

ОЦІНКА ТОЛЕРАНТНОСТІ КАРАСЯ *CARASSIUS AURATUS* ДО ДІЇ ЗАБРУДНЕННЯ З ВИКОРИСТАННЯМ НАБОРУ СПЕЦИФІЧНИХ І НЕСПЕЦИФІЧНИХ БІОХІМІЧНИХ МАРКЕРІВ

Г. І. Фальфушинська

Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка

Для оцінки адаптивної здатності карасів із двох місцевостей, умовно чистої (З) та забрудненої (Б), утримували в присутності солей міді (0,005 і 0,05 мг/л Cu^{2+}) та марганцю (0,17 і 1,7 мг/л Mn^{2+}) протягом 14 діб. У риб Б-групи порівняно з З-групою виявлено ознаки перебування у токсичному середовищі: вищий вміст металотіонеїнів (МТ) (за вмістом тіолів), нижчі металозв'язуюча здатність МТ та, особливо, активність ізоформ супероксиддисмутази. Дія іонів металів у риб обох груп викликала посилення утворення супероксиданіону та активацію глутатіон-S-трансферази. Для карбонільних похідних білків тварин за умов експозиції характерні сайт- і металоспецифічні зміни. Збільшення вмісту МТ виявлено лише в З-групі, тоді як у тварин Б-групи проявляються ознаки перевищення детоксикаційних можливостей МТ.

Ключові слова: МІДЬ, МАРГАНЕЦЬ, МЕТАЛОТІОНЕЇНИ, СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗА, СУПЕРОКСИДАНІОН, ГЛУТАТІОН-S-ТРАНСФЕРАЗА, КАРАСЬ, АДАПТАЦІЯ, БІОХІМІЧНІ МАРКЕРИ

Використання біохімічних підходів у галузі екологічного моніторингу водного середовища як ланки системи раннього виявлення ефектів дії забруднюючих речовин у країнах Європи набуває все більшої популярності [1]. Біохімічні маркери мають переваги для виявлення, розуміння механізмів токсичності та ефекту полютантів на життєвий статус біоти. Разом з тим, накопичення досвіду диктує необхідність розширення та уточнення деяких первинних уявлень. Перш за все це стосується відносності поділу біомаркерів на специфічні та неспецифічні. Як відомо, специфічні біомаркери, до яких відносять металотіонеїни, холінестеразу тощо, формують відповідь на дію лише певного токсиканта чи їх групи, тоді як неспецифічні, наприклад, рівень цитогенетичних аномалій, порушення стабільності мембран, активність глутатіон-S-трансферази тощо, проявляють чутливість до зміни екологічної ситуації в цілому [2]. Разом з тим, останнім часом доведено, що МТ індукуються не лише важкими металами, але й прооксидантними сполуками органічної та неорганічної природи, що дозволяє їх віднести до неспецифічних маркерів [3]. Однак, такі дослідження, в основному, проведені на морських тваринах, тоді як для прісноводних риб немає достатніх підстав для оцінки селективності їх відповіді [2, 3]. Біохімічні показники прісноводних риб в умовах природних водойм Україні дослідженні фрагментарно [4].

Карась *Carassius auratus* володіє унікальними морфологічними та біохімічними пристосуваннями в зябрах, які забезпечують адаптацію до умов гіпоксії та визначають його унікальну витривалість до факторів водного оточення [5]. Разом з тим, тканинна специфічність біохімічних маркерів та межі їх чутливості у карася мало досліджені, не встановлені механізми стрес-реакції та адаптації і участь в них як специфічних стрес-редуючих факторів [6]. Тому метою нашого дослідження стало з'ясувати межі толерантності біохімічних показників карася, адаптованого до різних умов природного середовища, до дії міді та марганцю на організм на підставі вивчення набору специфічних та неспецифічних біохімічних маркерів у тканинах печінки і зябер.

Матеріали і методи

Дослідження проводились на дорослих особинах карася, родина Коропових (*Carassius*

auratus gibelio). Екземпляри брали із двох місцевостей: рибогосподарські ставки в урочище Залізці у верхів'ї ріки Серет (умовно чиста місцевість) та став у нижній течії ріки Нічлава, нижче м. Борщів, у якому не працюють очисні споруди, в районі відносно високої аграрної активності. Екземпляри карася відбирали траловим методом і доставляли в лабораторію, де були адаптовані до лабораторних умов протягом 7 діб. Експериментальні умови створювали в басейнах об'ємом 200 л з кількістю риб з розрахунку 1 особина на 40 л води. Вміст кисню у воді підтримували на рівні 7,0–8,0 мг/л, вуглекислого газу — 2,2–2,8 мг/л, рН — 7,6–8,0. Воду відстоювали і змінювали щодобово, поновлюючи у експериментальних групах вміст досліджуваних сполук у воді. Температура води коливалась в межах 15–18 °С залежно від сезону. Тварин годували комерційним кормом.

З відібраних з кожної водойми риб формували три групи для вивчення впливу кожного металу — одна контрольна, іншим у воду додавали сіль металу. Вміст міді (Cu^{2+} у вигляді CuSO_4) складав 0,005 та 0,015 мг/л. Вміст марганцю (Mn^{2+} у вигляді MnCl_2) складав 0,17 та 1,7 мг/л. Вміст металу у воді створювали додаванням солі фірми «Реахим» кваліфікації «хч» і контролювали за допомогою атомно-абсорбційної спектроскопії. Досліджувана концентрація металів була близькою або нижчою, ніж їх середній вміст у прісних водоймах України [5, 7]. Інкубація риб у досліджуваних розчинах тривала 14 діб, що вважається оптимальним строком для аклімації [8].

