кількості визначених нами пігментів.

Дослідження пігментних складових жовчі за умов гебіцидного токсикозу проводили на двох групах коропів: однорічного та дворічного віку. Загальний аналіз отриманих експериментальних даних показує, що при навантаженні організму коропа 4 ГДК гербіциду спостерігається реакція на зменшення сумарної концентрації жовчних пігментів та основних пігментних фракцій в жовчі, прояв якої був певною мірою залежний від віку тварин. При дії гербіциду на коропів-однорічок мало місце зменшення кількості загальних пігментів міхурової жовчі на 16,9 % ( $p < 0,05$ ). Домінуюча фракція диглюкуроніду білівердину зменшилась на 14,3 %. Моноглюкуроніди білівердину разом із його вуглеводними сполуками зменшились на 29,9 % ( $p < 0,05$ ), а кон'югати із сірчаною кислотою мали незначну тенденцію до зростання на 8,5 % (рис.1).

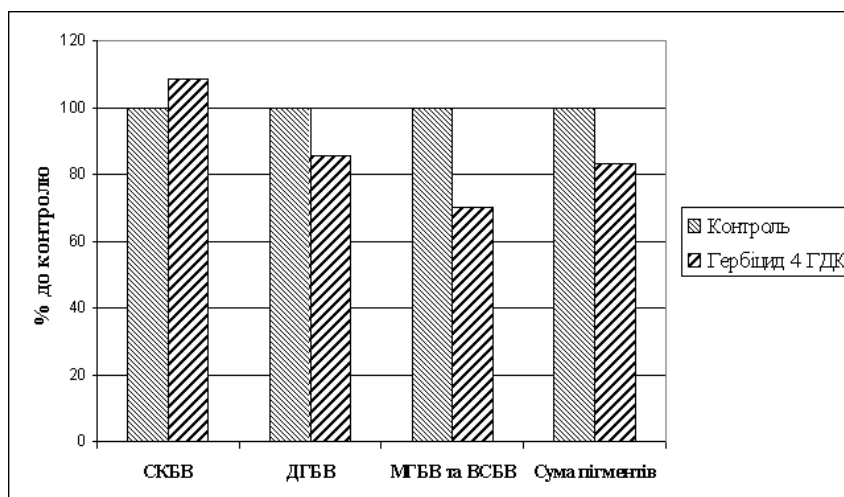


Рис. 1. Відносні зміни концентрації жовчних пігментів у міхуровій жовчі коропа одnorічного віку за дії гербіциду раундапу (4 ГДК) у відсотках до контролю, контроль = 100%, n=12.

Примітка: СКБВ – сульфокон’югати білівердину; ДГБВ – дигляукуронід білівердину; МГБВ та ВСБВ – моноглюкуронід білівердину та вуглеводні сполуки моноглюкуроніду білівердину

При дії гербіциду на коропів-дворічок мало місце зменшення кількості загальних пігментів міхурової жовчі на 20,7 % ( $p < 0,05$ ). Фракція дигляукуроніду білівердину зменшилась на 23,6 % ( $p < 0,05$ ). Моноглюкуроніди білівердину разом із його вуглеводними сполуками зменшились на 23,2 % ( $p < 0,05$ ), а кон’югати із сірчаною кислотою зросли майже на 26 % (рис. 2).

Аналізуючи в цілому дані по зміні вмісту жовчних пігментів в міхуровій жовчі коропа лускатого у водному середовищі 4 ГДК гербіциду

раундапу (гліфосату) можна констатувати зниження загального рівня жовчних пігментів та більшості їх фракцій, що може слугувати показником пригнічення детоксуючої функції печінки в змодульованих нами умовах, більш виражене у дворічок. Окрім того, вказані зміни є свідченням пригнічення біосинтетичної функції печінки та вказує на змінений стан білків-транспорттерів в каналікулярній мембрані гепатоцитів, відповідальних за транслокацію даних фракцій пігментів.

