

## ОЦІНКА БІОЛОГІЧНОЇ ДІЇ КОБАЛЬТВМІСНОГО НАНОКОМПОЗИТУ ІЗ ВИКОРИСТАННЯМ БІОХІМІЧНИХ МАРКЕРІВ ДВОСТУЛКОВОГО МОЛЮСКА *Anodonta cygnea*

Г. І. ФАЛЬФУШИНСЬКА<sup>1</sup>, Л. Л. ГНАТИШИНА<sup>1</sup>, О. Б. СТОЛЯР<sup>1</sup>, Н. Є. МІТІНА<sup>2</sup>,  
О. С. ЗАІЧЕНКО<sup>2</sup>, Є. З. ФІЛЯК<sup>3</sup>, Р. С. СТОЙКА<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка, Україна;  
e-mail: halynka.f@gmail.com, oksana.stolyar@gmail.com;

<sup>2</sup>Національний університет «Львівська Політехніка», Україна;

<sup>3</sup>Інститут біології клітини НАН України, Львів;  
e-mail: stoika@cellbiol.lviv.ua

Активне впровадження наноматеріалів вимагає розвитку методів, що дозволяють визначити їхню потенційну екотоксичність. Метою дослідження було виявлення специфічних ознак впливу кобальтвмісного наноконструкту (Со-НК) на молекулярні стрес-реактивні системи у травній залозі двостулкового молюска *Anodonta cygnea*. Со-НК одержували при змішуванні спиртових розчинів кополімеру *N*-вінілпіролідону, 5-(трет-бутилперокси)-5-метил-1-гексен-3-іну, диметиламіноетилметакрилату та хлориду кобальту. Після інкубації молюсків протягом 14 діб у присутності Со-НК, СоCl<sub>2</sub> або полімерного носія встановлено, що Со-НК, на відміну від інших чинників, не спричинює оксидативного стресу, який визначається за супероксиддисмутазною активністю, вмістом металотіонеїнів (МТ), редокс-індексом глутатіону та рівнем утворення оксидних радикалів. Показано, що специфічними ознаками впливу Со-НК є збільшення вмісту МТ, СоCl<sub>2</sub> – збільшення лактатдегідрогеназної активності і рівня оксидних радикалів, тоді як полімерний носій підвищує глутатіонтрансферазну активність.

**Ключові слова:** наноконструкт, кобальт, біомаркер, молюск, оксидативний стрес, металотіонеїни.

У сучасному суспільстві спостерігається інтенсивне впровадження нанотехнологій і наноматеріалів у медицині, біотехнології, виробництві напівпровідників, а також товарів широкого вжитку [1]. Згідно з дослідженнями в межах проекту «Project on Emerging Nanotechnologies» (<http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/>, 2008) кількість споживчих товарів на ринку, що містять наночастинки або нановолокна, станом на 2008 р., перевищує 800 і швидко зростає. Паралельно зі збільшенням обсягів виробництва наноматеріалів та галузей їх використання вони все більше потрапляють в навколишнє середовище і становлять потенційну небезпеку для біоти через високу реакційну здатність і біодоступність [2, 3]. Це зумовлює необхідність розробки нових методологічних підходів оцінки їхнього екологічного ризику для тварин та ефективної екстраполяції результатів для визначення рівня небезпеки для людини. Значна кількість досліджень *in vivo* та *in vitro* у нанотоксикології сфокусована на оцінці гострої токсичності синтезованих субстанцій за даними летальності, імунологічних параметрів або цитотоксичності

[1, 4, 5]. Разом з тим, такі дослідження не дають вичерпної інформації щодо механізмів субтоксичних ефектів наноматеріалів у фізіологічних концентраціях, а також потенційних наслідків їхнього хронічного впливу на біоту [6].

До найпоширеніших компонентів металовмісних наноматеріалів відносять кобальт (Со) [7]. Відомо, що іони Со можуть порушувати стабільність молекул ДНК та інгібувати їхню репарацію, стимулювати процеси канцерогенезу і мутагенезу у людини та тварин [8], тоді як у фізіологічних концентраціях вони необхідні для забезпечення нормального функціонування організму [9].

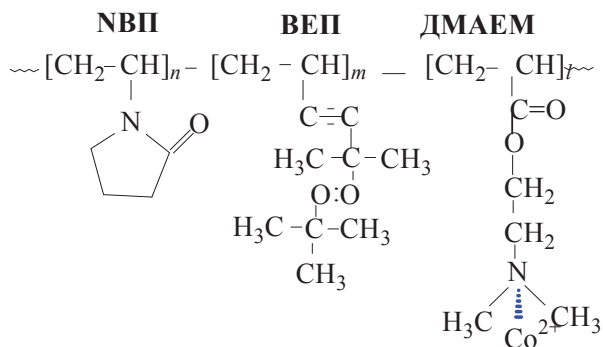
Тому метою нашої роботи було встановити потенційний ризик кобальтвмісного наноконструкту (Со-НК) на підставі визначення набору біомаркерів стресу і токсичності у прісноводного двостулкового молюска *Anodonta cygnea*. Вибір цього тест-об'єкту зумовлений здатністю молюсків акумулювати велику кількість забруднюючих речовин і високою чутливістю їхніх молекулярних антистресорних систем до якості водного оточення [10, 11].

