

УДК : [504.064:577.25](564.141)

Г. І. Фальфушинська^{1,2,3}, Л. Л. Гнатишина^{1,2}, І. В. Юрчак¹,
А. Є. Мудра², А. Іваніна³, І. Соколова³, О. Б. Столяр¹

**РЕАКЦІЇ ДВОСТУЛКОВОГО МОЛЮСКА НА
ТЕПЛОВУ ДІЮ ЗАЛЕЖНО ВІД ОСОБЛИВОСТЕЙ
ІСНУВАННЯ У ПРИРОДНИХ УМОВАХ***

Проведено порівняльну оцінку толерантності до впливу термального чинника молекулярних систем стресу та детоксикації двостулкового молюска *Anodonta anatina* зі ставу-охолоджувача атомної електростанції, типових чистої та забрудненої місцевостей.

Ключові слова: двостулковий молюск, тепла дія, окисний стрес, ендокринні розлади.

Водні тварини адаптуються до умов існування у антропогенно змінених водоймах [1, 3]. Разом з тим, новітні особливості антропогенного навантаження — спонтанність, імпульсність та комплексна дія численних чинників, що реалізується на тлі аномальних кліматичних змін, вимагають нових підходів до оцінки діапазону резистентності або адекватної відповіді організму, тобто адаптивного потенціалу, а також стратегії компенсаторних процесів. Особливий інтерес у моделюванні відповіді водних тварин на вплив чинників довкілля становлять мешканці водойм-охолоджувачів енергетичних станцій, що характеризуються поєднанням стабільно підвищеної температури та техногенного забруднення. Зокрема, це двостулкові молюски, які є найкращими індикаторними організмами для раннього виявлення стану екосистеми завдяки їх осілому способу існування, фільтраційній активності, здатності до біоаккумуляції забруднювачів та чутливості до температури у довкіллі [11, 30, 34, 35, 39]. Разом з тим, відомі дослідження молюсків у таких водоймах присвячені здебільшого їх акумуляційній здатності та популяційним характеристикам [6, 24, 26, 29, 34, 35, 38]. У наших попередніх роботах було встановлено чіткі відмінності у стані молекулярних маркерів стресу та токсичності середовища уніонід із ставу-охолоджувача Хмельницької атомної електростанції [19, 20, 25]. Вони вирізнялись

* Робота виконана за підтримки Фонду цивільних досліджень США (CRDF, UKB1-7109-TE-13) та Міністерства освіти і науки України (НДР №125Б, М/4-2013 та М/78-2014).

© Г. І. Фальфушинська, Л. Л. Гнатишина, І. В. Юрчак, А. Є. Мудра,
А. Іваніна, І. Соколова, О. Б. Столяр, 2015

пригніченим станом системи антиоксидантного захисту, найвищим серед досліджуваних груп індексом міжсезонної варіабельності вмісту окисненого глутатіону, підвищеною активністю апоптозу та вітелогенезу у самців. Проте наявність цих ознак не дає достатніх підстав для оцінки меж резистентності молекулярних адаптивних систем особин цієї популяції у порівнянні із особинами з типових водойм у чистій і забрудненій місцевостях цього регіону.

Для порівняльної оцінки толерантності організму молюска до впливу пошкоджуючих чинників рекомендовано застосовувати прийом стрес-тестування («стрес на стрес»), що ґрунтується на визначенні рівня смертності у несприятливих умовах [40]. У нашій модифікації для оцінки рівня толерантності залежно від історії експозиції *in situ* створюються не екстремальні, а субтоксичні умови, у яких виявляються молекулярні ознаки адаптивних відповідей організму на певний специфічний чинник. Зокрема, було показано, що уніони з комплексно забрудненої водойми, на відміну від таких із чистої, нездатні до адекватної детоксикаційної молекулярної відповіді стосовно низки токсичних металів і пестицидів [17, 18]. Можна припустити, що типова реакція на вплив підвищеної температури також буде трансформуватись у напрямку активації або пригнічення резистентності залежно від історії експозиції *in situ* [32]. Окремі дослідження впливу температурного чинника на молюсків у лабораторних умовах дають суперечливі свідчення про чутливість їх систем антиоксидантного захисту [11, 15, 39], а порівняльні дослідження терморезистентності молюсків, що зазнають постійного впливу підвищеної температури у середовищі існування, нам невідомі.

Тому метою даної роботи є порівняльна оцінка ступеню толерантності молекулярних систем стресу та детоксикації двостулкових молюсків із водойми-охолоджувача та двох типових водойм регіону до впливу термального чинника. Критеріями оцінки слугували параметри систем антиоксидантного захисту, знешкодження ксенобіотиків, нейротоксичності та ендокринних розладів [40]. Здійснювали також інтегральну оцінку життєвого статусу молюсків та вирізняли найбільш значущі відмінності між групами на підставі статистичного аналізу суми їх характеристик.

Матеріал і методика досліджень. Дослідження проводили на дорослих самцях двостулкового молюска беззубки *Anodonta anatina* (L., 1758) (Bivalvia, Unionidae) із довжиною мушлі 8,0 см і масою 50—60 г. Молюсків відбирали на початку вересня у 2009 р., коли їх репродуктивна активність була найнижчою, з трьох місцевостей: F-групи (референційна місцевість), A-групи (забруднена місцевість у нижній течії річки, густонаселена з інтенсивною аграрною діяльністю, нижче міста з населенням близько 10 тис., у якому не працюють очисні споруди) і N-групи (південна частина водойми-охолоджувача Хмельницької атомної електростанції (ХАЕС)). Рівень та склад забруднення місць відлову підтверджено офіційною інформацією регіонального Держуправління охорони навколишнього природного середовища, наданою на підставі договору про співпрацю, і результатами попередніх досліджень [19, 25]. Середня температура у водоймах А та F становила близько 18°C, а у водоймі N була протягом року на 6—8°C вища. З молюсків з кожної місцевості було сформовано по три підгрупи: контрольна (С), яку утримували за

температури 18°C, та такі, що зазнавали впливу підвищеної температури (25 і 30°C, відповідно T1- та T2-підгрупи).

