

УДК 577.352.38:577.64

Л. Л. Гнатишина¹, Г. І. Фальфушинська¹, О. П. Голубєв²,
Р. Даллінгер³, О. Б. Столяр¹

РОЛЬ МЕТАЛОТІОНЕЇНІВ У АДАПТАЦІЇ ЛЕГЕНЕВОГО МОЛЮСКА *LYMNAEA STAGNALIS* ДО ЗАБРУДНЕННЯ СЕРЕДОВИЩА*

Визначали ефективність депонування цинку, міді та кадмію в металотіонеїнах, їх вміст, а також показники системи антиоксидантного захисту у травній залозі ставковика *Lymnaea stagnalis* з умовно чистої та двох техногенно забруднених водойм Республіки Білорусь. Встановлено підвищений вміст цинку та окисних модифікацій білка у молюсків з обох забруднених водойм. Доведено негативний зв'язок між ефективністю депонування цинку в металотіонеїнах та інтенсивністю пероксидного окиснення ліпідів.

Ключові слова легеневий молюск, *Lymnaea stagnalis*, металотіонеїни, окисний стрес, кадмій, цинк, мідь, природні водойми, біомаркери.

Легеневий молюск великий ставковик *Lymnaea stagnalis* (Linné, 1758) є одним із домінуючих видів у зообентосі прісних водойм помірної зони Євразії. Він оселяється у прибережних найбільш забруднених біотопах і здатен акумулювати наявні у воді та донних відкладах забруднюючі речовини, і тому розглядається як перспективний індикаторний вид при оцінці стану водойм [2]. Проте інформація про вплив токсичності водного середовища на ставковика, особливо на його біохімічні показники, досить обмежена і стосується здебільшого лабораторного експерименту та/або впливу паразитів [3, 5, 18, 19, 20, 21]. Одним з найбільш популярних біохімічних маркерів забруднення середовища у молюсків є метал-депонуючий і стресорний білок металотіонеїн (МТ). Високий вміст МТ в тканинах двостулкових молюсків є визнаним маркером забруднення середовища важкими металами [10, 11, 24], тоді як здатність легеневих молюсків до експресії МТ в умовах токсичного середовища не досліджена. Разом з тим у наземного виду легеневого молюска — виноградного слимака *Helix pomatia* (Linné, 1758) проявляється не лише висока ефективність акумуляції металів кадмію та міді МТ, а й її вибірковість шляхом експресії відповідних метал-специфічних ізоформ [9]. За умов комплексного природного забруднення, крім метал-депонуючої

* Робота виконувалась в рамках спільних міжнародних науково-технічних проектів МОН України та ДФФД (№ М/13-2009 та № Ф29/321-2009).

здатності МТ, доцільно оцінити і їх можливу участь у процесах антиоксидантного захисту, оскільки завдяки унікально великому вмісту тіолів (30% амінокислотного складу) МТ можуть забезпечувати і знешкодження активних форм кисню [10, 24].

Метою дослідження було оцінити селективність метал-депонуючої функції МТ та активність системи антиоксидантного захисту у ставковика із водойм з різним рівнем забруднення.

Матеріал і методика досліджень. Екземпляри легеневого молюска *L. stagnalis* масою 3,8—4,3 г та висотою мушлі 40—55 мм були відібрані на території Республіки Білорусь у червні та серпні 2009 р. в умовно чистій місцевості з оз. Нароч (Н-група) та у місцевостях з промислово-муніципальним забрудненням: з р. Свіслоч в районі м. Мінська (С-група) та (тільки у серпні) з р. Прип'яті у м. Мозирі (П-група) (рис. 1). За індексом забруднення води (ІЗВ), визначеним за шістьма пріоритетними забруднювачами, вода в курортній зоні оз. Нароч належить до відносно чистих, у р. Прип'яті (м. Мозир) — помірно забруднених, а у р. Свіслоч на виході з м. Мінська — сильно забруднених, відповідно до II, II—III та V—VI класів [6].

Молюсків відбирали на глибині до 0,5 м і доставляли в лабораторію у воді з природної водойми, де перевіряли на наявність личинок трематод у травній залозі. Незаражених молюсків досліджували не більш як через 24 год після відбору. Під час транспортування молюсків воду аерували. Для дослідження відбирали травну залозу. Всі процедури з відбору й обробки тканин проводили на холоді.