## Матеріали та методи

Дослідження проводили на дорослих особинах двостулкового молюска беззубки лебединої *Anodonta cygnea* із довжиною мушлі 8,0 см і масою 50–60 г із ділянки верхів'я ріки Серет (село Івачів Тернопільської області). Молюсків адаптували до лабораторних умов протягом семи діб. Експериментальні умови створювали у басейнах об'ємом 40 л з кількістю молюсків – одна особина на 4 л води. Тварин годували комерційним кормом. Вміст кисню у воді підтримували на рівні 7,0–8,0 мг/л, вуглекислого газу – 2,2–2,8 мг/л, значення рН були 7,6–8,0. В експериментальних групах воду відстоювали і змінювали через кожні дві доби, поновлюючи в ній вміст досліджуваних сполук. Температура води становила близько 18 °С.

Із відібраних тварин сформували чотири групи: одна контрольна (К) та три дослідні. Тваринам дослідних груп у воду додавали Со-НК (833 мкг/л), іони Со (Со, 50 мкг/л, у вигляді  $\text{CoCl}_2$ ) або полімерного носія (П, 783 мкг/л). Вміст металу контролювали за допомогою атомно-абсорбційної спектроскопії (С-115, Ломо, Росія). Концентрація  $\text{Co}^{2+}$  була близькою до такої як у забруднених водоймах та у крові пацієнтів із ортопедичними Со-імплантами, які не відповідають технічним умовам [7]. Інкубація молюсків у досліджуваних розчинах тривала 14 діб, що є оптимальним строком для акліматизації.

Полімерний носій одержували методом радикальної кополімеризації: N-вінілпіролідону (NBП), 5-(трет-бутилперокси)-5-метил-1-гексен-3-іну (ВЕР) і диметиламіноетилметакрилату (DMAEM) у розчині диметилформаміду за ініціювання азоізобутиронітрилом [12]. Схему фрагмента структури полімерного носія наведено нижче:



де  $n = 22\%$  (29,7%mol),  $m = 40\%$  (32,9%mol),  $t = 38\%$  (37,4%mol),  $M_n = 1500$  г/моль  $[\text{Co}^{2+}] = 6\%$  від маси полімерного носія.

Со-НК одержували за змішування спиртових розчинів полімеру та хлориду кобальту. Мольне співвідношення DMAEM/ $\text{Co}^{2+}$  становило 2,4 : 1.

Тварин умертвляли, вимірювали довжину мушлі (мм) і зважували (мг). Травну залозу відокремлювали, висушували фільтрувальним папером і зважували. Відбір і обробку тканин проводили на холоді. Усі реактиви (Реахім, Україна), крім нижчезазначених, мали кваліфікацію хч.

Для характеристики стану металодепонуючих протеїнів металотіонеїнів (MT), систем антиоксидантного захисту, біотрансформації ксенобіотиків та нейротоксичності були використані оптичні методи, детально описані у [10, 11]. Активність супероксиддисмутази (СОД, 1.15.1.1) визначали за зниженням швидкості відновлення нітротетразолію синього [13], вміст загального (GSH) і окисленого (GSSG) глутатіону у непротеїновому фільтраті тканини визначали ензимним методом за допомогою реактиву Еллмана (ДТНБ) [14]. Редокс-індекс (PI) GSH обраховували як співвідношення  $([\text{GSH}] - [\text{GSSG}]) / [\text{GSH}]$ . Вміст MT визначали за кількістю протеїнових SH-груп, що реагують із ДТНБ, вважаючи, що в 1 молі MT міститься така сама кількість SH-груп, як і в 20 молях GSH [15]. Вміст карбонільних похідних протеїнів (КПП) вимірювали за їхньою здатністю утворювати 2,4-динітрофенілгідрозони [16], утворення оксирадикалів (ОР) – за інтенсивністю флуоресцентного барвника родаміну 123 в надосадовій рідині гомогенату тканини [15]. Активність лактатдегідрогенази (ЛДГ) [1.1.1.27] визначали за швидкістю окислення NADH при 340 нм у фосфатно-піруватному розчині [17], активність глутатіонтрансферази (GST) [2.5.1.18] – за утворенням аддуктів 1-хлоро-2,4-динітробензолу із GSH [18], активність холінестерази (ХЕ) – за швидкістю гідролізу ацетилтіохолін йодиду, яку реестрували за допомогою ДТНБ [19].

На підставі співвідношення стану антиоксидантних чинників (СОД, GSH, PI GSH, MT) та прооксидантних проявів (КПП і ОР), після уніфікації показників, обчислювали інтегральний індекс оксидативного стресу (ІОС) [20].