Досліди проводили згідно загальноприйнятої схеми токсикологічного експерименту. Моллюсків аклімували до лабораторних умов протягом семи діб, після чого інкубація тривала 14 діб. Експериментальні умови створювали в акваріумах об'ємом 50 дм³ з початковою кількістю 30 особин. 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. Температурний режим забезпечували нагрівальним елементом Aquael з терморегулятором. У процесі експерименту смертність моллюсків спостерігалась лише у підгрупі T2F (сумарно 52% за 14 діб). Тварин годували подрібненим комерційним кормом Акваріус «FITO MENU». Всі реактиви були фірми «Реакхім» (Україна) кваліфікації «х. ч.».

Для проведення біохімічного аналізу тварин умертвляли, визначали стать методом мікроскопічного аналізу гонад, і у самців відбирали тканини травної залози, зябер та гонад. Зразки тканини зберігали у морозильній камері при температурі -20°C. Всі процедури проводили на холоді.

Для характеристики стану молекулярних біомаркерів були використані оптичні методи, детально описані у [17—19]. Активність супероксиддисмутази (СОД) [КФ 1.15.1.1] визначали за зниженням швидкості відновлення нітротетразолію синього [7], активність каталази [КФ 1.11.1.6] — у розчинній фазі гомогенату за швидкістю розкладу пероксиду гідрогену [4]. Активність глутатіонтрансферази [КФ 2.5.1.18] (GST) встановлювали спектрофотометрично за утворенням адуктів 1-хлоро-2,4-динітробензолу з глутатіоном [27]. Вміст карбонільних похідних білків (КПБ) вимірювали за їх здатністю утворювати 2,4-динітрофенілгідрозони [2].

Для оцінки стану системи детоксикації ксенобіотиків визначали активність мікросомальної етоксирезорурфін О-деетилази (ЕРОД) за утворенням резорурфину при 572 нм у осаді мікросом, одержаному преципітацією з йонами кальцію в 80 мМ СаСl₂ в 10 мМ Tris-НСl буфері, рН 7,4 [15]. Реакцію ініціювали додаванням 0,5 мМ NADPH. Активність ЕРОД обчислювали, використовуючи молярний коефіцієнт екстинції 73,2 мМ⁻¹·см⁻¹ і відносили до вмісту мікросомального протеїну.

Маркер ендокринних розладів — вміст вітелогенін-подібних протеїнів — встановлювали у гонадах як вміст лужнолабільних фосфатів за методом [31], який ґрунтується на екстракції ліпофосфопротеїнів метил-т-бутиловим ефіром та їх лужному гідролізі для виділення лабільних фосфатів у 0,3 мл 1 М NaOH за 60 хв при 75°C. Вміст фосфату вимірювали колориметричним фосфомолібденовим методом.

Маркер нейротоксичності — активність холінестерази [КФ 3.1.1.7] визначали колориметричним методом [16] при 25°C за здатністю гідролізувати ацетилтіохолін йодид (АТХ). Як індикатор тіолових груп використовували 5,5-дитіо-біс-2-нітро-бензойну кислоту (ДТНБ). Вміст білка у тканині оцінювали за методом [33].

Результати вимірів подано у вигляді $M \pm m$ для восьми особин. Вірогідність відмінності двох рядів значень обчислювали з використанням t -тесту Стьюдента. Відмінність між рядами вважали вірогідною при $p < 0,05$. Порівняльний аналіз біологічних параметрів здійснювали методом головних компонент (факторний аналіз) з вірогідною факторіальною вагою більше 0,7 та побудови класифікаційного дерева (CART) з використанням комп'ютерних програм Statistica v 8,0 і Excel для Windows-2000.