Металотіонеїни виділяли шляхом гель-розподільчої хроматографії розчину термостабільних сполук, який одержували з 10%-ного гомогенату тканини в 10 мМ трис-НСІ буфері, рН 8,0, з додаванням 10 мМ 2-меркаптоетанолу («Sigma», для запобігання окисненню SH-груп) та інгібітора протеаз фенілметилсульфонілфториду (0,1 мМ, «Sigma»), як було описано раніше [22]. Гомогенність фракції перевіряли за допомогою електрофорезу в 1,5%-ному агарозному гелі. Вміст МТ у тканині визначали за кількістю SH-груп (МТ-SH) за методом [24], який ґрунтується на взаємодії тіолів з реактивом Елмана (5,5'-дитіобіс 2-нітробензойною кислотою (ДТНБ)) після екстракції в системі етанол/хлороформ; його обчислювали виходячи із співвідношення: 1 моль МТ = 20 моль GSH і виражали в мікрограмах на 1 г сирової маси тканини.

Вміст металів у травній залозі молюска та хроматографічній фракції, що містила МТ, вимірювали після спалювання зразків у перегнаній нітратній кислоті у співвідношенні 1 : 5 (маса : об'єм). Вміст цинку і міді визначали на атомно-абсорбційному спектрофотометрі С-115, кадмію — на спектрофотометрі S-600 і виражали в нмоль на 1 г сирової маси**.

** Автори висловлюють подяку інженеру В.Б. Войтюку за допомогу у визначенні металів у біологічних зразках.



1. Схема розташування пунктів відбору молюсків на території Республіки Білорусь: Н — оз. Нароч, С — р. Свіслоч, м. Мінськ; П — р. Прип'ять, м. Мозир (www.ru.wikipedia.org).

Активність супероксиддисмутази (СОД) визначали за зниженням швидкості відновлення нітротетразолію синього в присутності феназинметасульфату і НАДН [8]. Для визначення активності Мп-СОД гомогенат витримували попередньо 60 хв при 0°C в присутності 5 мМ KCN, чим досягали повного пригнічення активності Cu,Zn-СОД, а активність Cu,Zn-СОД обчислювали як різницю загальної та Мп-залежної СОД-активності. Активність ферменту виражали в умовних одиницях (у. о.). Вміст загального глутатіону у гомогенаті тканини вимірювали ферментним методом за взаємодією із ДТНБ повністю відновленого глутатіону. Вміст окисненого глутатіону (GSSG) визначали після обробки проби вінілпіридином. За різницею вмісту загального глутатіону та GSSG обчислювали вміст відновленого глутатіону (GSH) [13].

Для характеристики процесів окисної деструкції у спільних пробах гомогенату визначали інтенсивність пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) та вміст карбонільних похідних білків (КПБ) [4]. ПОЛ оцінювали у реакції з 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК) за утворенням ТБК-активних продуктів (ТБК-АП), КПБ — за здатністю утворювати 2,4-динітрофенілгідрозони. Вміст білка у тканині визначали за методом Лоурі та ін. [17].

