

УДК [504.064:577.25](564.141)

Г. І. Фальфушинська<sup>1, 2</sup>, Л. Л. Гнатишина<sup>1, 2</sup>,  
О. Б. Столяр<sup>1</sup>

**СТАН МАРКЕРІВ ТОКСИЧНОСТІ ВОДНОГО  
СЕРЕДОВИЩА У ДВОСТУЛКОВОГО МОЛЮСКА  
UNIO TUMIDUS ЗА ДІЇ ПОШИРЕНИХ  
МУНІЦИПАЛЬНИХ ЗАБРУДНЮВАЧІВ**

Порівнювали стан стресочутливих і детоксикаційних систем двостулкового молюска перлівниці *Unio tumidus* з умовно чистої місцевості за впливу на організм триклозану (500 нг/л), ібупрофену (250 нг/л) і естрону (100 нг/л) та із забрудненої стічними водами водойми. Встановлено ознаки окисного стресу та генотоксичності у молюсків із забрудненої водойми, що свідчить про стійкі негативні наслідки хронічного впливу природного забруднення. За дії всіх досліджуваних речовин у молюсків відбуваються прооксидантні зміни внаслідок пригнічення каталазної активності та збільшення вмісту карбонільних похідних білків і металотіонеїнів. Вплив триклозану та естрону спричинює збільшення проникності лізосомальних мембран (ознака цитотоксичності) та виникнення ознак генотоксичності, вплив естрону — зростання вмісту оксирадикалів. Досліджені складові стічних вод модулюють фізіолого-біохімічні реакції молюсків навіть у наномолярних концентраціях.

**Ключові слова:** молюск *Unio tumidus*, триклозан, ібупрофен, естрон, металотіонеїни, окисний стрес, цитотоксичність, генотоксичність.

Застосування широкого спектру фармацевтичних препаратів та засобів особистої гігієни (ФПЗОГ) значно підвищило якість і тривалість життя людини. Разом з тим, невпинне збільшення обсягів їх використання (у США за період 1999—2009 рр. кількість особистих листків призначень препаратів цієї групи зросла від 2 до 3,9 млрд. [36]), у тому числі і неконтрольоване, призводить до надходження ФПЗОГ та їх активних метаболітів у стічні води [19]. Використання препаратів групи ФПЗОГ забезпечує певні переваги для цільових організмів, у той же час ці синтетичні органічні сполуки, а також їх метаболіти належать до потенційно найбільш небезпечних новітніх забруднювачів щодо представників інших класів живих організмів — від найнижчих до найвищих ланок трофічного ланцюга [23, 41]. Вони важко піддаються виявленню у середовищі та можуть токсично впливати вже у наномолярних концентраціях. Поява ознак зменшення рухливості сперматозоїдів, розлади статевої поведінки і дозрівання ракоподібних, риб та жаб — лише окремі свідчення негативного впливу ФПЗОГ [22, 23]. Це зумовлює необхідність визначення ознак дії зазначених препаратів на нецільові організми та пошуку експрес-методів їх детекції у середовищі.

© Г. І. Фальфушинська, Л. Л. Гнатишина, О. Б. Столяр, 2015

Для дослідження були обрані антимікробний препарат триклозан, нестероїдний протизапальний засіб ібупрофен і природний естроген естрон. Триклозан входить до переліку п'яти найпоширеніших забруднювачів середовища, має здатність накопичуватись у седиментах, за присутності у воді хлору може утворювати діоксин-подібні сполуки [14, 33]. Експертиза Центру контролю захворювань США показала, що у сечі більш як 75% населення віком від 5 років міститься триклозан (<http://www.nytimes.com/2011/08/20/business>). Ібупрофен посідає третє місце у світі з-поміж фармацевтичних препаратів за обсягами використання (наприклад, у Німеччині за 2001 р. було використано 345 тонн [19]), його слідові кількості зареєстровано у більшості поверхневих (до 729 нг/дм<sup>3</sup>) і стічних (до 85 мкг/дм<sup>3</sup>) вод [13, 30]. Естрон (E1) — природний естроген, якому належить найбільша частка (до 70 нг/дм<sup>3</sup>) серед стероїдних гормональних препаратів у неочищених стічних водах різних країн [24].