Експерименти на тваринах проводились у відповідності до Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та наукових цілей (Страсбург, 1986), ухвали Першого національного конгресу з біоетики (Київ, 2000). Тварин умертвляли під ефірним наркозом, вимірювали (до мм) і зважували (до мг). Печінку і зябра відокремлювали, осушували фільтрувальним папером і зважували. Всі процедури з відбору і обробки тканин проводили на холоді. Всі реактиви, крім нижчезазначених, були фірми «Реахим» кваліфікації «хч».

МТ виділяли хроматографічно із термостабільного екстракту тканин карася [7]. У середовище виділення додавали 10 мМ 2-меркаптоетанол («Sigma») для запобігання окиснення SH-груп та інгібітор протеаз фенілметилсульфонілфторид (0,1 мМ, «Sigma»). Для визначення метал-депонуєчої функції МТ здійснювали їх гель-розподільчу хроматографію на сефадексі G-50 за умов описаних в [7, 9]. Вміст міді та цинку в об'єднаному елюаті МТ визначали після спалювання зразків у перегнаній нітратній кислоті в співвідношенні 1:5 (маса:об'єм) на атомно-абсорбційному спектрофотометрі С-115 (Ломо), кадмію — на графітовому спектрофотометрі S-600 (Селмі) і виражали в нмоль на г сирої маси тканини [9]. Обчислювали вміст МТ у тканині за вмістом цинку і міді у їх складі (МТ(Ме)), враховуючи стехіометрію зв'язування [10] та за вмістом тіолових груп (МТ) [11].

Активність супероксиддисмутази (СОД) [КФ 1.15.1.1] вимірювали за зниженням швидкості відновлення нітротетразолію синього. Для визначення активності Мп-СОД гомогенат попередньо інкубували протягом 1 год у присутності 5 мМ KCN, а активність Cu,Zn-СОД визначали за різницею активності СОД у присутності та відсутності KCN [12]. Вміст карбонільних похідних білків (КПБ) визначали за їх здатністю утворювати 2,4-динітрофенілгідразони [13], утворення супероксид аніон-радикалу у розчинній фазі гомогенату — за ступенем відновлення цитохрому с [14]. Активність глутатіонтрансферази (GST) [КФ 2.5.1.18] визначали спектрофотометрично за утворенням адуктів 1-хлоро-2,4-динітробензолу з глутатіоном [15]. Визначали індекс антиоксидантного стану у тканинах карася за показниками ізоформ СОД, вмістом МТ, рівня КПБ та утворення супероксид аніон-радикалу [16].

Результати вимірів подані у вигляді $M \pm SD$ для восьми тварин дослідної групи або для трьох вимірів для хроматографічної фракції. Вірогідність відхилення двох рядів значень обчислювали з використанням *t*-тесту Стьюдента. Порівняльний аналіз біологічних параметрів здійснювали, використовуючи комп'ютерні програми Statistica v 7.0 та Exel для Windows-2000.

Результати й обговорення

Визначення вмісту МТ за кількістю тілових груп демонструє їх вищий базовий рівень у тварин Б-групи у контролі, ніж у З-групи (рис. 1 А).