Результати досліджень

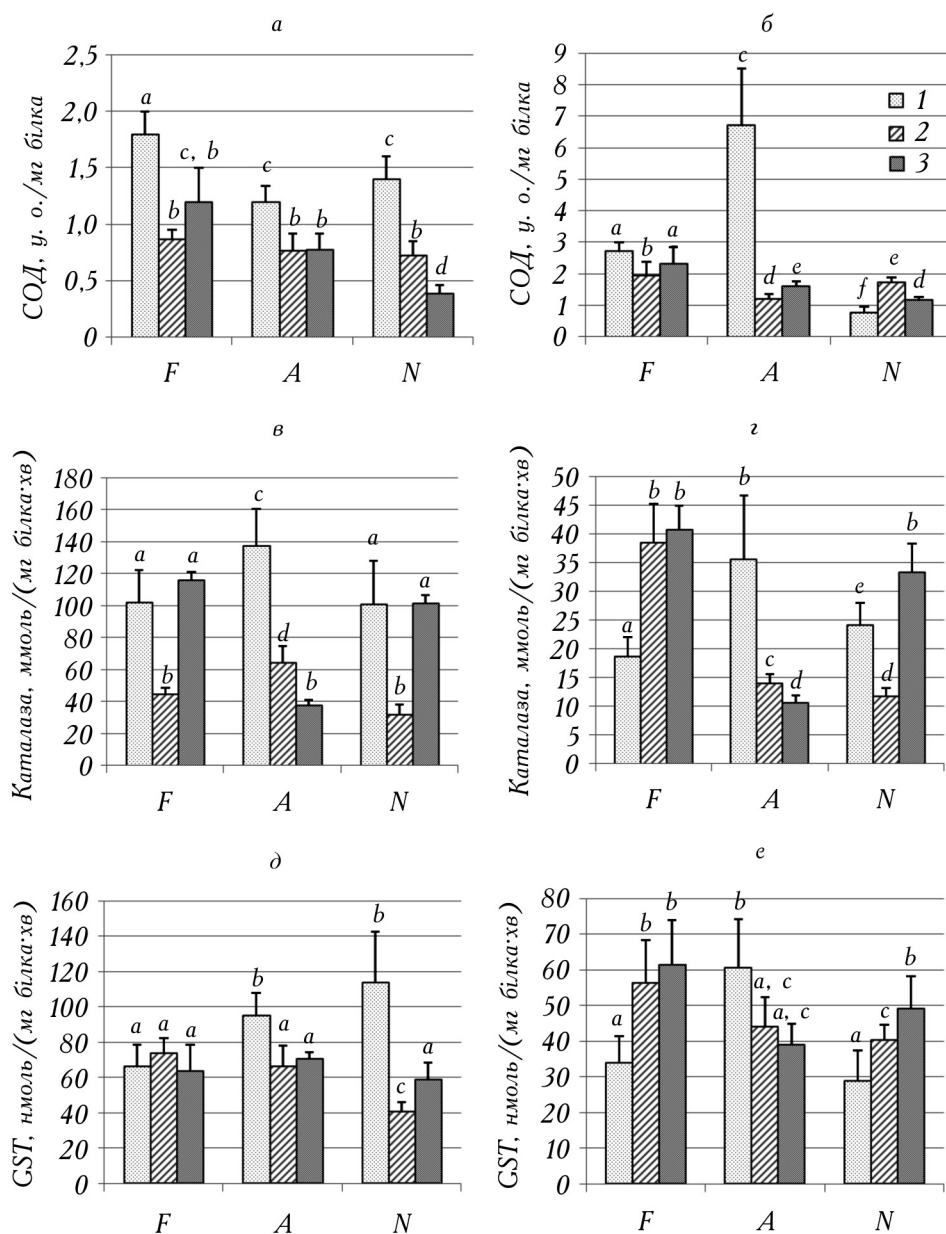
Система антиоксидантного захисту двостулкового молюска чутливо реагує на умови середовища існування [40]. Наші результати (рис. 1) свідчать про відмінність в активності ензимів антиоксидантного захисту між контрольними підгрупами молюсків. Активність СОД у тканинах молюсків А- та N-груп (за винятком активності СОД у зябрах у СА-підгрупі) нижча порівняно із CF-підгрупою, тоді як активність каталази та глутатіонтрансферази переважно вища у СА- та CN-підгрупах. За впливу теплового чинника відбуваються зміни активності ензимів, серед яких можна виділити спільні закономірності. Так, у А-групах активність ензимів у травній залозі і зябрах зменшується. У травній залозі молюсків TF- та TN-підгруп активність ензимів також зменшується або знаходиться у межах контрольних значень (каталази у T2-підгрупах і GST у TF-підгрупах). У зябрах молюсків TF- та TN-підгруп тепловий чинник викликав активацію СОД (у T1N- та T2N-підгрупах), проте у межах найменших зафіксованих значень, каталази (за винятком T1N-підгрупи) та GST (у всіх випадках). Найбільший діапазон коливань зареєстрований для СОД у зябрах (2,8 разу) і каталази у травній залозі (3,7 разу) у А-групах, а також GST у травній залозі в N-групах (2,8 разу).

Вміст карбонільних похідних протеїнів (рис. 2) відрізняється між контрольними підгрупами та за впливу температурного чинника у більшості випадків зменшується. Лише у T2A-підгрупі їх вміст зростає порівняно із відповідним контролем.

Визначення активності системи мікросомального окиснення ксенобіотиків у травній залозі показало, що найбільш суттєвою закономірністю стану ЕРОД є стрімке зростання її активності за впливу 30°C, особливо у T2N-підгрупі (у 4,3 разу) (рис. 3). Вміст вітелогенін-подібних протеїнів у гонадах молюсків серед контрольних був найменшим у CN-підгрупі, за впливу теплового чинника у T1F- і TA-підгрупах суттєво (~ у 3 рази) зменшився, а у TN-підгрупах — збільшився порівняно з контролем.

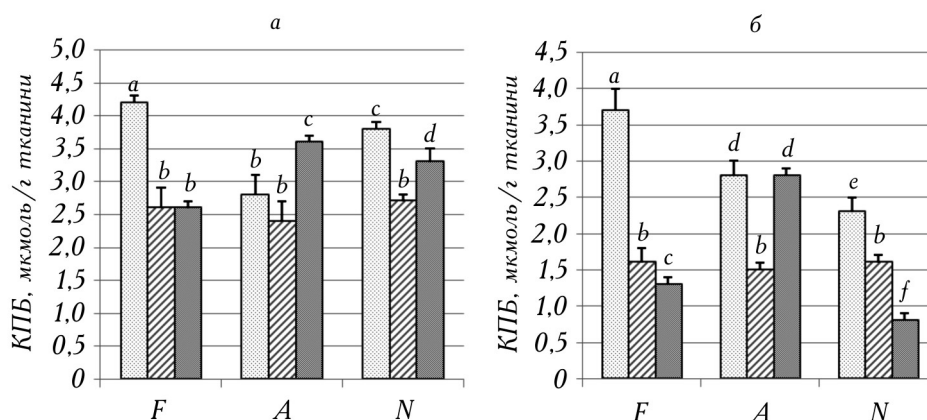
Активність холінестерази в контрольних групах відрізнялась і значно знижувалась у всіх експериментальних варіантах, у зябрах — практично до слідових значень (до 15,5 разу у T1A-підгрупі) (див. рис. 3).