Результати вимірів подано у вигляді  $M \pm SD$  для восьми тварин дослідної групи. Вірогідність відхилення двох рядів значень обчислювали із використанням *t*-тесту Стьюдента. Для порівняння впливу чинників на біохімічні показники молюска використо-

ували багатofакторний аналіз (метод головних компонент) та кореляційний аналіз. Порівняльний аналіз біологічних параметрів здійснювали за допомогою програм Statistica v 7.0 та Excel для Windows-2000.

### Результати та обговорення

Одержані нами результати свідчать про чутливість і специфічність відповіді клітинних тіолів до дії Со-НК і його складових (Со, П). Зокрема, як видно на рис. 1, Со<sup>2+</sup> зменшує вміст МТ порівняно з контролем, Со-НК – збільшує його, а П не впливає на вміст МТ. Рівень GSH у дослідних групах не зазнає змін порівняно з контролем, тоді як PI GSH зменшується у всіх трьох дослідних групах, незалежно від природи діючого чинника.

Активність СОД знижується за дії всіх досліджуваних чинників (рис. 2). Однак нами не було виявлено ознак оксидативного ураження за показниками КПП та утворення ОР, за виключенням дії Со<sup>2+</sup>, який ініціював зростання рівня ОР.

Визначення токсичності та трансформації ксенобіотиків у травній залозі молюсків в усіх досліджуваних групах (особливо в тій, де були іони Со<sup>2+</sup>), показало, що посилюються процеси анаеробіозу, глутатіонзалежної трансформації ксенобіотиків і зростає активність ХЕ (рис. 3).

Методом головних компонент були визначені специфічні маркери, які характеризують кожну із досліджуваних груп тварин (рис. 4, А). Найбільш відокремлено від інших локалізуються групи К та Со-НК, які мають вищі значення СОД активності та PI GSH (група К) і високий вміст МТ (група Со-НК). Дві інші групи, що характеризуються високою активністю GST (група П) або активацією анаеробіозу і генерації активних форм кисню (група Со), знаходяться в одному сегменті протилежно до груп К та Со-НК. Тому вони можуть бути розцінені як такі, що зазнали токсичного впливу за умов експерименту. Обрахунки ІОС підтверджують цей висновок, оскільки саме в цих групах переважають прооксидантні прояви (рис. 4, Б), тоді як ІОС за дії Со-НК характеризує збалансований стан системи антиоксидантного захисту, наближений до такого як у контролі.

Порівняння впливу Со-НК і його складових свідчить, що універсальними проявами реакції молюска на дію досліджуваних чинників, незалежно від їхньої природи, були прооксидантні зміни стану GSH, посилення анаеробіозу та активація ХЕ і GST, що характеризує неспецифічну токсичність усіх