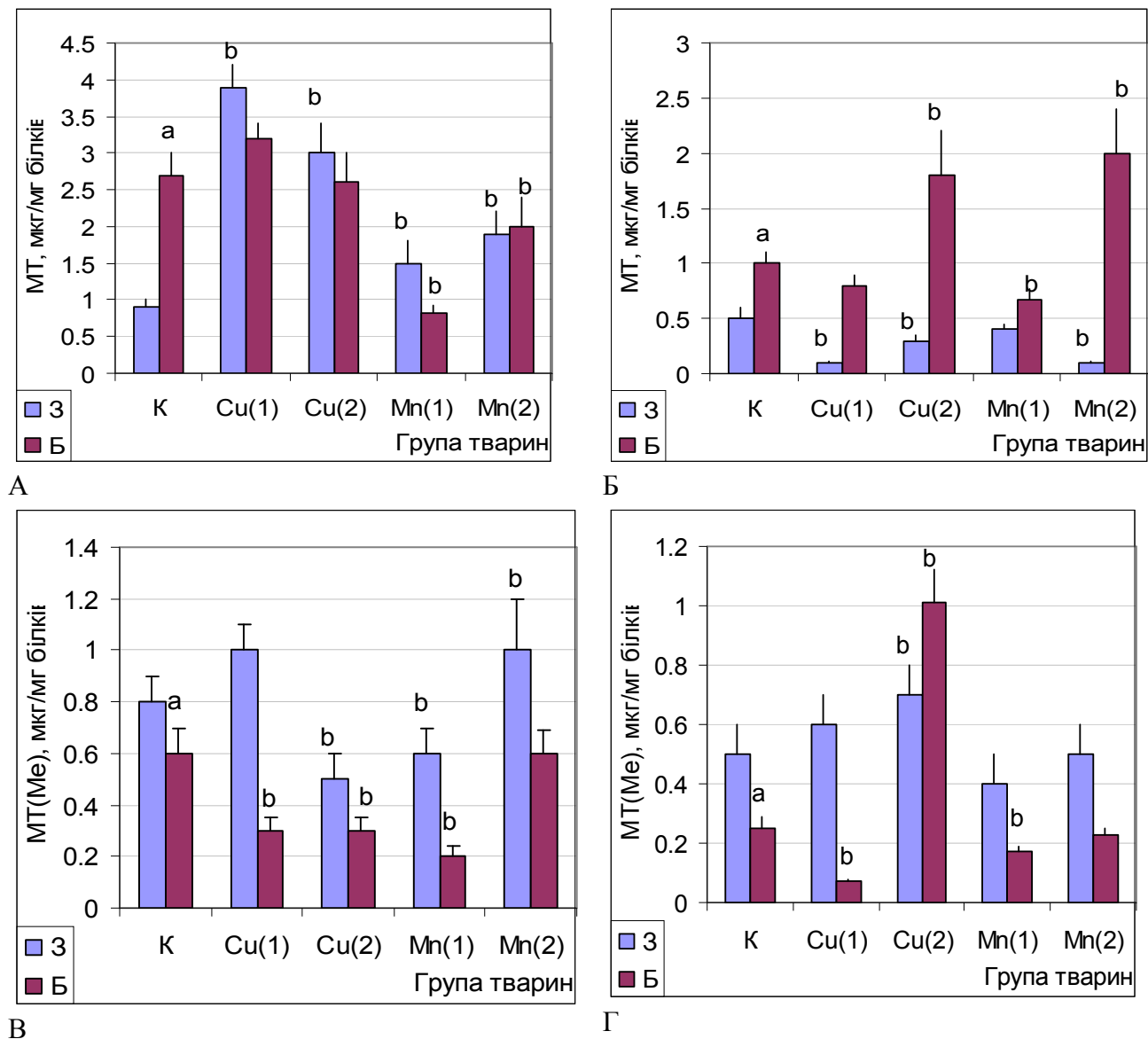


Рис. 1. Вміст металотіонеїнів за вмістом тілових груп (А, Б) та вмістом цинку і міді у їх складі (В, Г) у печінці (А, В) та зябрах (Б, Г) карасів із умовно чистої (З) та забрудненої (Б) місцевостей за дії міді та марганцю на організм. Тут і далі: ^a — відмінності між контрольними групами тварин З- та Б-груп, ^b — зміни порівняно з контролем у кожній групі, $p < 0,05$

Разом з тим, за дії важких металів у печінці карасів З-групи вміст МТ зростає в 1,5–4 рази, а в Б-групи — стабільний або, навіть, зменшується за дії марганцю. У зябрах проявляються протилежні зміни: зменшення вмісту МТ у тварин З-групи, та збільшення за дії вищих концентрацій міді та марганцю у тварин Б-групи.

МТ інтактних тварин З-групи володіють вищою метал-зв'язуючою здатністю, порівняно з Б-групою (рис. 1 Б). Саме в тканинах тварин Б-групи цей показник виявився більш чутливим до умов експерименту: дія нижчих концентрацій міді та марганцю викликали його дво-чотирикратне пригнічення та п'ятикратне зростання за дії вищої концентрації міді у зябрах. Зміни вмісту та металозв'язуючої здатності МТ тварин в обох

групах відбуваються не узгоджено, що підтверджено результатами кореляційного аналізу ($p > 0,05$).

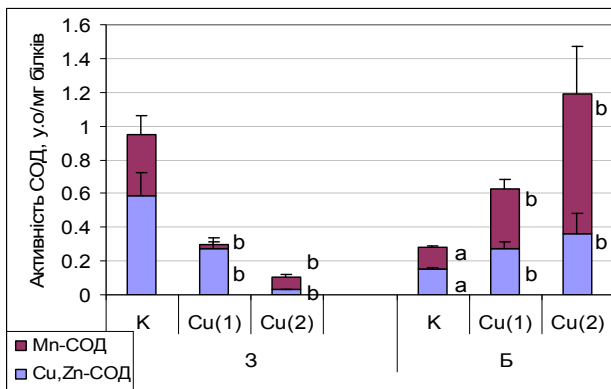
У зв'язку з відзначеними особливостями відповіді МТ на дію пошкоджуючих чинників, та зважаючи, що МТ, поряд з функцією депонування та детоксикації важких металів, можуть функціонувати як пастки активних форм кисню [3], становило інтерес оцінити реакцію системи антиоксидантного захисту в тих же умовах. У тканинах контрольних тварин активність Cu,Zn-SOD вища або подібна до активності Mn-залежної форми (рис. 2 А–Г). Сайт-специфічні відмінності контрольних груп тварин стосуються вищої активності ізоформ СОД у карасів 3-групи, порівняно з Б-групою. За впливу важких металів у тварин 3-групи активність ізоформ СОД зменшується, особливо за високих концентрацій діючих чинників у печінці. Діапазон варіабельності показника у зябрах порівняно нижчий. У тварин Б-групи активність ізоформ СОД зазнає протилежних до 3-групи змін, вона зростає, особливо помітно, в 2–5 разів, за дії високих концентрацій важких металів.

Дія міді та марганцю стимулює утворення супероксиданіону у печінці та в більшості випадків у зябрах карасів обох досліджуваних популяцій. Виняток становить його пригнічення у зябрах тварин 3-групи за дії марганцю (рис. 2 Д, Е). Разом з тим, рівень утворення карбонільних похідних білків у жодному з досліджуваних випадків не збільшується, навпаки, у тварин 3-групи в зябрах та Б-групи в печінці зменшується в 2–3 рази (рис. 2 Є, Ж). Зміни утворення супероксиданіону та активності ізоформ СОД відбуваються узгоджено в 3-групі ($-0,51 < r < -0,71$, $p < 0,01$) та не узгоджено в Б-групі ($p > 0,05$). Разом з тим, у тварин Б-групи встановлено наявність позитивної кореляції між рівнем утворення продуктів пероксидації білків та активністю ізоформ СОД ($-0,49 < r < -0,81$, $p < 0,01$).