Застосування методу головних компонент (факторного аналізу) показало, що до Факторів 1 і 2 вірогідно належить 56,4% отриманих результатів (рис. 4, а). За сумою ознак спостерігається чіткий розподіл відносно Фактора 2 на угруповання С- та Т-груп. Слід відзначити, що контрольні підгрупи з трьох місцевостей помітно дистанційовані, тоді як підгрупи T1F, T2F, T2N і



1. Показники стану системи антиоксидантного захисту у травній залозі (а, в, д) і зябрах (б, з, е) молюсків за впливу підвищеної температури ($M \pm m, n = 8$): а, б — активність супероксиддисмутази, в, з — активність каталази, д, е — активність глутатіон-S-трансферази. Тут і на рис. 2—4 — однаковими буквами позначено величини, які між собою вірогідно не відрізняються ($p < 0,05$); 1 — контроль; 2 — T1 (25°C); 3 — T2 (30°C).

T1A наближені, тобто за теплового впливу відмінності між підгрупами з різних місцевостей певною мірою нівелюються. Методом CART встановлено, що найбільш вагомими відмінностями, що дозволили розрізнити підгру-



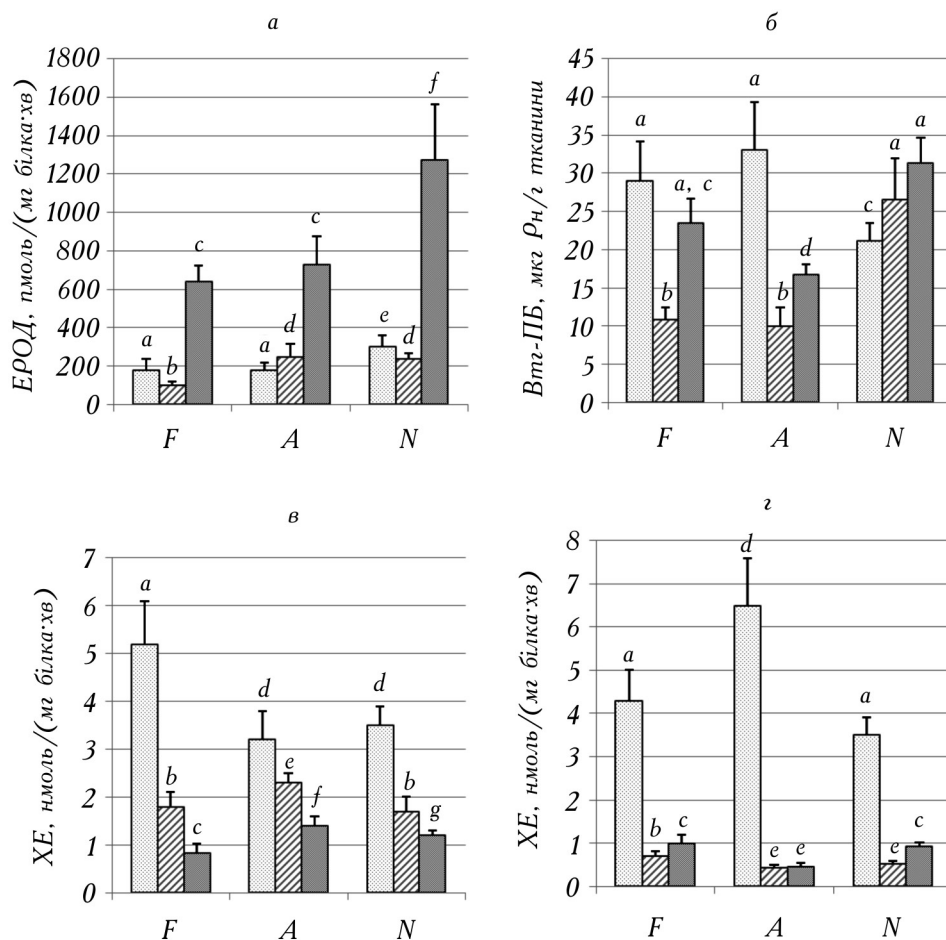
2. Характеристика окисного ураження протеїнів у травній залозі (а) та зябрах (б) молюсків за впливу підвищеної температури.

пи, є показники вмісту окисних модифікацій протеїнів, ЕРОД та активності холінестерази (див. рис. 4, б).

Обговорення результатів досліджень

Порівняння контрольних підгруп молюсків із різних водойм підтвердило отримані нами раніше результати про істотні відмінності стану їх молекулярних показників залежно від умов існування [17, 18, 20, 24]. Ці відмінності проявлялись навіть після перебування у лабораторному басейні протягом 21 доби. У СА- та CN-підгрупах спостерігається пригнічення системи антиоксидантного захисту порівняно із молюсками F-груп (низька активність СОД) та нейротоксичність (низька холінестеразна активність у травній залозі). Подібні ознаки свідчать про вплив несприятливих чинників середовища існування на прісноводних молюсків та спостерігались і іншими авторами за хімічного забруднення [8, 13]. Для CN-підгрупи характерні низька активність СОД та підвищена активність ЕРОД, які, можливо, зумовлені впливом підвищеної температури у водоймі, оскільки за впливу експериментального теплового чинника вони проявились і в інших групах. Факторний аналіз підтвердив подібність молекулярних характеристик контрольних підгруп та їх індивідуальні особливості за розміщенням у вигляді угруповань із значенням Фактора 1 «< 0» у вигляді окремих сегментів (див. рис. 4, а).