Зважаючи на те, що однією з найбільш універсальних реакцій організму на дію пошкоджуючого чинника є окисний стрес [1, 2, 34], метою нашої роботи було вивчити стан стресочутливих систем двостулкового молюска перлівниці *Unio tumidus* за дії триклозану, ібупрофену та естрону у концентраціях, які відповідають діапазону їх вмісту у стічних водах, та порівняти реакцію організму на вплив цих речовин з реакцією на тривалу дію комплексного природного забруднення. Двостулковий молюск був обраний для дослідження як організм, що здатний акумулювати речовини з водного середовища, та як альтернативна модель для прогнозування впливу новітніх забруднювачів на людину. У попередніх порівняльних дослідженнях двостулкових молюсків у природних водоймах та за експериментального впливу пестицидів і токсичних металів нами було встановлено, що до найбільш чутливих маркерів належать показники системи антиоксидантного захисту та металодепонувальних стрес-залежних протеїнів — металотіонеїнів (MT) [16—18].

**Матеріал і методика досліджень.** Дослідження проводили на дорослих самцях двостулкового молюска перлівниці *U. tumidus* із довжиною мушлі 8,0 см і масою 50—60 г. Молюсків відбирали у вересні з двох місцевостей: у верхів'ї р. Серет (с. Івачів Тернопільської обл., умовно чиста місцевість, К-група) та у ставі у нижній течії р. Нічлава (нижче м. Борщів, у якому не працюють очисні споруди, в районі відносно високої аграрної активності, Б-група). Вибір місцевостей обґрунтовано на підставі результатів наших досліджень біомаркерів водних тварин у них [17], а також за повідомленнями регіонального Держуправління охорони навколишнього природного середовища (<http://www.menr.gov.ua/content/article/7789>).

Молюсків усіх досліджених груп аклімували до лабораторних умов протягом семи діб. Експериментальні умови створювали в акваріумах місткістю 40 л, у які поміщали по десять особин згідно із загальноприйнятою схемою токсикологічного експерименту. 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, температура становила близько 18°C. Воду відстоювали і змінювали через кожні дві доби, поновлюючи в акваріумах з експериментальними групами вміст досліджува-

ної сполуки. Тварин годували подрібненим комерційним кормом Акваріус «FITO MENU».

Було сформовано п'ять груп молюсків. Чотири групи склали особини з чистої місцевості — контрольна (К-група) та ті, яким безпосередньо у воду ібупрофен (250 нг/л, І-група), триклозан (5-хлор-2-(2,4-дихлорофеноксі)-фенол, 500 нг/л, Т-група) або естрон Е1 (100 нг/л, Е-група). Концентрація досліджених речовин відповідала діапазону їх вмісту у поверхневих водах (ібупрофену) або у місцях скиду побутових стоків з густонаселених міст (естрону і триклозану) [33, 38, 41]. У п'яту групу входили молюски із забрудненої стічними водами місцевості (Б-група). Інкубація тварин тривала 14 діб, після чого з м'яза-адуктора відбирали гемолімфу шприцом, що містить фізрозчин для холоднокровних тварин, з метою одержання 50%-ної суспензії клітини/фізрозчин (з 10—12 особин на зразок). Далі тварин умертвляли, визначали стать методом мікроскопічного аналізу гонад і у особин чоловічої статі відбирали тканину травної залози, оскільки в організм молюсків органічні сполуки потрапляють з продуктами харчування та накопичуються переважно у кишечнику і травній залозі [4]. Усі процедури з відбору і обробки тканини проводили на холоді.

Для характеристики стану МТ, систем антиоксидантного захисту та нейротоксичності були використані оптичні методи [16—18]. Активність супероксиддисмутази (СОД) [КФ 1.15.1.1] визначали за зниженням швидкості відновлення нітротетразолію синього [13]. Активність каталази [КФ 1.11.1.6] встановлювали у розчинній фазі гомогенату за методом Аєбі [7], який ґрунтується на зменшенні оптичної густини при 240 нм при розкладі гідрогенпероксиду за дії каталази. Вміст відновленого глутатіону (GSH) у депротейнізованому фільтраті тканини визначали ферментним методом за допомогою реактиву Елмана (5,5'-дитіо-біс-2-нітробензойна кислота, ДТНБ) (Fluka) [8]. Вміст МТ обчислювали за модифікованим рівнянням Гамільтона, враховуючи стехіометричний характер зв'язування цих металів:  $m(\text{MT}) = 0,5(v(\text{Zn}) \cdot M(\text{MT})/7 + v(\text{Cu}) \cdot M(\text{MT})/12)$  (мкг), де  $v$  — кількість металу в МТ, мкмоль/г тканини;  $M(\text{MT})$  молярна маса МТ (8000 г/моль), 7 і 12 — відповідно кількість йонів цинку і міді (I), що зв'язуються молекулою МТ за повного насичення [31].