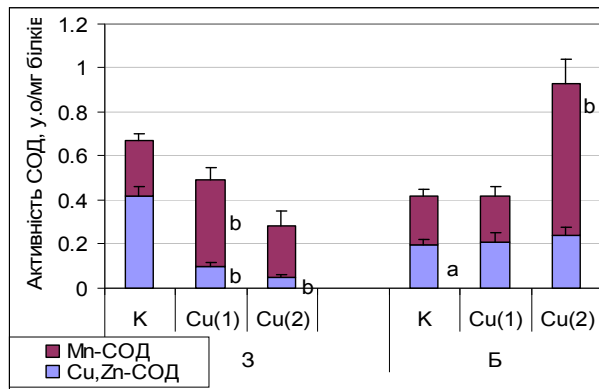
Активність GST нижча у тканинах тварин Б-групи, ніж у 3-групи. Дія обраних концентрацій важких металів в обох групах тварин посилює активність GST, з більшим діапазоном варіабельності показника у тварин 3-групи. Визначення індексу антиоксидантного стану дозволяє розцінити відповідь тварин Б-групи на дію пошкоджуючих чинників як оксидативний стрес, найбільш яскраво виражений у печінці за дії вищої концентрації міді, а у зябрах — марганцю (рис. 4). Відповідь тварин 3-групи має відносно збалансований характер за окремими виключеннями: ознаки оксидативного стресу проявляються за дії нижчої концентрації міді в печінці і вищої концентрації марганцю у зябрах.

Одержані результати визначення вмісту МТ у тканинах карася свідчать, що метод, який ґрунтується на вимірюванні вмісту тіолів, краще відображає експресію МТ, яка істотно посилилась у карасів 3-групи (у 2–4 рази), та зменшилась (у два рази) в печінці у карасів Б-групи за дії марганцю. Нездатність реагувати на підвищений вміст металу в середовищі, очевидно є ознакою виснаження детоксикаційної функції МТ, що ми спостерігали і у жаб, і у коропа із забрудненої місцевості [7, 9] та їх включення у антиоксидантний захист як пастки активних форм кисню [3].

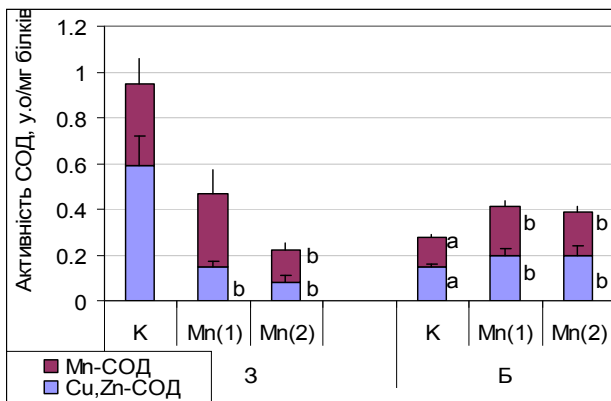
Визначення двох характеристик МТ карася продемонструвало неузгодження між кількістю тіолових груп у білка та їх металозв'язуючою здатністю, яке спростовує універсальність МТ, як специфічних маркерів забруднення середовища важкими металами.