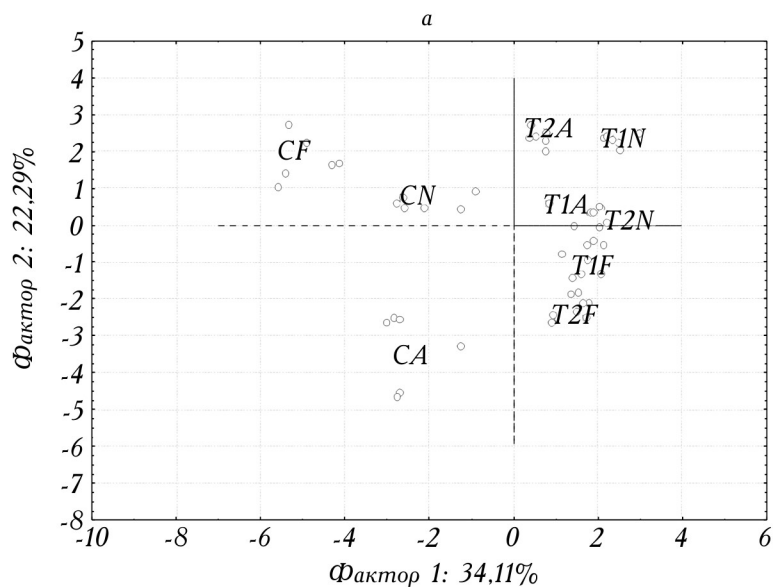
Вплив теплового чинника призвів до певного вирівнювання значень показників, що відображає спільне розміщення їх груп відносно Фактора 1 із значенням «> 0» (див. рис. 4, а). Найбільш вагомою спільною рисою пошкоджуючої дії теплового чинника у нашому експерименті є зменшення активності холінестерази. Ця ознака нейротоксичності проявляється у молюсків здебільшого за високотоксичного впливу пестицидів [8], а у реальних забруднених водоймах, за деякими даними, не відображає рівня забруднення [14]. Чутливість холінестерази до теплового чинника у водних тварин не з'ясована, проте інформація про істотні зміни її активності у мозку новонарод-



3. Маркери токсичності середовища у молюсків за впливу підвищеної температури: активність ЕРОД (а), вміст вітелогенін-подібних протеїнів (б), активність холинестерази (в, г) у травній залозі (а, в), зябрах (г) та гонадах (б).

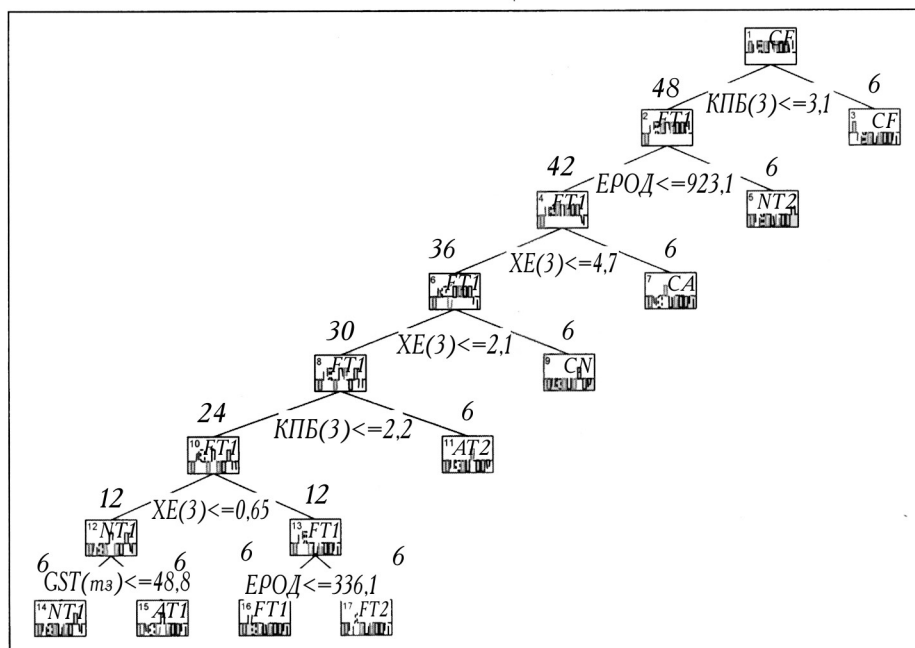
жених щурів за щоденного впливу температури $40 \pm 1^\circ\text{C}$ по 2 год свідчить про термолабільність цього маркера нейротоксичності [5].

У багатьох випадках за дії 25°C зміни були більш виражені, ніж за 30°C , що свідчить про наявність адаптивно-компенсаторних реакцій у T1-підгрупах, тоді як за вищої температури такі реакції пригнічені. Разом з тим, дія 30°C викликала загальну реакцію активації мікосомального окиснення (ЕРОД). Як відомо, активація цитохром Р450-залежного монооксигеназного окиснення служить біомаркером забруднення середовища поліциклічними ароматичними вуглеводнями та їх хлорпохідними [8]. Проте інформація про вплив температурного чинника на мікосомальне окиснення у безхребетних тварин обмежена. З огляду на участь монооксигеназ у синтезі стероїдів, видається важливим, що у самки дрозопіли *Drosophila virilis* за теплового стресу (38°C) різної тривалості активується монооксигеназа екдизону-20 —



б

Кількість галузей = 8; Кількість термінальних гілок = 9



4. Багатофакторний аналіз (a), побудова класифікаційного дерева (б) біохімічних показників молосків за впливу підвищеної температури: з — зябра; тз — травна залоза; КАТ — активність каталази; ХЕ — активність холінестерази. Позначення груп у тексті.