Вміст карбонільних похідних білків (КПБ) вимірювали за їх здатністю утворювати 2,4-динітрофенілгідрозони [5]. Кількість оксирадикалів у супернатанті гомогенату тканини в НЕРЕС-сахарозному буфері (рН 7,4) оцінювали за утворенням флуоресцентного продукту родаміну 123 в реакції нефлуоресцентного деривату дигідрородаміну (Sigma) з активними формами кисню при хвилі збудження ( $ex$ ) = 485 нм та випромінювання ( $em$ ) = 538 нм [38] та виражали в умовних одиницях флуоресценції (УОФ)/хв·мг білка. Вміст ТБК-активних продуктів (ТБК-АП) визначали спектрофотометрично у реакції з 2-тіобарбітуровою кислотою з використанням молярного коефіцієнта екстинції забарвленого комплексу  $\varepsilon = 1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  [27], активність глутатіон-трансферази [КФ 2.5.1.18] — за утворенням адуктів 1-хлор-2,4-динітробензолу (Sigma) з глутатіоном [20], активність холінестерази [КФ 3.1.1.7] — за швидкістю гідролізу ацетилтіохолін йодиду (Sigma), яку реєстрували за допомогою ДТНБ [15].

Ознаки гено- та цитотоксичності оцінювали згідно з рекомендаціями UNEP/RAMOGЕ ([http://195.97.36.231/acrobatfiles/МАРDocAcrobatfiles/Ramoge/Ramoge\\_english.pdf](http://195.97.36.231/acrobatfiles/МАРDocAcrobatfiles/Ramoge/Ramoge_english.pdf)). Пошкодження ДНК (ознака генотоксичності) визначали як розриви ланцюгів депротейнізованої ДНК методом лужного осадження в 10%-ному розчині гомогенату тканини у 50 мМ трис-ЕДТА буферному розчині (рН 8,0), що містив 0,5% натрію додецил-сульфату (Sigma) при  $e\lambda = 360$  нм та  $e\mu = 450$  нм [28]. Цитотоксичність діагностували за порушенням стабільності лізосомальних мембран, яку оцінювали за тривалістю утримання лізосомами нейтрального червоного [11].

За порівняльним обрахунком співвідношення стану антиоксидантних чинників (СОД, каталаза, GSH) і прооксидантних проявів (ТБК-АП, КПБ та оксирадикали) у досліджуваних групах після уніфікації значень показників встановлювали інтегральний індекс окисного стресу (ІОС) за формулою  $\Sigma(\text{СОД} + \text{каталаза} + \text{GSH}) / \Sigma(\text{ТБК-АП} + \text{КПБ} + \text{оксирадикали})$  [3].

Результати вимірів представлено 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 використовували метод побудови класифікаційного дерева та кореляційний аналіз. Порівняльний аналіз біологічних параметрів здійснювали з використанням комп'ютерних програм Statistica v 8.0 та Excel для Windows 2000.

### **Результати досліджень та їх обговорення**

Окисний стрес, який виникає внаслідок порушення балансу між утворенням та знешкодженням активних форм кисню, вважається неспецифічною ознакою впливу несприятливих чинників різного походження на тварин [26]. Показники ефективності функціонування системи антиоксидантного захисту представлено у таблиці 1. Вони свідчать, що як за дії досліджених речовин, так і в результаті тривалої дії природного забруднення у травній залозі молюсків проявляються ознаки окисного стресу. Зокрема, відзначено підвищений вміст КПБ і оксирадикалів (у молюсків Б- та Е-груп), глутатіон-трансферазну активність, пригнічення активності каталази (за винятком Б-групи) та СОД (у Е-групі). Разом з тим, у всіх експериментальних групах вміст ТБК-АП був нижчий, ніж у контрольній.

Концентрація GSH у травній залозі біла вищою у молюсків Б-групи, ніж у контролі. В І-групі вона зростала, тоді як у Т-групі зменшувалась порівняно з контролем, а в Е-групі не зазнавала змін. Вміст МТ у всіх експериментальних групах був вищим, ніж у контролі.

За впливу триклозану та естрогену у молюсків було виявлено ознаки цито- і генотоксичності. Підвищений рівень фрагментованої ДНК порівняно з контролем відмічений у всіх експериментальних групах, крім І-групи. Разом з тим, активність холінестерази у групах не відрізнялась.