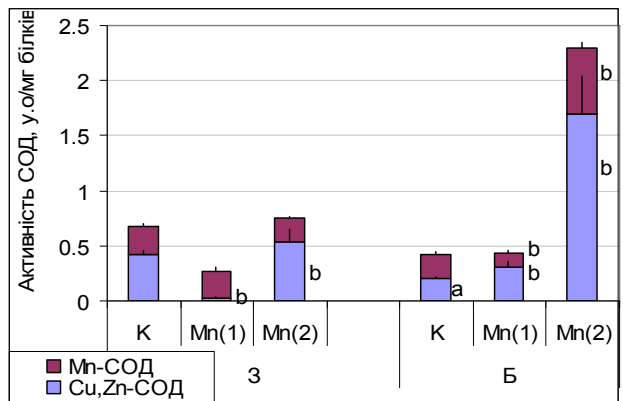
А



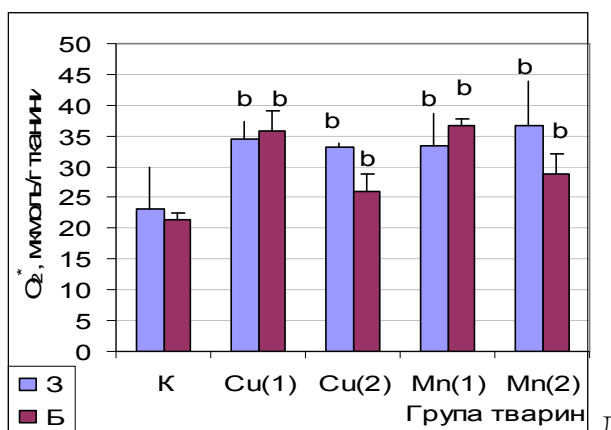
Б



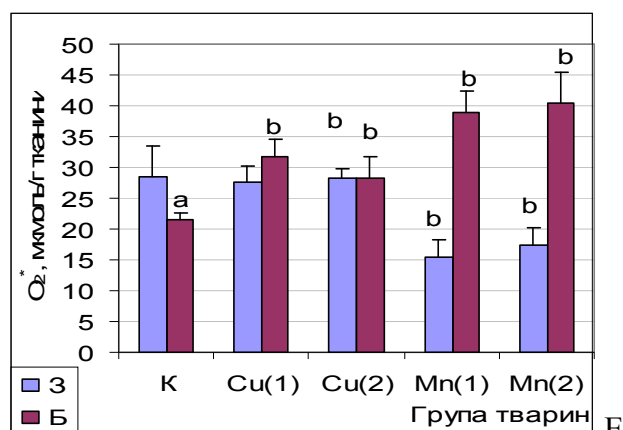
В



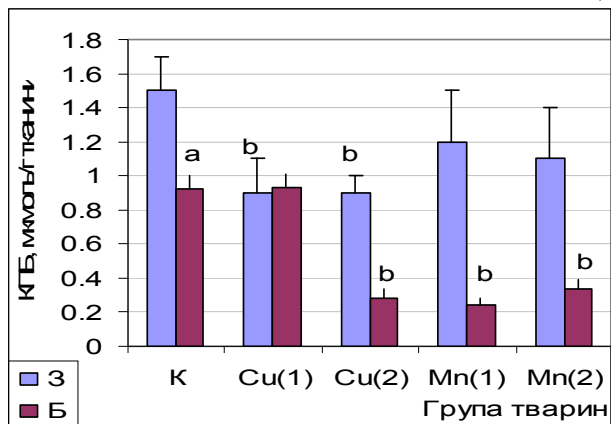
Г



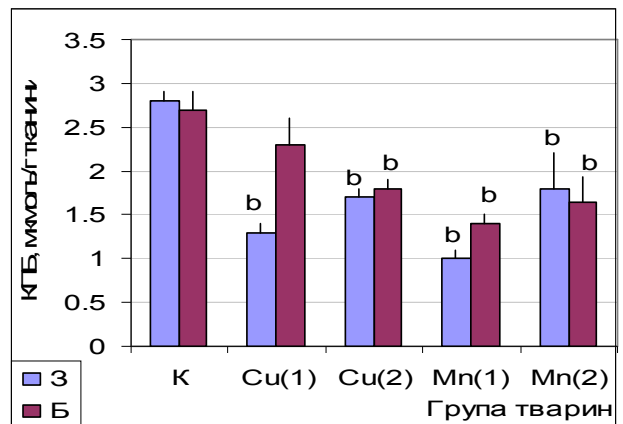
Д



Е



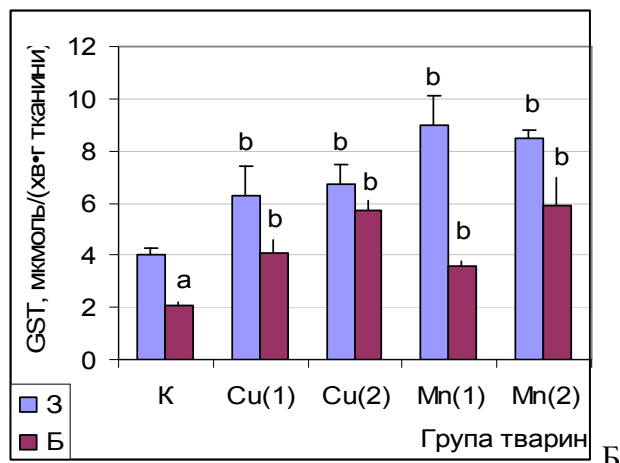
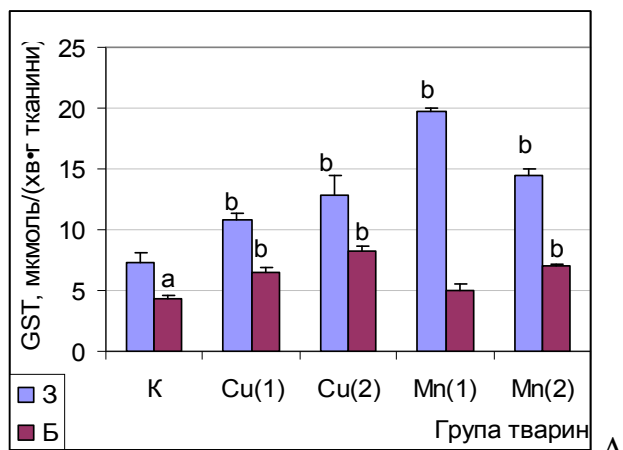
Е