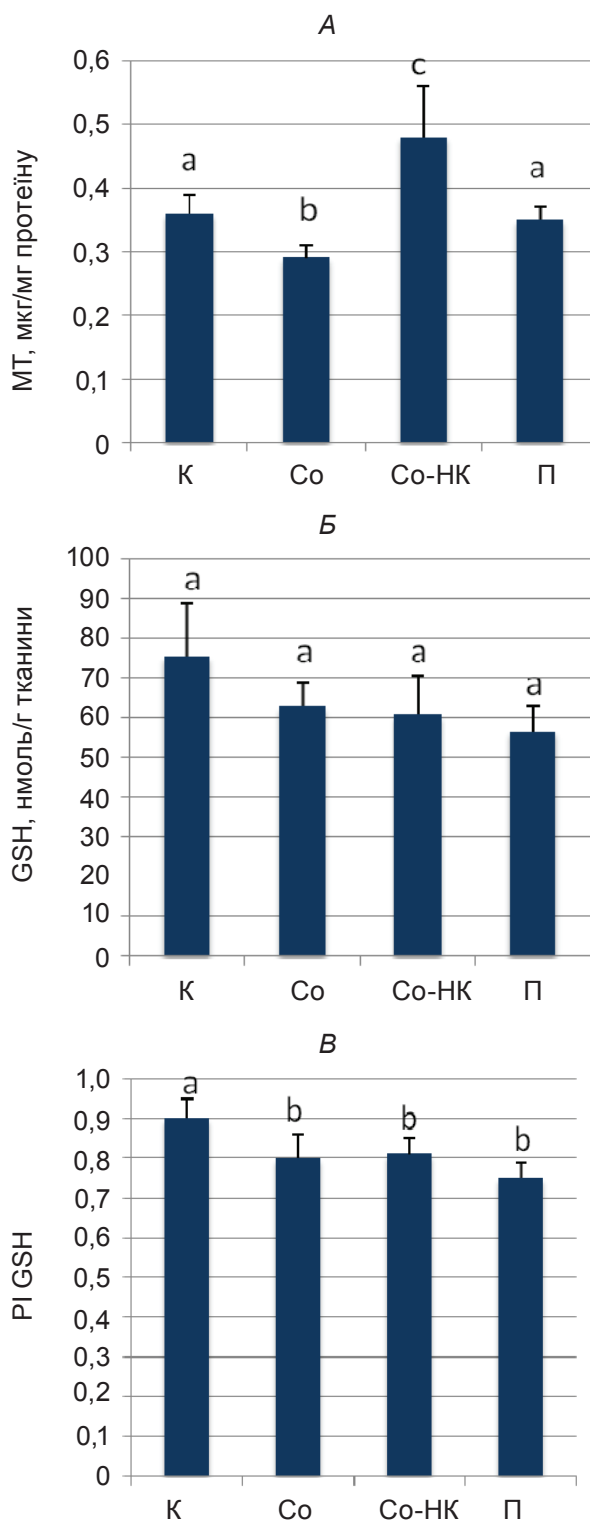


Рис. 1. Вміст металотіонейнів за тіоловими групами (А) і показники системи глутатіону (Б – загальний вміст глутатіону та В – редокс-індекс глутатіону) травної залози молюска у контролі та за експозиції з досліджуваними у роботі чинниками: Со – з додаванням кобальту; Со-НК – кобальтвмісного наноконструкту; П – полімерного носія

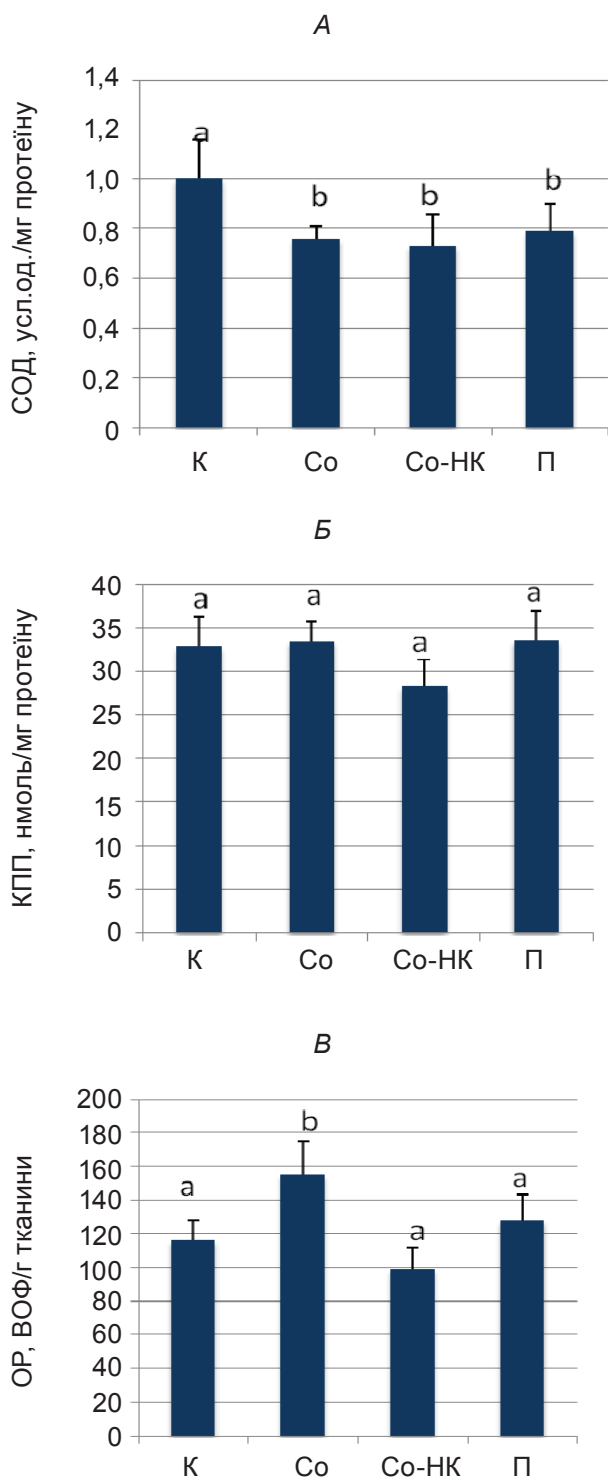


Рис. 2. Показники системи антиоксидантного захисту травної залози молюска. А – супероксид-дисмутазна активність (СОД), Б – карбонільні похідні протеїнів (КПП), В – утворення оксирадикалів (ОР)