Порівняння окремих характеристик за допомогою кореляційного аналізу свідчить про обернений зв'язок між вмістом GSH та кількістю роз-

**1. Показники стану систем антиоксидантного захисту та детоксикації ксенобіотиків, цито- та генотоксичності у молюсків *Unio tumidus* після 14-добової інкубації ( $M \pm SD$ ,  $n = 8$ )**

Показники	Групи				
	К	Б	І	Т	Е
Активність супероксид-дисмутази, у. о./мг білка	2,3 ± 0,3	2,6 ± 0,3	2,9 ± 0,3*	3,8 ± 0,2*	1,8 ± 0,2*
Активність каталази мкмоль/хв·мг білка	158,8 ± 23,1	134,2 ± 16,1	113,2 ± 11,2*	103,1 ± 17,5*	53,1 ± 11,8*
Вміст GSH, мкмоль/г тканини	1,8 ± 0,3	2,3 ± 0,1*	2,2 ± 0,1*	1,5 ± 0,1*	2,0 ± 0,1
Вміст GST, мкмоль/хв·г тканини	3,8 ± 0,3	4,8 ± 0,4*	5,4 ± 0,9*	4,6 ± 0,4*	5,8 ± 0,5*
Вміст МТ, мкг/г тканини	28,3 ± 2,3	36,1 ± 3,1*	45,6 ± 5,6*	54,4 ± 4,8*	55,1 ± 5,5*
Вміст ТБК-АП, нмоль/г тканини	25,4 ± 1,0	27,3 ± 3,7	20,3 ± 2,4*	22,6 ± 1,8*	18,8 ± 3,5*
Вміст КПБ, мкмоль/г тканини	0,7 ± 0,1	0,9 ± 0,1*	1,1 ± 0,1*	1,3 ± 0,1*	1,6 ± 0,1*
Швидкість утворення оксирадикалів, УОФ/хв·мг білка	4,0 ± 0,4	5,3 ± 0,6*	4,2 ± 1,4	3,7 ± 0,6	7,1 ± 0,6*
Фрагментація ланцюгів ДНК, %	4,2 ± 0,4	7,0 ± 0,7*	4,1 ± 0,3	9,8 ± 1,7*	8,7 ± 0,9*
Лізосомальна стабільність, хв	38 ± 4	35 ± 5	35 ± 5	27 ± 3*	25 ± 3*
Активність холінестерази, нмоль/хв·мг білка	1,0 ± 0,2	0,8 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,2 ± 0,1	0,8 ± 0,2

\* Відмінності порівняно з контрольною групою вірогідні,  $p < 0,05$ .

ривів ланцюгів ДНК ( $r = -0,42$ ,  $p < 0,01$ ), а також між СОД-активністю та інтенсивністю утворення оксирадикалів ( $r = -0,56$ ,  $p < 0,01$ ). Це може бути свідченням адекватної відповіді з боку клітинних тіолів та першої ланки антиоксидантного захисту на окисне ураження. Разом з тим, значення ІОС свідчать про різний рівень збалансованості антиоксидантної активності та прооксидантних проявів залежно від природи діючого чинника. Так, за дії триклозану та естрону, а також у молюсків із забрудненої місцевості проявлялись ознаки виснаження системи антиоксидантного захисту, тоді як за дії ібупрофену сумарні зміни стану чинників антиоксидантного захисту та прооксидантних проявів були збалансовані (рисунки, а).