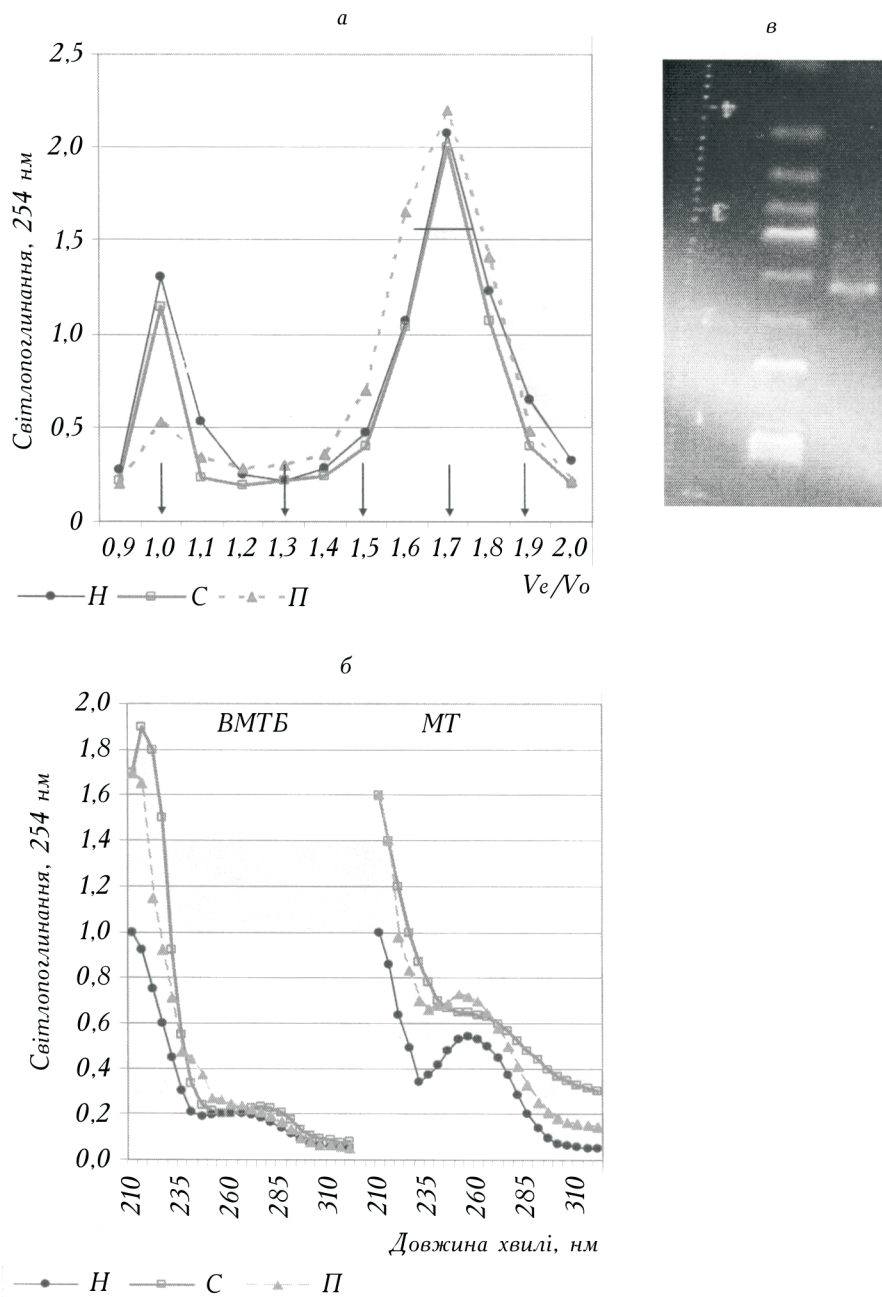
Результати вимірів у гомогенатах тканини наведені у вигляді $M \pm m$, $n = 8$, у хроматографічних фракціях — $M \pm m$ для трьох вимірів у пробі, отриманій з об'єднаних наважок від п'яти тварин дослідної групи. Вірогідність відхилення двох рядів значень обчислювали з використання t -тесту Стьюдента. Вірогідною вважали відмінність між рядами при $P < 0,05$. Порівняльний аналіз біологічних параметрів здійснювали методом головних компонент (факторний аналіз) з вірогідною факторіальною вагою більше 0,7. Використовували комп'ютерні програми Statistica v 7.0 та Exel для Windows-2000.

Результати досліджень та їх обговорення

Металотіонеїни травної залози ставковика було виділено шляхом хроматографії у складі фракції з молекулярною масою близько 8 кДа (рис. 2, а), яка проявляє типові для МТ спектральні ознаки — максимум поглинання у середньому ультрафіолеті (254 нм) та його відсутність при 280 нм [14] (рис. 2, б). Гомогенність фракції було доведено електрофоретично (рис. 2, в). Інші низькомолекулярні фракції термостабільних білків у ставковика не були виявлені, тоді як у двостулкових молюсків за дії пошкоджуючих чинників відзначено утворення ізоформи МТ з молекулярною масою 20 кДа (МТ-20) [7]. В УФ-спектрі МТ молюсків С-групи у серпні спостерігались особливості, які є ознаками часткового окиснення тіолів і високої частки міді у складі метал-тіолатних кластерів — гіперхромний ефект у ближньому ультрафіолеті та, відповідно, зміщення максимуму поглинання до 260 нм [14].