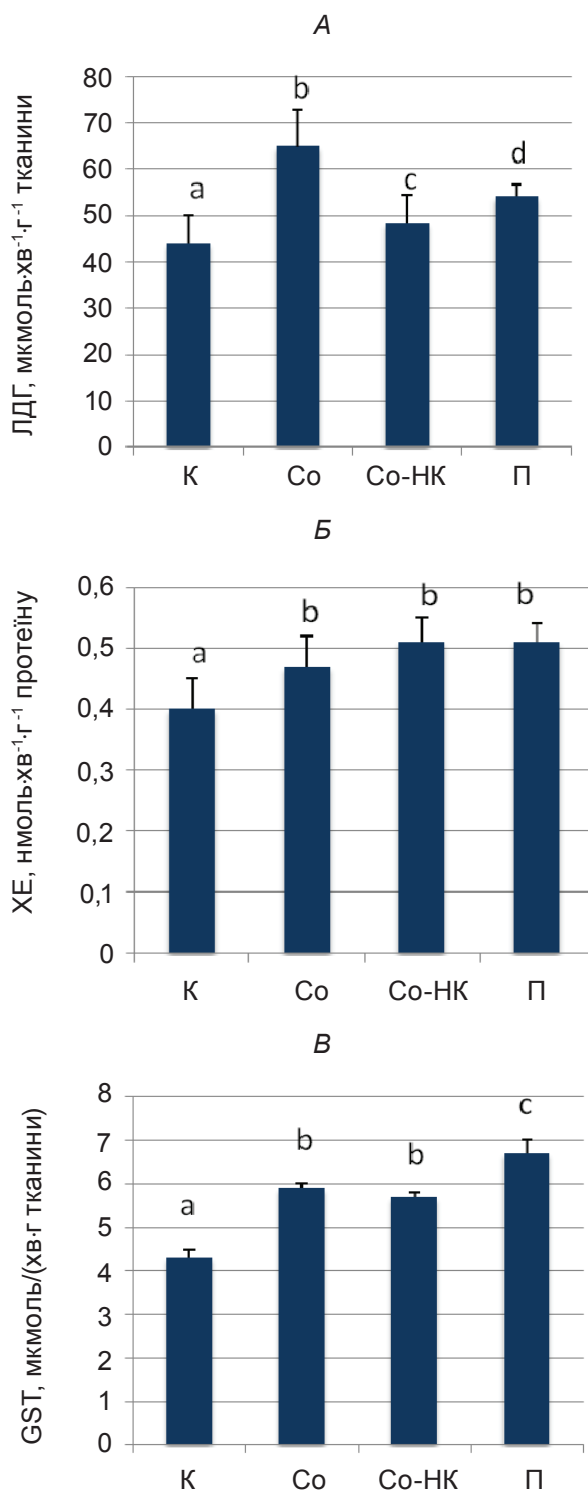


Рис. 3. Показники токсичності та трансформації ксенобіотиків у травній залозі молюска. А – лактатдегідрогеназна активність, Б – холінестеразна активність, В – глутатіонтрансферазна активність

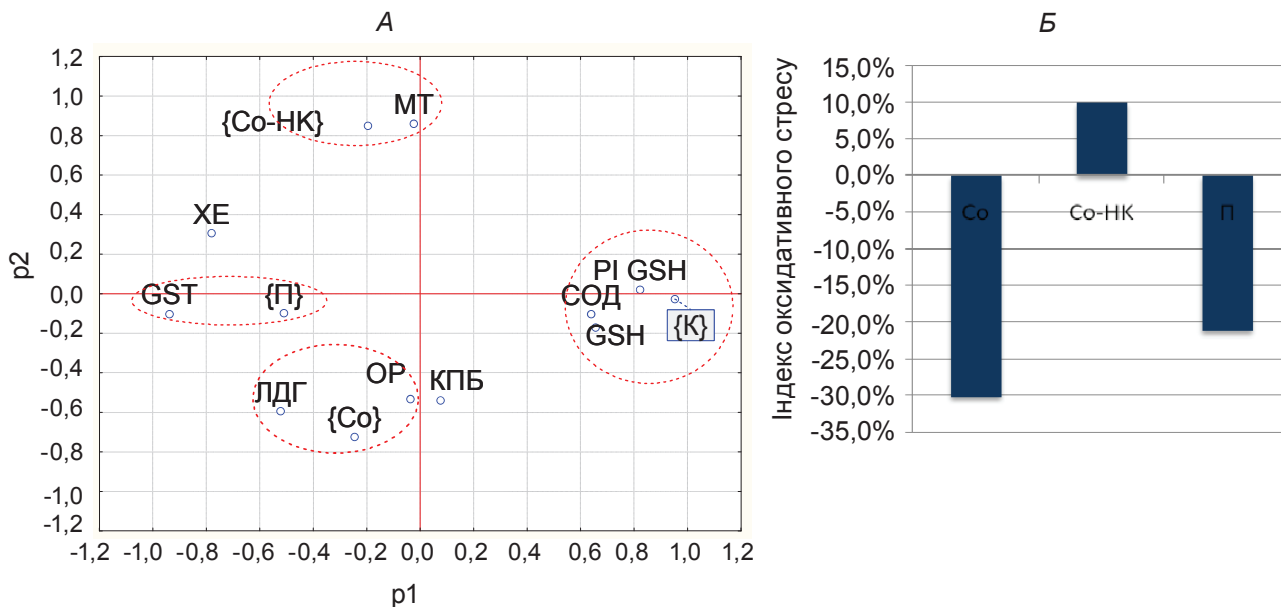


Рис. 4. Інтегральний аналіз біомаркерів стресу і токсичності травної залози молюска: А – метод головних компонент, Б – індекс оксидативного стресу

досліджуваних чинників [21]. З літератури відомо, що новітні металовмісні наноматеріали можуть бути навіть токсичнішими для водних організмів, ніж вільні іони відповідного металу. Причиною цього може бути підвищення біодоступності металу за рахунок утворення комплексу з полімерним носієм, а також через порушення гомеостазу металів в організмі, оксидативний стрес та інші причини [3]. Проте Со-НК виявився достатньо стійким і безпечним і мав мінімальну токсичність порівняно із його складовими.