Ж

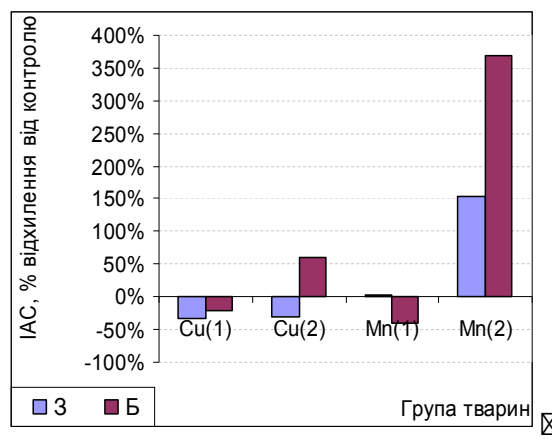
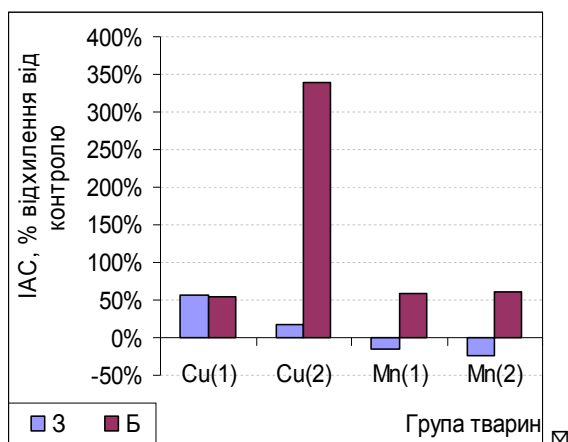
1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24. 25. 26. 27. 28. 29. 30. 31. 32. 33. 34. 35. 36. 37. 38. 39. 40. 41. 42. 43. 44. 45. 46. 47. 48. 49. 50. 51. 52. 53. 54. 55. 56. 57. 58. 59. 60. 61. 62. 63. 64. 65. 66. 67. 68. 69. 70. 71. 72. 73. 74. 75. 76. 77. 78. 79. 80. 81. 82. 83. 84. 85. 86. 87. 88. 89. 90. 91. 92. 93. 94. 95. 96. 97. 98. 99. 100.

За вмістом металів у складі МТ можна говорити про малу ефективність метал-депонуєчої функції МТ у карасів Б-групи, що може бути зумовлено не лише забрудненням важкими металами, але і органічними речовинами, які порушують функціонування транспортних систем, структуру акцепторів металів у клітинах [17]. Таким чином можна припустити, що в токсичному середовищі МТ більш чутливі до окиснення, беруть участь в антиоксидантному захисті і менше у зв'язуванні важких металів.



Група тварин: 3 (синій), Б (червоний). Статистичні значення: a, b.

Як відомо, мідь для хребетних є другим за токсичністю та афінністю до МТ металом після ртуті [18, 19]. У нашому дослідженні саме іони міді в малій концентрації виявилися найбільш ефективним індуктором МТ. Очевидно це пов'язано із структурними та функціональними особливостями МТ, оскільки мідь є фізіологічним металом для МТ [18]. Дія міді, так як і кадмію та ртуті, які вважаються найбільш ефективними індукторами синтезу МТ, також збільшує рівень м-РНК МТ, що було показано для безхребетних [20] та хребетних [21], причому мідь-індуковані МТ мають подібні властивості до кадмій-індукованих МТ. Разом з тим, для марганцю не відомі специфічні механізми зв'язування в тіолатні кластери.



Група тварин: 3 (синій), Б (червоний). Статистичні значення: a, b.

Окисдаційний стрес є одним з ключових активаторів клітинної адаптації

організму [22]. Співвідношення активності антиоксидантних систем і рівня оксидативної деструкції біомолекул може змінюватися залежно від стану організму, впливу різних факторів навколишнього середовища тощо. Стресорна реакція в нормі може супроводжуватися короткотривалим збільшенням рівня активних форм кисню, що зумовлено реакцією адаптації організму до екстремальних умов, в яких активні форми кисню виконують функцію вторинних месенджерів, які беруть участь в передачі сигнальної трансдукції та в експресії ряду генів [17]. Проте, за умов розбалансування антиоксидантних ферментів порушується ефективна утилізація утворених вільних радикалів і проявляються ознаки токсичності. У нашому експерименті така ситуація спостерігалася у тварин Б-групи за дії пошкоджуючи чинників, де на тлі активації СОД зростав рівень утворення супероксиданіону.

Участь GST в елімінації наслідків впливу продуктів метал-індукованого оксидативного стресу була продемонстрована у багатьох видів. Вважають, що крива залежності активності GST від концентрації діючого чинника має дзвоноподібну форму: при збільшенні концентрації металу активність ферменту спочатку наростає, а потім починає зменшуватися. Зокрема, у карася *Carassius auratus* за хронічної дії іонів міді в діапазоні концентрацій 0,0025–0,25 мг/л, максимум активності GST припадає на ефект дії 0,005 мг/л міді [23]. У цій роботі показано нижчий базовий рівень GST у контролі тварин Б-групи, ніж у З-групи, що очевидно пов'язано із інгібуючою дією на активність ферменту хронічного комплексного забруднення важкими металами та органо-металічними сполуками, характерного для цієї території [4, 7, 9]. Зроблене припущення знаходить підтвердження в літературі та в наших модельних експериментах. Зокрема, Pandey зі співав. [24] в акваріальному дослідженні впливу модельної суміші міді, кадмію, заліза та нікелю на *Channa punctata* відзначили узгоджене зменшення активності GST та рівня відновленого глутатіону в тканинах. У нашому ж експерименті більший діапазон варіабельності показника характерний саме для дії нижчої концентрації важких металів.

Висновки

Таким чином, у риб Б-групи порівняно з З-групою виявлено ознаки перебування у токсичному середовищі: вищий вміст МТ (за вмістом тіолів), нижчу металозв'язуючу здатність МТ, та, особливо, активність ізоформ СОД. Тварини З-групи виявилися більш толерантними до дії міді та марганцю, порівняно із тваринами Б-групи. Зокрема, дія важких металів у тканинах тварин З-групи викликає збільшення вмісту МТ, активності GST, утворення супероксиданіону та зменшення активності СОД і рівня КПБ. У зябрах відзначені зміни були менш помітними та менше відображали відмінності між рибами з двох місцевостей, ніж у печінці, що дозволяє рекомендувати саме печінку карася для оцінки якості середовища. Біологічну відповідь карасів З-групи на дію важких металів можна розцінити як збалансовану та адекватну, а карасів Б-групи — як оксидативний стрес.