Склад металів у МТ і тканині (табл. 1) свідчить про особливості стану МТ в С-групі у серпні, пов'язані з домінуванням міді в їх складі. У всіх інших випадках частка цинку у складі МТ була найвищою. Вміст кадмію у складі МТ був максимальним у С-групі в червні, проте обчислення показують, що навіть за цих умов природного забруднення стан МТ був далеким від насичення кадмієм, визначеного в експериментальних умовах (до семи атомів на молекулу) [7, 9].

Порівняння вмісту металів у складі МТ та у тканині в цілому показує, що їх частка у складі МТ зменшується в ряді кадмій > мідь > цинк, що типово для цих білків [14]. Разом з тим, ефективність депонування металів змінюється у досить широких межах. С-група вирізняється найбільшим вмістом міді, цинку та кадмію у тканині, що, очевидно, відображає високий рівень забруднення місцевості. При цьому перевагу у зв'язуванні з МТ ставковика має мідь, тоді як цинк перебуває переважно у недепонованій формі. Вибіркова перевага у зв'язуванні міді з МТ ставковика дає підстави стверджувати про індукцію іонами міді специфічної ізоформи Cu-МТ. Останнє було виявлено в експериментальних умовах у наземного легеневого молюска виноградного слимака *Helix pomatia* [9]. Відомо, що у ставковика, так само як і у слимака, відсутній гемоглобін, а кисень-транспортна функція пов'язана із мідь-вмісним білком гемоціаніном [23]. Для слимака була доведена наявність досконалої системи підтримання гомеостазу міді за участю Cu-МТ як форми депонування [9].



2. Профілі елюції термостабільного екстракту травної залози ставковика *Lymnaea stagnalis* у серпні (а), УФ-спектри отриманих фракцій (б) та типова електрофореграма металотіонеїнів (в); а: горизонтальною лінією показано фракцію, що містить металотіонеїни, стрілками — об'єм виходу маркерних білків: $1,0 V_e/V_o$ — 25,8 кДа, $1,3 V_e/V_o$ — 17,0 кДа, $1,5 V_e/V_o$ — 12,3 кДа, $1,7 V_e/V_o$ — 8,4 кДа; $1,96 V_e/V_o$ — 3,4 кДа; V_e — об'єм елюції, V_o — зовнішній об'єм гелю; Н — Н-група; С — С-група, П — П-група.

1. Вміст металів у травній залозі та в металотіонеїнах травної залози *Lymnaea stagnalis* різних груп ($M \pm m$, $n = 8$)

Метали	Групи	Червень		Серпень	
		загальний вміст	металотіонеїни	загальний вміст	металотіонеїни
Cu	Н	$0,81 \pm 0,11$	$0,17 \pm 0,02$ (21,0%)	$1,12 \pm 0,28$	$0,20 \pm 0,02$ (17,9%)
	С	$0,92 \pm 0,10$	$0,29 \pm 0,03^a$ (31,5%)	$2,33 \pm 0,1^{a,b}$	$0,34 \pm 0,03^{ab}$ (14,6%)
	П	×	×	$0,77 \pm 1,7^b$	$0,12 \pm 0,01^a$ (15,6%)
Zn	Н	$24,84 \pm 3,22$	$6,90 \pm 0,73$ (27,8%)	$10,82 \pm 1,22^a$	$1,63 \pm 0,14^b$ (15,1%)
	С	$32,13 \pm 4,42^a$	$3,51 \pm 0,41^a$ (10,9%)	$14,12 \pm 1,55^{a,b}$	$0,28 \pm 0,03^{ab}$ (2,0%)
	П	×	×	$13,48 \pm 2,97$	$2,37 \pm 0,23^b$ (17,6%)
Cd	Н	$0,60 \pm 0,07$	$0,39 \pm 0,04$ (65,0%)	$0,32 \pm 0,10^a$	$0,17 \pm 0,02$ (53,1%)
	С	$0,91 \pm 0,11^a$	$0,78 \pm 0,08^a$ (85,7%)	$0,30 \pm 0,02^a$	$0,25 \pm 0,02^{ab}$ (83,3%)
	П	×	×	$0,22 \pm 0,05$	$0,20 \pm 0,02$ (90,9%)

П р и м і т к а. Над рискою — мкг/г сирової тканини, під рискою — частка від загального вмісту. Тут і в табл. 2: ^a — відмінність між періодами вірогідна, ^b — відмінність порівняно з групою Н вірогідна; $p < 0,05$; × — не визначали.