Ініціація утворення активних форм кисню (АФК) та поява ознак оксидативного стресу вважається найбільш послідовною схемою відповіді організму на модельну дію наноматеріалів. Вона була описана в низці робіт із використанням як клітинних ліній [6, 22], так і водних організмів, зокрема молюсків [23]. Як відомо, іони кобальту збільшують рівень утворення АФК та апоптотичну активність у клітинах ендотелію EA.hy926 [22], експресію генів, продукти яких відповідальні за гіпоксію та обмін вуглеводів у кератиноцитах людини [6]. Згідно з одержаними результатами, полімерний носій та, особливо, іони кобальту, також спричиняють прооксидантні зміни у травній залозі молюсків, однак їх поєднання у наноконкомпозиті дає відмінні результати і не зумовлює появи ознак оксидативного ураження у тварин. Подібну модель відповіді спостерігали у лінії клітин HaCaT та *C. fluminea* в умовах фізіологічних концентрацій Со-НК

та Au-НК на рівні експресії генів та генних кластерів, продукти яких спричиняють оксидативний стрес [9, 24]. Такий ефект може бути наслідком як високої стійкості комплексу Со-НК, так і недостатнім рівнем продукції АФК, які можна вважати специфічними сигнальними молекулами, необхідними для активації систем антиоксидантного захисту.

MT, завдяки високому вмісту сульфгідрильних нуклеофільних груп, можуть реагувати з електрофільними реагентами, такими як іони важких металів і вільні радикали [15]. Як видно з одержаних нами результатів, вміст MT молюска за дії іонів кобальту зменшується, що може вказувати на залучення MT до антиоксидантного захисту для усунення АФК, утворення яких, ймовірно, відбувається у реакції  $Co^{2+}$  із гідроген пероксидом [25]. Наведені міркування узгоджуються із порівняно високим рівнем ОР та негативною кореляцією між вмістом MT та утворенням ОР ( $r = -0,51$ ;  $P < 0,001$ ), а також відповідають даним про часткове окислення тіолових груп MT у реакції з АФК [15]. Подібну модель відповіді MT спостерігали також у тканинах молюска за дії CdTe-НК [5]. Разом з тим, на протипагу дії іонів  $Co^{2+}$ , Со-НК зумовлює зростання рівня MT за відсутності прооксидантних змін, що можна розцінити як адекватну реакцію на дію чинника у межах адаптивного потенціалу.

Згідно з одержаними нами результатами, як Со-НК, так і  $Co^{2+}$  і полімерний носій активують холінестеразу. Як відомо, XE є

функціональною мішенню дії карбаматних та орґанофосфатних сполук, зокрема низки біоцидів і нервово-паралітичних речовин, які вважаються квазінезворотними інгібіторами ензиму. Вони діють як псевдосубстрати та інактивують карбамілювання або фосфорилування залишків серину в активному центрі ензиму [26]. Крім того, показано, що низка важких металів, а саме  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  та  $Pb^{2+}$  [27], також інгібує активність ензиму. З іншого боку,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $La^{+3}$ ,  $Sc^{+3}$ ,  $V^{+5}$  та  $Na^{+}$  є активаторами ензиму, позаяк здатні зв'язуватися з його периферичними центрами [27, 28]. Можна припустити, що залучення додаткових центрів реалізується і для зв'язування досліджуваних нами речовин. Перехід від активуючого впливу на ХЕ до інактивації цього ензиму при збільшенні концентрації чинника був доведений для  $La^{+3}$  та  $Sc^{+3}$  [28].

Участь GST у детоксикаційних процесах продемонстрована для багатьох видів тварин [29]. Зокрема, відомо, що дія наночастинок карбону та  $TiO_2$  зумовлює активацію GST у молюсків *Mytilus galloprovincialis* [30]. Разом з тим, відомо, що високі концентрації дивалентних металів (у концентрації 0,1 мМ), зокрема: ртуті, кадмію, міді, цинку та кобальту інгібують активність GST [31]. Зважаючи на це, можна припустити, що вплив досліджуваних нами чинників здійснюється в межах адаптивного потенціалу молюска.