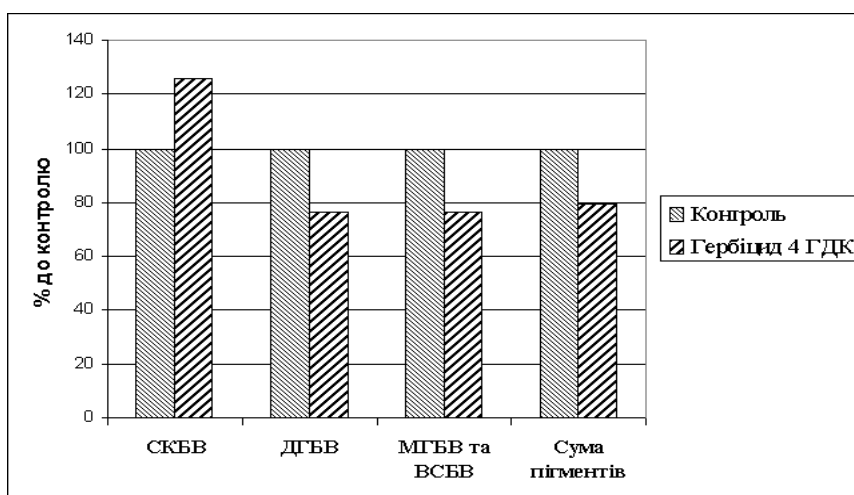


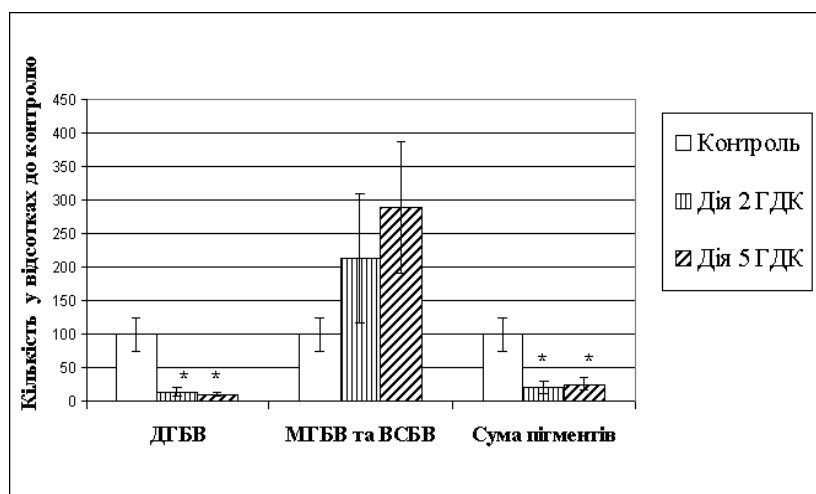
Рис. 2. Відносні зміни концентрації жовчних пігментів у міхуровій жовчі коропів дворічного віку за дії гербіциду раундапу (4 ГДК) у відсотках до контролю, контроль = 100 %, n=10.

Примітка: СКБВ – сульфокон’югати білівердину; ДГБВ – дигляукуронід білівердину; МГБВ та ВСБВ – моноглюкуронід білівердину та вуглеводні сполуки моноглюкуроніду білівердину

Дослідження пігментних складових жовчі за умов фосфатного токсикозу проводили на трьох групах коропів дворічного віку, серед яких одна була контрольною, а на дві інші діяли різними концентраціями фосфатвмісних речовин: 2 ГДК та 5 ГДК.

Провівши порівняльну характеристику хроматограм контрольної та досліджуваних груп риб ми виявили майже повну відсутність пігментної фракції в дослідних зразках, що

відповідають рівню сульфокон'югатів білівердину у контролі ( $R_f - 0,21$ ). Також виявлено значне, залежне від концентрації у воді токсиканта, зменшення вмісту диглюкуроніду білівердину в порівнянні з контролем. За умов дії 2 ГДК фосфатвмісних речовин вміст диглюкуроніду білівердину зменшився на 86,2 % ( $p < 0,05$ ), а за умов дії 5 ГДК фосфатвмісних речовин вміст вищевказаного пігментного кон'югату зменшився на 88,9 % ( $p < 0,05$ ) (рис. 3).



**Рис. 3.** Вміст основних фракцій жовчних пігментів в міхуровій жовчі коропа лускатого дворічного віку за дії 2 та 5 ГДК фосфатовмісних речовин у відсотках до контролю (контроль = 100 %),  $n=15$ .

Примітка. ДГБВ – диглюкуронід білівердину; МГБВ та ВСБВ – моноглюкуронід білівердину та вуглеводні сполуки моноглюкуроніду білівердину; \* –  $p < 0,05$

При проведенні порівняння контрольних та дослідних проб пігментних фракцій, які споріднені з бутанольною фазою екстракту жовчі – моноглюкуроніду білівердину та моноглюкуронідмоноглюкозиду білівердину, спостерігалась тенденція до їх зростання, яка прямо корелювала з концентрацією у воді фосфатовмісних речовин. За умов дії 2 ГДК фосфатів сума бутанол-розчинних пігментів зросла у складі жовчі у 2,14 рази, а за умов дії 5 ГДК – вона зросла майже утричі.

Сумарна кількість пігментів у жовчі, враховуючи неідентифіковані фракції, вірогідно зменшилась на 78,4 % ( $p < 0,05$ ) порівняно з

контрольною групою тварин при дії 2 ГДК фосфатовмісних речовин, та на 74,2 % за умов дії 5 ГДК фосфатовмісних речовин.

Вищевказане може бути наслідком пригнічення активності біосинтетичних та транслокаційних процесів через каналікулярну мембрану гепатоцитів. Диглюкуронід білівердину та сульфокон'югати білівердину є фракціями жовчних пігментів, які утворюються виключно в печінці і є показником її дезінтоксикаційної функції. Значне зменшення їх у складі міхурової жовчі вказує на пригнічення дезінтоксикаційної функції печінки в умовах токсикозу.