Визначення концентрації МТ (МТ-SH) показало істотні відмінності між групами (табл. 2). При цьому порівняння вмісту МТ-SH та метал-депонууючої здатності МТ свідчить, що С-група у серпні характеризується низькою здатністю депонувати цинк не лише по відношенню до його загального вмісту у тканині, а й стосовно потенційних можливостей утворення метал-тіолатних кластерів.

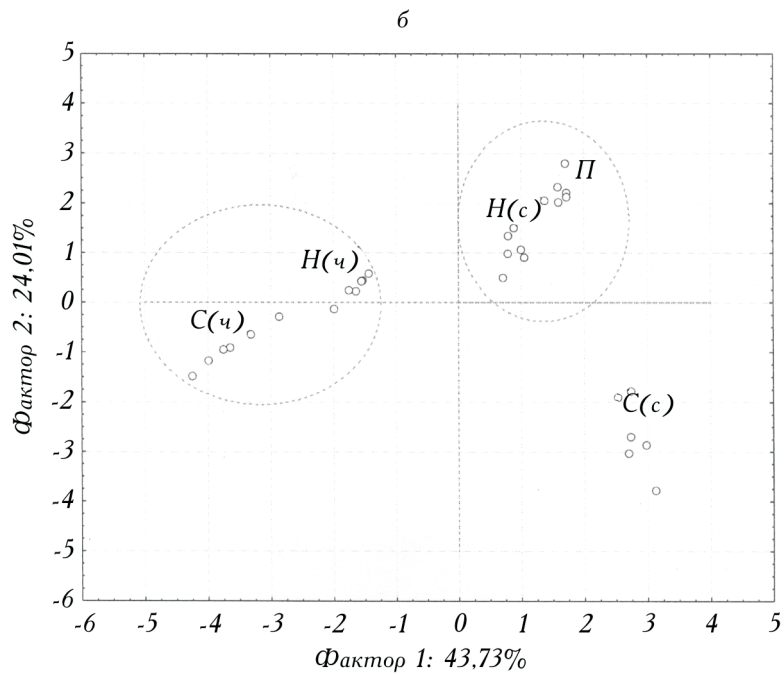
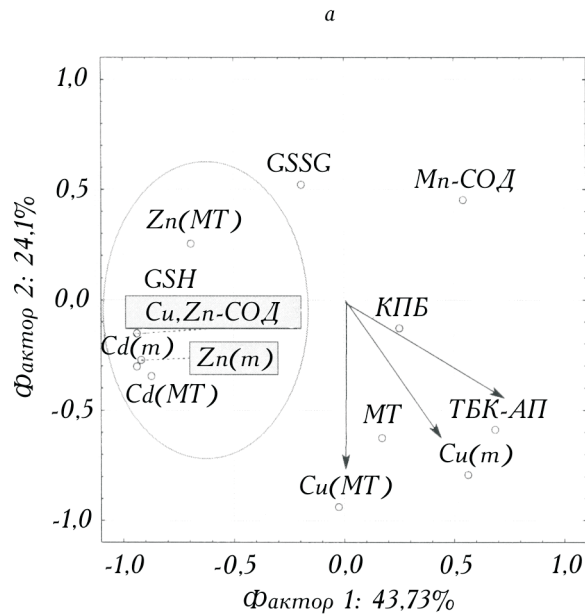
Молюски С-групи мали високий вміст GSH і GSSG у червні, причому частка останнього була аномально високою — майже 50% вмісту глутатіону. Цей стан змінювався на різке зменшення вмісту GSH у серпні, що збігалось з підвищенням вмісту МТ-SH. Таке чергування активності систем глутатіону і МТ та відсутність адитивності дії компонентів комплексного забруднення на ці клітинні мішені спостерігали і за експериментального токсичного ураження іонами цинку, кадмію та їх сумішшю у форелі [15]. Зокрема, при сумісній дії цинку і кадмію глутатіон відігравав роль тимчасової лінії захисту, тоді як активація експресії МТ спостерігалась за тривалої дії суміші ме-