стероїдного гормону, що стимулює линьку та метаморфоз членистоногих [12].

Невід'ємною ознакою впливу несприятливих чинників на організм є окисний стрес [37]. Спільною для груп реакцією на тепловий вплив було пригнічення функції СОД травної залози. Разом з тим, оцінка набору характеристик системи антиоксидантного захисту дозволила виявити істотні відмінності у реакції на теплову дію двостулок із різних популяцій. Так, у F- та N-групах у травній залозі у більшості випадків проявилось збалансоване пригнічення активності антиоксидантного захисту в результаті зменшення як активності ензимів антиоксидантного захисту, так і вмісту карбонілів протеїнів, проте у зябрах була виражена активація ензимної ланки антиоксидантного захисту у поєднанні із зменшенням кількості продуктів ураження протеїнів. При цьому, у зябрах молюсків із N-групи найбільш виражена тенденція до активації ензимів антиоксидантного захисту (СОД — до 2,3 разу). Відповідь системи антиоксидантного захисту молюсків А-групи принципово відрізняється від такої у F- та N-групах. У них пригнічення активності СОД, КАТ і GST спостерігається у всіх експериментальних варіантах. Високу чутливість до теплової дії систем електронного транспорту у молюсків із забруднених місцевостей вперше було відзначено в роботі [23].

Окисні модифікації протеїнів рекомендовані як чутливий маркер окисного стресу у молюсків [28]. За впливу токсичних металів вміст цих продуктів у двостулок збільшується [17]. Тепловий стрес (34°C протягом 4 год) викликав зростання їх кількості у морського молюска *Cellana toreuma* [41]. У нашому дослідженні окисне ураження протеїнів відзначено лише у T2A-підгрупі молюсків.

Нещодавно на рівні аналізу протеому зябер було показано, що два види морських молюсків, тепловодний *Mytilus galloprovincialis* і холодноводний *Mytilus trossulus* за температурної аклімації при 7, 13 та 19°C протягом 14 діб демонструють різну чутливість до зміни температури [22]. Зокрема, у *M. trossulus* при температурі 19°C зростає кількість молекулярних шаперонів, тоді як у тепловодного *M. galloprovincialis* вона не змінюється, і навпаки, за дії низької температури рівень екскреції протеїнів більш помітно змінюється у тепловодного виду. У нашому випадку логічно припустити, що активація антиоксидантного захисту у мешканців теплої водойми демонструє певний напрямок захисних пристосувань, спрямованих на збереження функціональної активності, тоді як у неадаптованих молюсків цей механізм знаходиться на межі виснаження. Вищий рівень термотолерантності двостулок із водойми-охолоджувача (N-групи) проявився і в показниках цито- і генотоксичності [20]. У двостулкового молюска *Chamelea gallina*, який визнається як вид із низьким рівнем толерантності, експозиція протягом семи діб до температури 25 і, особливо, 30°C також призвела до зменшення активності СОД у гематоцитах та її зростання у звільненій від клітин гемолімфі [36].

Цікаво, що у молюсків N-групи виявлено і найвище значення ЕРОД у контрольній групі та здатність до найбільш ефективною активації мікросомальних монооксигеназ (більше як у чотири рази порівняно із контролем та у 1,75 разу вище від показника у T2A-підгрупі). Ця особливість може бути проявом великої пластичності експресії ензимів тканинного дихання, пов'язаних із метаболізмом ароматичних сполук, зокрема стероїдів [8] і, у свою чергу, сприяти метаболізму останніх. Як відомо, мікросомальне окиснення у ци-

тохром P450-залежній ароматазній реакції забезпечує синтез естрогену з андрогену, що може впливати на вітелогенез. Зв'язок між активністю ЕРОД та вітелогенезом на рівні експресії генів доведено у морських двостулкових молюсків [40].

Важливо, що у N-групі молюсків збільшувався вміст вітелогенін-подібних протеїнів у гонадах. Ця ознака ендокринних розладів — посилення естрогенної активності у самців — спостерігалась у цій популяції і у природних умовах існування [19]. Вітелогенін — це консервативний транспортний і резервний протеїн, який служить для доставки поживних речовин у жовток яйця. У самців його вміст мінімальний, проте різко зростає у присутності естрогенів, що служить ознакою фемінізації [9]. Наслідки ендокринних змін можуть бути особливо відчутними у двостулку, у яких мітохондріальна ДНК має статеву диференціацію, що є винятком із загального правила передачі мітохондріальної ДНК лише по материнській лінії [10].

Слід зазначити, що дослідження, проведені на окремих водоймах-охолоджувачах атомних електростанцій, у тому числі Чорнобильської АЕС, не виявили значного впливу особливостей водного режиму на тварин бентосу [21, 38]. Інвазивний молюск *Dreissena polymorpha* поблизу АЕС у Франції також виявився толерантним до підвищеної температури та забруднення сполуками міді [26]. Проте у молюсків з водойми-охолоджувача теплоелектростанції на території Литви було встановлено високий рівень хромосомних аномалій, що може бути наслідком поєданого впливу специфічного забруднення та підвищеної температури [6]. Застосований нами прийом додаткового теплового навантаження дозволив виявити відмінності у діапазоні їх толерантності, незважаючи на спільні реакції молюсків із різних водойм.