Підсумовуючи одержані нами результати, варто зазначити, що молюски чутливо та селективно реагують на дію Со-НК і його складових. Це дозволяє використовувати їх як альтернативні (вищим хребетним) тест-системи для оцінки токсичності наноматеріалів. Експериментальний підхід, застосований нами, дозволив встановити специфічні та універсальні показники токсичності Со-НК та його окремих компонентів для молюска. Показано, що у тварин спостерігаються специфічні прояви токсичності: оксидативний стрес і перехід до анаеробіозу внаслідок дії  $Co^{2+}$ , активація глутатіонзалежної детоксикації ксенобіотиків у присутності Со-НК. Вплив Со-НК має ознаки антиоксидантної дії завдяки функціонуванню МТ. Поряд з цим, встановлено спільні ознаки відповіді молюска на дію чинника, незалежно від його природи, зокрема прооксидантні зміни стану GSH, пригнічення СОД активності й активація ХЕ.

Роботу виконано за підтримки НАН України в рамках науково-дослідної роботи № 34-10.

## ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ КОБАЛЬТСОДЕРЖАЩЕГО НАНОКОМПОЗИТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОХИМИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА *Anodonta cygnea*

Г. И. Фальфушинская<sup>1</sup>, Л. Л. Гнатишина<sup>1</sup>,  
О. Б. Столяр<sup>1</sup>, Н. Е. Митина<sup>2</sup>,  
А. С. Заиченко<sup>2</sup>, Е. З. Филяк<sup>3</sup>,  
Р. С. Стойка<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Тернопольский национальный педагогический университет имени Владимира Гнатюка, Украина;  
e-mail: halynka.f@gmail.com,  
oksana.stolyar@gmail.com;

<sup>2</sup>Национальный университет «Львовская Политехника», Украина;

<sup>3</sup>Институт биологии клетки НАН Украины, Львов;  
e-mail: stoika@cellbiol.lviv.ua

Активное внедрение наноматериалов требует развития методов, позволяющих определять их потенциальную экотоксичность. Целью нашего исследования было определение специфических признаков влияния кобальтсодержащего наноконпозита (Со-НК) на молекулярные стресс-респонсивные системы в пищеварительной железе двустворчатого моллюска *Anodonta cygnea*. Наноконпозит был получен при смешивании спиртовых растворов N-винилпирролидона, 5-(трет-бутилперокси)-5-метил-1-гексен-3-ина, диметиламиноэтилметакрилата и хлорида кобальта. После инкубации моллюсков в течение 14 суток с добавлением в среду инкубации Со-НК,  $CoCl_2$  и полимерного носителя установлено, что Со-НК, в отличие от других факторов, не вызывает оксидативный стресс, который определяли по активности супероксиддисмутазы, по содержанию металлотионеинов (МТ), редокс-индексу глутатиона и уровню образования оксирадикалов. Показано, что специфически признаками воздействия Со-НК является увеличение содержания МТ, для  $CoCl_2$  – увеличение лактатдегидрогеназной активности и уровня оксирадикалов, а полимерный носитель усиливает глутатионтрансферазную активность.

Ключевые слова: наноконпозит, кобальт, биомаркер, моллюск, оксидативный стресс, металлотионеины.

**EVALUATION OF BIOLOGICAL EFFECTS OF COBALT-NANOCOMPOSITES WITH THE USE OF BIOCHEMICAL MARKERS OF BIVALVE MOLLUSK *Anodonta cygnea***

H. I. Falfushynska<sup>1</sup>, L. L. Gnatyshyna<sup>1</sup>,  
O. B. Stoliar<sup>1</sup>, N. E. Mitina<sup>2</sup>,  
O. S. Zaichenko<sup>2</sup>, Ye. Z. Filyak<sup>3</sup>,  
R. S. Stoika<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Volodymyr Hnatiuk Ternopil National Pedagogical University, Ukraine;  
e-mail: halynka.f@gmail.com,  
oksana.stolyar@gmail.com;

<sup>2</sup>Lviv Polytechnic National University, Ukraine;

<sup>3</sup>Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv;  
e-mail: stoika@cellbiol.lviv.ua

**S u m m a r y**

Intensive implementation of nanomaterials requires development of novel methods for evaluation of their potential ecotoxicity. The aim of our study was to identify specific characteristics of the effect of cobalt-nanocomposite (Co-NC) on the molecular stress-responsive system in the digestive gland of bivalve mollusk *Anodonta cygnea*. Nanocomposite was synthesized by mixing alcohol solution of copolymer N-vinylpyrrolidone, 5-(tert-butylperoxy)-5-methyl-1-hexene-3-yne and dimethylaminoethylmetacrylate and cobalt (II) chloride. After 14 days of the mollusk exposure in the presence of Co-NC, CoCl<sub>2</sub> or corresponding polymer substance it was shown that the Co-NC, in contrast to other agents, does not cause an oxidative stress due to the superoxide dismutase activity, metallothioneins (MTs) level, glutathione redox index and oxyradical production. Multivariate analysis confirmed specific features of the Co-NC's effect related to an enhanced expression of MTs, while CoCl<sub>2</sub> activated lactate dehydrogenase and oxyradical production, and polymer substance enhanced glutathione transferase activity.