2. Вміст металотіонеїнів і стан системи антиоксидантного захисту в травній залозі ставковика ($M \pm m, n = 8$)

Параметри	Групи	Червень	Серпень
Металотіонеїни, мкг/г тканини	Н	9,60 ± 3,80	12,90 ± 3,70 ^b
	С	22,80 ± 1,60 ^a	32,60 ± 7,60 ^a
	П	×	20,90 ± 4,10 ^a
Cu,Zn-СОД, у.о./мг білків	Н	0,42 ± 0,11	0,17 ± 0,04
	С	0,52 ± 0,04	0,06 ± 0,02 ^a
	П	×	0,04 ± 0,01 ^a
Mn-СОД, у.о./мг білків	Н	0,20 ± 0,02	0,11 ± 0,04
	С	0,06 ± 0,01 ^a	0,47 ± 0,06 ^a
	П	×	1,30 ± 0,13 ^a
Відновлений глутатіон, нмоль/г тканини	Н	57,20 ± 8,30	166,20 ± 12,10 ^b
	С	282,50 ± 16,30 ^a	28,60 ± 4,20 ^{a,b}
	П	×	198,90 ± 9,10 ^a
Окиснений глутатіон, нмоль/г тканини	Н	13,20 ± 4,20	13,90 ± 0,90
	С	127,30 ± 14,10 ^a	1,60 ± 0,30 ^{a,b}
	П	×	11,50 ± 3,00
ТБК-АП, нмоль/г тканини	Н	30,50 ± 0,80	57,70 ± 3,80 ^b
	С	53,80 ± 0,70 ^a	105,10 ± 10,80 ^{a,b}
	П	×	61,20 ± 6,30
Карбонільні похідні білків, мкмоль/мг білків	Н	17,60 ± 0,10	8,40 ± 1,10 ^b
	С	15,00 ± 1,60 ^a	20,10 ± 4,10 ^a
	П	×	21,60 ± 2,60 ^a
Розчинний білок, мг/г тканини	Н	51,40 ± 2,20	157,40 ± 13,60
	С	71,20 ± 2,20 ^a	145,30 ± 10,30
	П	×	114,40 ± 12,10

талів. Зміни активності форм СОД у ставковика С-групи також були неузгоджені, рівень ПОЛ — стабільно високим, що у серпні поєднувалось з високим вмістом КПБ. Отже, сукупність результатів показує, що у ставковика С-групи спостерігається неузгоджена та у кінцевому рахунку малоефективна відповідь окремих чинників антиоксидантного захисту на умови існування, про що свідчить високий рівень окисної деструкції.

Особливістю П-групи була висока активність Mn-СОД, яка більш як у десять разів перевищувала контрольні значення, а також високі вміст і частка GSH, низький вміст ТБК-АП. Тому, незважаючи на певні ознаки оксидатив-



3. Факторний аналіз (метод головних компонент) біохімічних показників травної залози ставковика (а) та впливу місцевості існування на ставковика за сукупністю біохімічних показників (б); (ч), (с) — групи тварин відповідно у червні та серпні.

ного ураження, пов'язані з КПБ та Cu,Zn-COD-активністю, можна вважати, що у цих молюсків відбувається активація системи антиоксидантного захисту.

Вважають, що МТ певною мірою захищають клітини метаболічно активних тканин від токсичної дії іонів важких металів, в першу чергу кадмію, міді та цинку, зв'язуючи їх у метал-тіолатні кластери [7]. Логічно припустити, що у ставковика С-групи, особливо у серпні, прооксидантні прояви пов'язані з токсичністю недепонованих іонів цинку. Результати дослідження впливу сублетальної концентрації іонів цинку на морських молюсків *Ruditapes decussatus* свідчать про його прооксидантну дію [12]. Для того, щоб з'ясувати наявність взаємозв'язку між характеристиками МТ та системи антиоксидантного захисту ми піддали одержані результати факторному аналізу. Показники молюска з досить високою вірогідністю (67,74%) належать до двох головних компонент (рис. 3, а). При цьому мідь- та цинк-залежні параметри (вміст металу у тканині та в МТ) не пов'язані між собою. Характеристики цинку мають зв'язок із станом системи антиоксидантного захисту. Вони позитивно корелюють із вмістом GSH, активністю Cu,Zn-SOD і негативно — з рівнем ПОЛ, що указує на прооксидантну дію цинку у недепонованій формі. Вміст МТ-SH не увійшов до набору вірогідно включених у характеристику молюска.