Перспективи подальших досліджень. Проведене дослідження робить перспективним використання біохімічних маркерів карася *Carassius auratus* для оцінки токсичності середовища. Планується дослідити біохімічні характеристики та вміст металів у карася з обраних місцевостей в умовах експериментального впливу пестицидів.

Робота виконувалась за підтримки МОН України в рамках спільних міжнародних науково-технічних проектів № М/256-2008 та №М/567-2009 та Західноукраїнського біомедичного центру.

Н. І. Falfushynska

EVALUATION OF TOLERANCE OF CRUCIAN CARP *CARASSIUS AURATUS* UNDER EFFECT OF POLLUTION USING THE BATTERY OF SPECIFIC AND NON-SPECIFIC BIOCHEMICAL MARKER

Summary

To evaluate the adaptive ability of crucian carp from two sites in relatively clean (Z) and polluted (B) area, animals were treated by copper (0,005 and 0,05 mg·l⁻¹ Cu²⁺) and manganese (0,17 and 1,7 mg·l⁻¹ Mn²⁺) salts during 14 days. In the fish from B-group compared with Z-group the features of reside in toxic surrounding such as a higher level of metallothioneins (MTs) (by thiols measuring), lower metal-binding ability of MTs, and especially activity of superoxide dismutase isoforms were observed. Effects of metal ions in fish from both groups were enhanced of superoxide anion formation and activated of glutathione-S-transferase. The site- and metal-specific changes for animal protein carbonyls under exposure condition were shown. The enlargement of MTs contents were found only in the Z-group, while in animals from B-group some features of excess of MTs detoxification capacity were testified.

Г. И. Фальфушинская

ОЦЕНКА ТОЛЕРАНТНОСТИ КАРАСЯ *CARASSIUS AURATUS* К ДЕЙСТВИЮ ЗАГРЯЗНЕНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАБОРА СПЕЦИФИЧЕСКИХ И НЕСПЕЦИФИЧНЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ

Аннотация

Для оценки адаптивной способности карасей из двух местностей, условно чистой (З) и загрязненной (Б), удерживали в присутствии солей меди (0,005 и 0,05 мг/л Cu²⁺) и марганца (0,17 и 1,7 мг/л Mn²⁺) на протяжении 14 суток. У рыб Б-группы по сравнению из З-группой зарегистрированы признаки пребывания в токсической среде: более высокое содержание металлотионеинов (МТ) (по содержанию тиолов), более низкую металлосвязывающую способность МТ, и, особенно, активность изоформ супероксиддисмутазы. Действие ионов металлов у рыб обеих групп вызывало усиление образования супероксиданиона и активацию глутатион-S-трансферазы. Для карбонильных производных белков животных в условиях экспозиции характерны сайт- и металлоспецифические изменения. Увеличение содержания МТ выявлено лишь в З-группе, тогда как у животных Б-группы проявляются признаки превышения детоксикационных возможностей МТ.

1. *V i a r A e T h l g e o u s o e n a o k e b i s i n b t i o e m r o n a i p p o r r d a n g h a A s 2 e p o l l i u m d m e d s t r e s s s y n d A o m V i a m e n s g o B , t o i l D e g l n l e o v t g a n / C o m p . B i o c h e m 0 . 0 7 V o l 1 5 . C a 1 4 . 6 - 3 8 0 .*

2. *M o n s e j r . r a m . l l u t i o n a r k e r s i n e s t u a r i n e a n i m p e r s p e j . c t i M . e s M o / n s e r r a t , P . E . C a m p i n B i z o c H e m . A . P k 2 0 0 7 V o l 4 6 . - C . - 2 3 4 .*

3. *G a g n e t h a n t u r m e t a f l o t h i o n e a l o l h e i a n m y t t h a e l s a n r e a c o x i y v g s p e n c i a q u a d r i g a n i m p h i s i : c a u s i e o d i s s o m a f r k e e a r m y o f f F e c t s i f i e i h d e s t i g a t G o g n e , C . B . d . a / i B i n e d . c . k a m i - g h 0 0 - 8 V o l - P . 3 4 1 .*

4. *F a l f u s h R i e m s p k o a n s H . b i o c h e m i C a y l p r i n a u f k e o r a m r i p w i o o c f a i s i t e s i n W e s t e r n U k r a i n e / H . F a l f u h - P M o k a , C 7 2 , 3 - N P . - 7 3 8 .*

5. *N i l s s o H y p G o x i E . s u r v i v a l s t r a t e g i t e o s l e i r n a n c w o N o r t h E u r o p e a n c r u c i a n c a r p a n d e a f t G . H N i k h y p o x G . M . C . R e n s h J a . w E / x / p - 2 0 0 4 V o l 2 0 7 - P 3 1 3 3 1 1 3 9 .*

6. *Биохимические маркеры адаптивности карася к воздействию загрязнителей в условиях экологического мониторинга. Фальфушинская Г. И. // Биологический журнал. - 2010. - Т. 12. - № 2. - С. 260-268.*

1. *Falfushy* *F. n. k. a. i. H. n. b. f. i. m. e. t. C. a. l. p. l. p. o. i. t. n. h. i. s. o. n. a. i. m. p. r. i. o. o. f. i. e. l. i. n. W. e. s. t. e. r. n. U. k. r. a. i. n. e. / H. I. F. a. l. f. u. s. h. y. 2010. Vol. 18. P. 144-152.*