## Висновки

В умовах екзогенного токсикозу, який був викликаний різними концентраціями хімічних речовин різного хімічного складу, а саме гербіцидами та фосфатвмісними речовинами на риб різного віку, ми спостерігали вірогідне зменшення вмісту домінуючих фракцій та сумарної кількості жовчних пігментів у жовчі. Вищевказані зміни можуть бути обумовлені відповідними якісними та кількісними змінами в перебігу процесів їх біосинтезу, кон'югації в

гепатоцитах та транслокації через каналікулярні мембрани. Але, водночас мало місце зростання вмісту окремих пігментних фракцій в міхуровій жовчі, зокрема моноглюкуроніду білівердину та вуглеводних сполук цієї речовини, може вказувати на активацію в печінці та ретикуло-ендотеліальній системі альтернативних детоксуючих механізмів в умовах токсикозу. Встановлені зміни екскреторної функції печінки може бути використано як один із показників хімічного антропогенного забруднення водойм.

## References

1. Dudnyk, S., and Yevtushenko, M. (2013). *Vodna toksykolohiya: osnovni teoretychni polozhennya ta yikhnye praktychne zastosuvannya: monohrafiya*. [Water toxicology: basic theoretical concepts and their practical application: monograph]. Kyiv, Ukraine : Vydavnytstvo Ukrayinskoho fitosotsiologichnoho tsentru.  
Дудник С., Євтушенко М. Водна токсикологія: основні теоретичні положення та їхнє практичне застосування: монографія. Київ: Вид-во Українського фітосоціологічного центру, 2013.
2. Zhydenko, A. (2009). *Morfofiziologichni adaptatsiyi riznovikovykh hrup Cyprinus carpio L. za nespryyatlyvoyi diyi ekolohichnykh faktoriv* [Morphophysiological adaptations of *Cyprinus carpio* L. of different age groups under adverse environmental factors]. *Extended abstract of doktor's thesis*. Odesa, Ukraine : Odessa I. I. Mechnikov National University.  
Жиденко А. Морфологічні адаптації різновікових груп *Cyprinus carpio* L. за несприятливої дії екологічних факторів: Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук, Одеса : Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, 2009.
3. Romanenko, V. (1978). *Pechen i regulyatsiya mezhutochnogo obmena (mlekoopitayushchiye i ryby)* [Liver and regulation of intermediate metabolism (mammals and fish)]. Kyiv, Ukraine : Naukova dumka.  
Романенко В. Печень и регуляция межучного обмена (млекопитающие и рыбы). Київ : Наукова думка, 1978.
4. Ganitkevich, Ya. (1980). *Rol zhelchi i zhelchnykh kislot v fiziologii i patologii organizma* [The role of bile and bile acids in the physiology and pathology of the body]. Kyiv, Ukraine: Naukova dumka.  
Ганиткевич Я. Роль желчи и желчных кислот в физиологии и патологии организма. Київ : Наук.думка, 1980.
5. Saratkov, A., and Skakun, N. (1991). *Zhelcheobrazovaniye i zhelchegonnyye sredstva* [Bile formation and choleric drugs]. Tomsk, Russia : Tomsk University.  
Саратков А., Скакун Н. Желчеобразование и желчегонные средства. Томск : Томский университет, 1991.
6. Harnyk, T., Makarchuk, M., Krokhina, T., Samokhina, H., Horenko, Z., Poletai, V. et al. (2009). *Sposib vyznachennya spektra pokhidnykh bilirubinu ta biliverdynu v biolohichniy ridyni: Patent na korysnu model* [Method for determining spectrum of bilirubin and biliverdin derivatives in biological fluid: Utility model patent] №41602 / – Zayavleno 30.01 2009r, № zayavky u 2009 00708; opubl. 25.05.2009. biul. № 10.  
Гарник Т., Макарчук М., Крохіна Т., Самохіна Г., Горенко З., Полетай В. та ін. Спосіб визначення спектра похідних білірубину та білівердину в біологічній рідині: Патент на корисну модель №41602 / – Заявлено 30.01 2009р, № заявки у 2009 00708; опубл. 25.05.2009. бюл. № 10.

Received: 09.01.2020. Accepted: 23.01.2020. Published: 07.01.2022.

**Cite this article in APA Style as:**

Poletai, V. (2022). Ekskretorna funktsiia pechinky ryb yak pokaznyk khimichnoho antropohennoho zabrudnennia vodoim [Excretory function of the liver of fish as an indicator of anthropogenic chemical pollution of water bodies]. *BHT: Biota. Human. Technology*, 1(1), 74–81. (in Ukrainian)

**Information about the author:**

**Poletai V.** [*in Ukrainian*: Полегай В.], Ph.D. in Biol. Sc., Assoc. Prof., email: v\_poletaj@ukr.net

ORCID: 0000-0002-0231-2740

Department of Biology, T.H. Shevchenko National University “Chernihiv Colehium”,  
53 Hetmana Polubotka Street, Chernihiv, 14013, Ukraine