Інтегральна характеристика кожного індивідуального молюска за сукупністю досліджуваних показників (рис. 3, б) дозволила відокремити групи за часовим фактором (Н- і С-групи у червні та Н- і П-групи у серпні). Разом з тим, всі представники кожної групи утворювали окремий сегмент, що свідчить про суттєвий внесок місцевих особливостей у характеристику групи. Унікальність моделі відповіді С-групи у серпні підтверджується її дистанціюванням від інших груп. Отже, інтегральний аналіз сукупності біохімічних показників дозволив чітко встановити відмінності у стратегії адаптації між групами, що було складно реалізувати на рівні індивідуальних показників. Подібність параметрів Н- та П-груп та відокремлення С-групи у серпні свідчать, що відповідь на забруднення середовища у П-групі відбувалась в цілому у межах адаптивної здатності, а С-група зазнає токсичної дії [1]. Такий контраст між станом молюсків із двох місцевостей був неочікуваним, зважаючи на те, що в обох випадках їх відбирали нижче за течією від головних промислових підприємств на території великих міст. Разом з тим, для легеневих молюсків описані випадки, коли тривалий субтоксичний вплив несприятливих чинників (дії суміші важких металів або іонізуючої радіації) у природних популяціях викликав ефект гормезису, тобто покращення життєвого статусу тварин [16]. Очевидно, саме такий приклад демонструють молюски П-групи.

Висновки

Проведене дослідження показало, що метал-депонуюча функція МТ ставковика є важливою складовою формування адаптивної відповіді організму на умови природного середовища, що може бути використано для оцінки ступеня шкодочинності [1] умов існування.

**

*Определяли эффективность депонирования цинка, меди и кадмия в металлотионеинах (МТ), содержание МТ (МТ-SH), а также показатели системы антиоксидантной защиты в пищеварительной железе прудовика *Lymnaea stagnalis* из условно*

чистого и двух техногенно загрязненных водоемов Республики Беларусь. Установлено повышенное содержание цинка и окислительных модификаций белков у прудовика из обоих загрязненных водоемов. Доказана отрицательная связь между эффективностью депонирования цинка в МТ и уровнем перекисного окисления липидов.

**

*The efficiency of heavy metals (zinc, copper and cadmium) binding by metallothioneins (MT), the content of MT (MT-SH) and characteristics of antioxidant protective system were determined in the digestive gland of the pond snail *Lymnaea stagnalis* from the water bodies of Belarus — relatively clean and two industrially polluted. Elevated content of zinc and protein carbonyls were shown to occur in snails from both polluted water bodies. The negative relation between the zinc-binding ability of MT and the level of lipid peroxidation was proved.*