2. *Falfushy* *S. e. k. s. o. n. H. a. l. I. a. n. d. s. p. a. t. i. a. l. c. o. m. p. a. r. i. s. o. n. r. i. d. i. b. u. n. d. a. f. e. r. a. l. p. o. p. u. l. a. t. i. o. n. s. / H. I. F. a. l. f. u. s. h. y. E. c. o. t. o. x. i. 2010. Vol. 18. P. 78-88.*

3. *P. a. p. h. i. s. a. c. S. i. M. e. t. a. l. l. o. t. h. i. o. n. R. e. i. t. n. i. s. l. u. i. e. x. p. r. i. s. t. i. v. i. t. e. r. u. a. n. f. a. C. y. s. i. s. m. e. t. a. l. s. u. m. m. a. t. i. o. n. S. H. d. e. t. e. r. m. i. n. a. t. i. o. n. s. B. i. o. a. s. s. e. s. s. m. e. n. t. A. F. o. u. l. e. y. / C. o. m. p. V. e. b. r. i. n. e. t. h. e. 2010. Vol. 18. P. 123.*

4. *V. i. a. r. A. A. g. s. i. m. p. l. e. s. p. e. c. t. r. o. p. h. o. t. o. m. e. t. r. i. c. m. e. t. h. o. d. f. o. r. o. r. g. a. n. i. s. m. s. : a. n. a. p. p. l. i. c. a. t. i. o. n. o. f. A. M. e. t. a. l. l. o. t. h. i. o. n. e. n. f. o. n. a. D. o. n. d. e. r. o. M. a. r. F. a. b. r. u. a. r. y. 2010. P. 8649.*

5. *B. e. a. u. c. h. S. u. m. p. e. r. C. o. x. i. d. e. d. i. s. m. u. t. a. s. e. : i. m. p. r. o. v. e. d. a. s. s. a. y. g. e. l. s. a. u. c. h. a. m. p. e. I. F. r. i. d. e. v. i. t. e. 2010. Vol. 4. P. 127867. B. i. o. c. h. e. m. 13. P. 1-11.*

6. *H. a. s. s. o. u. T. h. e. i. n. d. u. c. t. i. o. n. o. f. o. x. i. d. a. t. i. v. e. s. t. r. e. s. s. d. i. s. i. n. f. e. r. e. n. t. b. y. d. i. c. h. l. o. r. o. a. c. e. t. a. t. e. / E. a. n. H. a. s. t. r. o. i. R. a. n. h. y. l. o. S. r. o. / C. o. m. p. B. i. o. c. h. e. 2010. Vol. 18. P. 23-31.*

7. *H. a. b. i. g. M. u. t. a. t. i. o. n. e. s. o. f. S. r. a. s. e. s. T. h. e. f. i. r. s. t. e. n. z. y. m. e. f. o. r. i. m. a. n. t. / W. H. H. a. l. b. i. j. g. B. M. J. 1997. P. 1370-1379.*

8. *V. i. a. r. A. M. e. t. a. l. l. o. t. h. i. o. n. e. i. n. a. s. a. t. o. o. l. A. i. v. i. o. b. i. o. m. g. B. B. u. r. l. a. n. d. o. F. B. D. o. m. a. d. e. 2010. Vol. 6. P. 455.*

9. *F. l. e. m. m. i. C. o. p. p. e. r. A. t. o. x. i. c. i. t. y. a. n. d. c. h. e. m. i. A. F. l. e. y. m. i. n. n. g. h. J. T. e. v. o. r. s. / W. a. t. e. d. 2010. Vol. 18. P. 1483-1488.*

10. *D. a. l. l. i. C. o. p. p. e. r. R. e. l. i. e. x. (p. G. a. n. s. a. t. t. r. i. o. p. o. d. a) i. s. r. e. g. u. l. a. t. e. d. d. i. f. f. e. r. e. n. t. l. y. r. e. s. p. o. n. s. i. v. e. m. e. t. a. l. p. o. o. l. s. i. n. A. l. m. o. g. o. c. y. J. P. h. y. s. i. o. l. R. e. g. u. 2010. Vol. 42. P. 819-825.*

11. *D. u. r. n. D. M. T. r. a. n. s. c. r. i. p. t. i. o. n. a. l. r. e. g. u. l. a. t. i. o. n. e. f. b. y. t. h. e. m. e. t. a. l. D. i. s. M. a. r. n. R. m. a. l. P. m. l. J. e. o. r. B. h. e. 2010. Vol. 56. P. 671-676.*

12. *C. r. a. w. f. o. R. a. d. a. p. t. i. v. e. p. a. t. h. o. g. e. n. e. s. i. s. / D. e. R. C. r. a. w. f. K. o. J. r. D. a. v. i. e. s. E. n. v. i. H. e. o. a. n. P. e. h. s. p. e. 2010. Vol. 10. P. 52-58.*

13. *L. i. u. E. f. f. e. c. t. s. o. f. c. o. p. p. e. r. a. n. d. i. t. s. e. t. h. y. l. e. n. e. d. 2010. P. 144-152.*

defenses of *Catantops* H. L. H. Wang, Z. H. Wang // *Ecoto*
Environ 2008, vol. 36, no. 3, p. 350.

24. *And Effects of exposure to multiple tra*
ultrastructural feat *Chironomus plumosus* *dePuy, and* *S. R. w*
Ansari. et al. Chem 2008, vol. 36, no. 3, p. 350.

Рецензент: доктор сільськогосподарських наук Рівіс Й. Ф.