Висновки

Отримані результати свідчать, що за спільної моделі відповіді двостулку на теплову дію у них проявляються особливості, залежні від адаптації до умов існування *in situ*. Так, у молюсків із забрудненої водойми системи відповіді на стрес знаходяться на межі виснаження, серед двостулку із референтної місцевості, незважаючи на смертність, залишаються життєздатні екземпляри, які можуть, завдяки компенсаторним процесам, забезпечити існування популяції, а молюски, адаптовані *in situ* до підвищеної температури, мають певні переваги за здатністю до активації системи антиоксидантного захисту, проте їх популяції можуть зазнавати порушень репродуктивної функції. Стрес-тестування дозволило диференціювати особливості життєвого статусу організму молюска залежно від якості довкілля та прогнозувати рівень толерантності до новітніх викликів.

**

Проведена сравнительная оценка толерантности молекулярных систем стресса и детоксикации двустворчатого моллюска Anodonta anatina из пруда-охладителя атомной электростанции, типичных чистой и загрязненной территорий к воздействию температурного фактора. Показаны различия реакций на воздействие в зависимости от условий существования in situ.

**

*Comparative evaluation is given of tolerance of molecular and detoxification systems of bivalve mollusk *Anodonta anatina* from the cooling pond of nuclear power plant, typical clean and contaminated areas to the effect of thermal stress. Differences in response to the effect were shown to depend on habitat conditions in native water bodies.*

**

1. Гангзюра В.П., Грубінко В.В. Концепція шкодочинності в екології. — Тернопіль, 2008. — 144 с.
2. Луцзяк В.І., Багнюкова Т.В., Луцзяк О.В. Показники оксидативного стресу. 1. Тиобарбітурактивні продукти і карбонільні групи білків // Укр. біохім. журн. — 2004. — Т. 76, № 3. — С. 136—141.
3. Романенко В.Д., Арсан О.М., Соломатина В.Д. Механизмы адаптации водных животных к изменению ионного состава водной среды // Гидробиол. журн. — 1982. — 19, № 2. — С. 68—79.
4. Aebi H. Catalase // Methods of Enzymatic Analysis. Ed. by H. U. Bergmeyer. — London: Acad. Press, 1974. — P. 673—677.
5. Ahmed O.M., Bahgat M., Ahmed R.G. Age and heat stress related changes in monoamine contents and cholinesterase activity in some central nervous system regions of albino rat newborns // Int. J. Zool. Res. — 2007. — Vol. 3. — P. 65—76.
6. Baršienė J., Rybakovas A. Cytogenetic damage in gill and gonad cells of bivalve mollusks // Ekologija. — 2008. — Vol. 54. — P. 245—250.
7. Beauchamp C., Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assay and an assay applicable to acrylamide gels // Anal. Biochem. — 1971. — Vol. 44, N 1. — P. 276—287.
8. Binelli A., Riva C., Provini A. Biomarkers in Zebra mussel for monitoring and quality assessment of Lake Maggiore (Italy) // Biomarkers. — 2007. — Vol. 12. — P. 349—368.
9. Blaise C., Gagne F., Pellerin J., Hansen P.D. Determination of vitellogenin-like properties in *Mya arenaria* hemolymph (Saguenay Fjord, Canada): A potential biomarker for endocrine disruption // Environ. Toxicol. — 1999. — Vol. 14, N 5. — P. 455—465.
10. Breton S., Beaupré H.D., Stewart D.T. et al. Comparative mitochondrial genomics of freshwater mussels (Bivalvia: Unionoida) with doubly uniparental inheritance of mtDNA: gender-specific open reading frames and putative origins of replication // Genetics. — 2009. — Vol. 183, N 4. — P. 1575—1589.
11. Chen M., Yang H., Delaporte M., Zhao S. Immune condition of *Chlamys farreri* in response to acute temperature challenge // Aquaculture. — 2007. — Vol. 271, N 1—4. — P. 479—487.
12. Chentsova N.A., Gruntenko N.E., Rauschenbach I.Yu. Ecdysone 20-monoxygenase activity in *Drosophila virilis* strains varying in ecdysteroid response to heat stress // Russ. J. Gen. — 2007. — Vol. 43, N . — P. 829—830.
13. de Lafontaine Y., Gagne F., Blaise C. et al. Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St. Lawrence River (Canada) // Aquat. Toxicol. — 2000. — Vol. 50. — P. 51—71.