**

1. Гангзюра В.П., Грубінко В.В. Концепція шкодочинності в екології. — Київ; Тернопіль: Вид-во ТНПУ ім. В. Гнатюка, 2008. — 144 с.
2. Голубев А.П. Общая термоустойчивость и радиостойчивость популяций *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda, Pulmonata) из водоемов с разными формами антропогенной нагрузки // Докл. Акад. наук. — 1995. — Т. 342, № 2. — С. 280—283.
3. Киричук Г.Е. Особенности накопления ионов тяжелых металлов в организме двустворчатых моллюсков // Гидробиол. журн. — 2003. — Т. 39, № 3. — С. 45—55.
4. 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.
5. Пинкина Т.В. Влияние тяжелых металлов на биологические характеристики прудовика озерного (*Lymnaea stagnalis* L.) из водоемов с различным уровнем радионуклидного загрязнения // Гидробиол. журн. — 2010. — Т. 46, № 1. — С. 107—117.
6. Состояние природной среды Беларуси: Экол. бюл. 2008 г. / Под ред. В.Ф. Логинова. — Минск, 2009. — 406 с.
7. Amiard J.C., Amiard-Triquet C., Barka S. et al. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers // Aquat. Toxicol. — 2006. — Vol. 76, N 2. — P. 160—202.
8. Beauchamp C., Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assay and an assay applicable to acrylamide gels // Anal. Biochem. — 1971. — Vol. 44. — P. 276—287.
9. Dallinger R., Chabicovsky M., Hödl E. et al. Copper in *Helix pomatia* (Gastropoda) is regulated by one single cell type: differently responsive metal pools in rhogocytes // Amer. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. — 2005. — Vol. 289. — P. 1185—1195.
10. Falfushynska H.I., Delahaut L., Stolyar O. B. et al. Multi-biomarkers approach in different organs of *Anodonta cygnea* from the Dnister basin (Ukraine) // Arch. Environ. Contam. Toxicol. — 2009. — Vol. 57, N 1. — P. 86—95.
11. 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 // Chemosphera. — 2010. — Vol. 81. — P. 1342—1351.

12. Geret F., Bebianno M.J. Does zinc produce reactive oxygen species in *Ruditapes decussatus*? // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* — 2004. — Vol. 57. — P. 399—409.
13. Griffith O.W. Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide Using Glutathione Reductase and 2-Vinylpyridine // *Anal. Biochem.* — 1980. — Vol. 106, N 1. — P. 207—212.
14. Kagi J.H.R., Schaffer A. Biochemistry of metallothionein // *Biochemistry.* — 1988. — Vol. 27, N 23. — P. 8509—8515.
15. Lange A., Ausseil O., Segner H. Alterations of tissue glutathione levels and metallothionein mRNA in rainbow trout during single and combined exposure to cadmium and zinc // *Comp. Biochem. Physiol.* — 2002. — Vol. 131 C. — P. 231—243.
16. Lefcort H., Freedman Z., House Sh., Pendleton M. Hormetic effects of heavy metals in aquatic snails: is a little bit of pollution good? // *EcoHealth.* — 2008. — Vol. 5, N 1. — P. 10—17.
17. 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.
18. Masola B., Chibi M., Kandare E. et al. Potential marker enzymes and metal—metal interactions in *Helisoma duryi* and *Lymnaea natalensis* exposed to cadmium // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* — 2008. — Vol. 70, N 1. — P. 79—87.
19. Molnár G., Gyori J., Salánki J., Rózsa K.S. Cadmium ions modulate GABA induced currents in molluscan neurons // *Acta Biol. Hung.* — 2002. — Vol. 53, N 1—2. — P. 105—123.
20. Morley N.J., Crane M., Lewis J.W. Cadmium toxicity and snail-digenean interactions in a population of *Lymnaea spp.* // *J. Helminthol.* — 2003. — Vol. 77. — P. 49—55.
21. Russo J., Lagadic L. Effects of parasitism and pesticide exposure on characteristics and functions of hemocyte populations in the freshwater snail *Lymnaea palustris* (Gastropoda, Pulmonata) // *Cell. Biol. Toxicol.* — 2000. — Vol. 16, N 1. — P. 15—30.
22. Stolyar O.B., Myhayliv R.L., Mischuk O.V. The concentration-specific response of metallothioneins in copper-loading freshwater bivalve *Anodonta cygnea* // *Укр. біохім. журн.* — 2005. — Vol. 77, N 6. — С. 65—69.
23. van Kuik J.A., Sijbesma R.P., Kamerling J.P. et al. Primary structure determination of seven novel N-linked carbohydrate chains derived from hemocyanin of *Lymnaea stagnalis*. 3-O-methyl-D-galactose and N-acetyl-D-galactosamine as constituents of xylose-containing N-linked oligosaccharides in an animal glycoprotein // *Europ. J. Biochem.* — 1987. — Vol. 169, N 2. — P. 399—411.
24. Viarengo A., Ponzano E., Dondero F., Fabbri R. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs // *Mar. Environ. Res.* — 1997. — Vol. 44, N 1. — P. 69—84.

¹ Тернопільський національний педагогічний університет

² Міжнародний державний екологічний університет, Мінськ

³ Університет Інсбруку

Надійшла 19.01.11