**Key words:** nanocomposite, cobalt, mollusk, biomarker, oxidative stress, metallothionein.

1. Kahru A., Dubourguier H.-C. // *Toxicology*. – 2010. – **269**. – P. 105–119.
2. Tedesco S., Doyle H., Blasco J. et al. // *Aquat. Toxicol.* – 2010. – **100**. – P. 178–186.
3. Shaw B. J., Handy R. D. // *Environ. Int.* – 2011. – **37**. – P. 1083–1097.
4. Handy R. D., von der Kammer F., Lead J. R. et al. // *Ecotoxicology*. – 2008. – **17**. – P. 287–314.
5. Peyrot C., Gagnon C., Gagné F. et al. // *Comp. Biochem. Physiol.* – 2009. – **150C**. – P. 246–251.
6. Busch W., Kühnel D., Schirmer K., Scholz S. // *BMC Genomics*. – 2010. – **11**. – P. 65–86.
7. Figgitt M., Newson R., Leslie I. J. et al. // *Mutation Res.* – 2010. – **688**. – P. 53–61.
8. IARC. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Cobalt in Hard-metals and Cobalt Sulfate, Gallium Arsenide, Indium Phosphide and Vanadium Pentoxide // International Agency for Research on Cancer, Hyon, France. – 2006. – **86**. monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol86/mono86.pdf – ISBN92-832-1286-X.
9. Gault N., Sandre C., Poncy J.-L. et al. // *Toxicol. Vitro*. – 2010. – **24**. – P. 92–98.
10. Falfushynska H. I., Gnatyshyna L. L., Farkas A. et al. // *Chemosphere*. – 2010. – **81**. – P. 1342–1351.
11. Falfushynska H. I., Gnatyshyna L. L., Golubev A. P., Stoliar O. B. // *Environ. Toxicol.* – 2009. – **57**. – P. 86–95.
12. Zaichenko A., Voronov S., Kuzaev A. et al. // *J. Applied Polymer Sci.* – 1998. – **70**. – P. 2449–2455.
13. Beauchamp C., Fridovich I. // *Anal. Biochem.* 1971. – **44**. – P. 276–287.
14. Anderson M. E. // *Meth. Enzymol.* – 1985. – **113**. – P. 548–555.
15. Viarengo A., Burlando B., Cavaletto M. et al. // *Am. J. Physiol. Regul. Physiol.* – 1999. – **277**. – P. R1612–R1619.
16. Луцак В. І., Багнюкова Т. В., Луцак О. В. // *Укр. біохім. журн.* – 2004. – **76**, № 3. – С. 136–141.
17. Bergmeyer H. U., Bernt E. Bergmeyer H. U. (Eds.), *Meth. Enzym. Analysis*. Academic Press, New York, 1974. – **II**. – P. 574–579.
18. Habig W. H., Pabst M. J., Jakoby W. B. // *J. Biol. Chem.* – 1974. – **249**. – P. 7130–7139.
19. Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V. J., Featherstone R. M. // *Biochem. Pharmacol.* 1961. – **7**. – P. 88–95.
20. Деклараційний пат. 45298 (UA), МПК (2009): А61К 38/04; В63С 9/00; С12N 9/00; G01N 33/00. Спосіб інтегральної оцінки біологічної відповіді на стан водного середовища / Столяр О. Б., Фальфушинська Г. І., Міщук О. В. – Опубл. 10.11.2009, Бюл. № 21.

21. *Anestis A., Lazou A., Pörtner H. O., Michaelidis B.* // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2007. – **293**. – P. 911–921.
22. *Tan C. B., Gao M., Xu W. R.* // *Biol. Pharm. Bull.* – 2009. – **32**, N 8. – P. 1359–1363.
23. *Gagne F., Auclair J., Turcotte P. et al.* // *Aquat. Toxicol.* – 2008. – **86**. – P. 333–340.
24. *Renault, S., Baudrimont M., Mesmer-Dudons N. et al.* // *Gold Bull.* – 2008. – **41**, N 2. – P. 116–126.
25. *Hanna P. M., Kadiiska M. B., Mason R. P.* // *Chem. Res. Toxicol.* – 1992. – **5**, N 1. – P. 109–115.
26. *Моралев С. Н., Розенгарт Е. В.* // *Журн. эвол. биохим. физиол.* – 2004. – **40**. – С. 3–15.
27. *Tomlinson G., Mutus B., McLennan I.* // *Can. J. Biochem.* – 1981. – **59**, N 9. – P. 728–735.
28. *Marquis J. K., Black E. E.* // *Biochem. Pharmacol.* – 1985. – **34**, N 4. – P. 533–538.
29. *Canesi L., Fabbri R., Gallo G. et al.* // *Aquat. Toxicol.* – 2010. – **100**, N 2. – P. 168–177.
30. *Eaton D. L., Bammler T. K.* // *Toxicol. Sci.* – 1999. – **49**, N 2. – P. 156–164.
31. *Sen A., Semiz A.* // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2007. – **68**, N 3. – P. 405–411.

Отримано 15.06.2011