14. Domingues I., Agra A.R., Monaghan K. et al. Cholinesterase and glutathione-S-transferase activities in freshwater invertebrates as biomarkers to assess pesticide contamination // Environ. Toxicol. Chem. — 2010. — Vol. 29, N 1. — P. 5—18.
15. Doucet-Beaupré H., Dubé C., Breton S. et al. Thermal sensitivity of metabolic enzymes in subarctic and temperate freshwater mussels (Bivalvia: Unionida) // J. Thermal Biol. — 2010. — Vol. 35, N 1. — P. 11—20.
16. Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V.J. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity // Biochem. Pharmacol. — 1961. — Vol. 7, N 2. — P. 88—95.
17. Falfushynska H., Gnatyshyna L., Stoliar O. Effect of *in situ* exposure history on the molecular responses of bivalve mollusks to trace metals // Ecotoxicol. Environ. Saf. — 2013. — Vol. 89. — P. 73—83.
18. Falfushynska H., Gnatyshyna L., Stoliar O. *In situ* exposure history modulates the molecular responses to carbamate fungicide Tattoo in bivalve mollusc // Ecotoxicology. — 2013. — Vol. 22, N 3. — P. 433—445.
19. Falfushynska H.I., Gnatyshyna L.L., Farkas A. et al. Vulnerability of biomarkers in the indigenous mollusk *Anodonta cygnea* to spontaneous pollution in a transition country // Chemosphere. — 2010. — Vol. 81, N 10. — P. 1342—1351.
20. Falfushynska H., Gnatyshyna L., Yurchak I. et al. Habitat pollution and thermal regime modify molecular stress responses to elevated temperature in freshwater mussels (*Anodonta anatina*: Unionidae) // Sci. Total. Environ. Toxicol. — 2014. — Vol. 500—501. — P. 339—350.
21. Fetisov A.N., Rubanovich A.V., Slipchenko T.S., Shevchenko V.A. The structure of *Dreissena polymorpha* populations from basins adjacent to the Chernobyl atomic power station // Sci. Total Environ. — 1992. — Vol. 112. — P. 115—124.
22. Fields P.A., Zuzov M.I., Tomanek L. Proteomic responses of blue mussel (*Mytilus*) congeners to temperature acclimation // J. Exp. Biol. — 2015. — Vol. 215. — P. 1106—1116.
23. Gagné F., Blaise C., André C., Pellerin J. Implication of site quality on mitochondrial electron transport activity and its interaction with temperature in feral *Mya arenaria* clams from the Saguenay Fjord // Environ. Res. — 2007. — Vol. 103, N 2. — P. 238—246.
24. Gnatyshyna L., Falfushynska H., Bodilovska O. et al. Metallothionein and glutathione in *Lymnaea stagnalis* determine the specificity of responses to the effects of ionising radiation // Radioprotection. — 2012. — Vol. 47, N 2. — P. 231—242.
25. Gnatyshyna L.L., Turta O.O., Yurchak I.V. et al. Molecular responses of bivalve mollusks from cooling pond as a model for the prediction of contemporary environmental challenges // Studia Biologica. — 2014. — Vol. 8, N 1. — C. 11—28.
26. Guerlet E., Ledy K., Meyer A., Giambérini L. Towards a validation of a cellular biomarker suite in native and transplanted zebra mussels: a 2-year integrative

- field study of seasonal and pollution-induced variations // *Aquat. Toxicol.* — 2007. — Vol. 81, N 4. — P. 377—388.
27. *Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B.* Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation // *J. Biol. Chem.* — 1974. — Vol. 49, N 22. — P. 7130—7139.
28. *Ivanina A.V., Sokolova I.M., Sukhotin A.A.* Oxidative stress and expression of chaperones in aging mollusks // *Comp. Biochem. Physiol. B.* — 2008. — Vol. 150, N 1. — P. 53—61.
29. *Kalinichenko R.A., Sergeeva O.A., Protasov A.A., Sinitsyna O.O.* The structure and functional characteristics of pelagic and contour communities of hydrobionts in the cooling pond of the Zaporozh'ye Nuclear Power Station // *Hydrobiol. J.* — 1999. — Vol. 35, N 5. — P. 34—45.
30. *Katsikatsou M., Anestis A., Pörtner H.O. et al.* Field studies on the relation between the accumulation of heavy metals and metabolic and HSR in the bearded horse mussel *Modiolus barbatus* // *Comp. Biochem. Physiol. C.* — 2011. — Vol. 153, N 1. — P. 133—140.
31. *Klotz A.V., Stegeman J.J., Walsh C.* An alternative 7-ethoxyresorufin O-deethylase activity assay: a continuous visible spectrophotometric method for measurement of cytochrome P-450 monooxygenase activity // *Anal. Biochem.* — 1984. — Vol. 140. — P. 138—145.
32. *Lannig G., Flores J. F., Sokolova I.M.* Temperature-dependent stress response in oysters, *Crassostrea virginica*: Pollution reduces temperature tolerance in oysters // *Aquat. Toxicol.* — 2006. — Vol. 79, N 3. — P. 278—287.
33. *Lowry O.H., Rosebrough H.J., Farr A.L., Randall R.J.* Protein measurement with folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
34. *Lukashev D.V.* Age peculiarities of the accumulation of ¹³⁷Cs by freshwater Bivalvia in the cooling pond of the Chernobyl NPS and in the Pripyat river // *Hydrobiol. J.* — 2002. — Vol. 38, N 5. — P. 133—140.
35. *Lukashev D.V.* Freshwater Bivalvia as sedimentators of radioactive suspended matter in the cooling pond of the chernobyl NPS // *Ibid.* — 2003. — Vol. 39, N 6. — P. 94—101.
36. *Monari M., Matozzo V., Foschi J. et al.* Effects of high temperatures on functional responses of haemocytes in the clam *Chamelea gallina* // *Fish and Shellfish Immunol.* — 2007. — Vol. 22, N 1—2. — P. 98—114.
37. *Murphy M.P.* How mitochondria produce reactive oxygen species // *Biochem. J.* — 2009. — Vol. 417. — P. 1—13.
38. *Silayeva A.A., Protasov A.A.* Composition and structure of zoobenthos of the Styr river in the vicinity of the Rovno NPS and the assessment of its influence on benthic communities // *Hydrobiol. J.* — 2005. — Vol. 41, N 6. — P. 23—44.
39. *Verlecar X.N., Jena K.B., Chainy G.B.N.* Biochemical markers of oxidative stress in *Perna viridis* exposed to mercury and temperature // *J. Biol. Chem.* — 2007. — Vol. 167, N 3. — P. 219—226.

40. Viarengo A., Lowe D., Bolognesi C. et al. The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms // *Comp. Biochem. Physiol. C.* — 2007. — Vol. 146, N 3. — P. 281—300.
41. Zhang S., Han G.D., Dong Y.W. Temporal patterns of cardiac performance and genes encoding heat shock proteins and metabolic sensors of an intertidal limpet *Cellana toreuma* during sublethal heat stress // *J. Therm. Biol.* — 2014. — Vol. 41. — P. 31—37.

¹ Тернопільський національний педагогічний університет

² Тернопільський державний медичний університет

³ Університет Північної Кароліни, Шарлотта, США

Надійшла 23.03.15