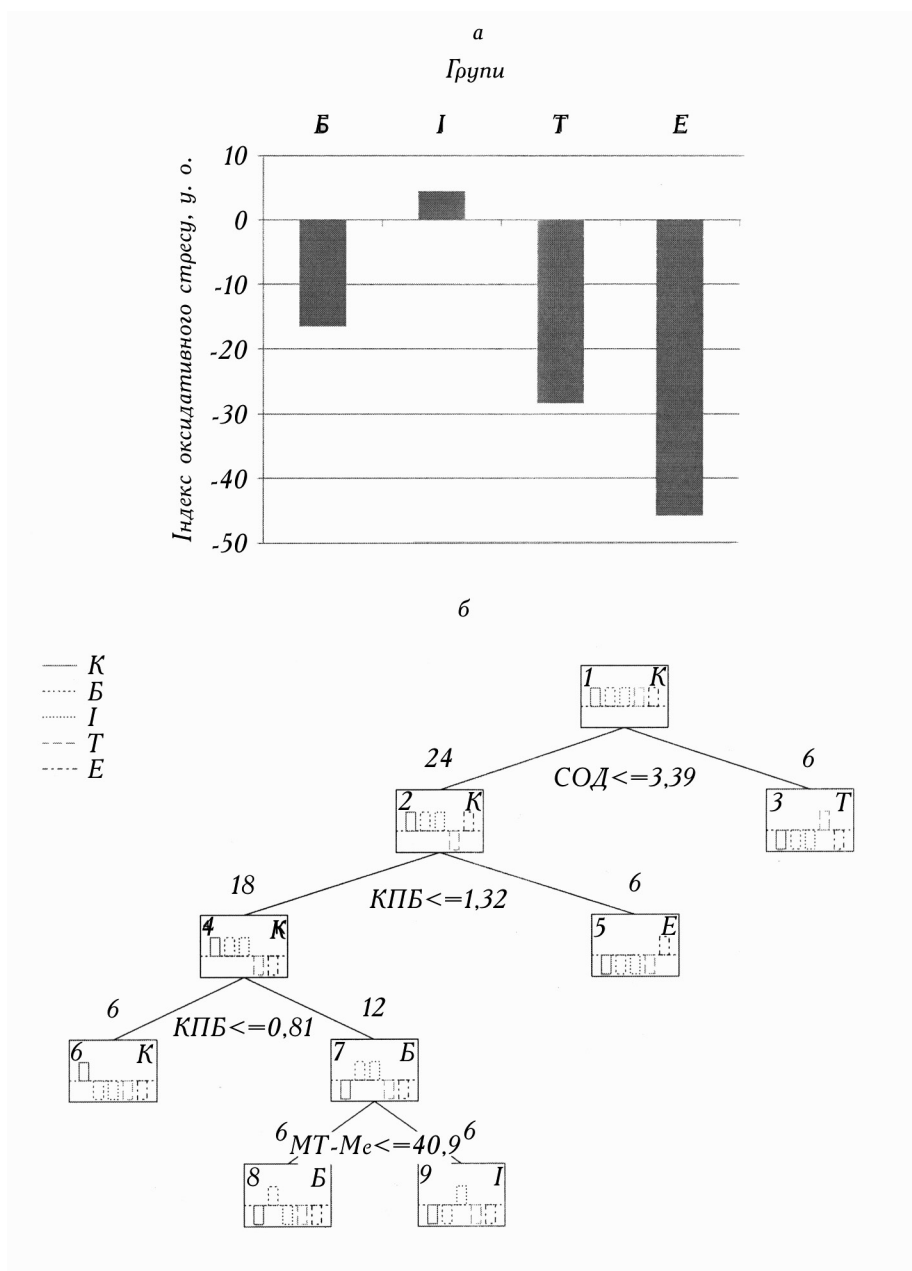
Для інтегрального аналізу одержаних результатів було використано метод побудови бінарного класифікаційного дерева із застосуванням *CART*-ал-

горитму, який імітує природний процес мислення при диференційній діагностиці. На кожному кроці побудови дерева правило, сформоване у вузлі, ділить масив даних на дві частини — в якій правило виконується (нащадок — *right*) і в якій воно не виконується (нащадок — *left*). Застосування цього підходу для кожної з досліджуваних груп молюсків дозволило виділити специфічні ознаки молекулярної відповіді на дію чинника. Визначальна роль серед них належить показникам окисного стресу (СОД-активність та вміст КПБ) та вмісту МТ (див. рисунок, б). За результатами побудови класифікаційного дерева встановлено, що стан показників у молюсків із забрудненої водойми найбільше наближений до такого у екземплярів I-групи.

Обмеженість та/або відсутність актуального досвіду досліджень токсичності ФПЗОГ з використанням безхребетних утруднює обговорення отриманих даних. Відомо, що триклозан проявляє високу активність у генерації активних форм кисню у культурі тимоцитів щурів [35], естрон (Е1) за окисної ситуації у клітині ініціює ушкодження молекул ДНК через утворення естроген-ДНК-адуктів [32], а ібупрофен є цитопротектором низькомолекулярних ліпопротеїнів за дії гідрогенпероксида [40], що узгоджується з нашими результатами про найменші прояви токсичності цієї сполуки порівняно з іншими дослідженими.

Показано, що різні ФПЗОГ модулюють функціонування нейро-гуморальної системи у широкого кола водних тварин та викликають її розлади [26]. Наприклад, ібупрофен і триклозан у концентрації до 1,23 мг/л у риб — даніо реріо, японської медаки та ракоподібних викликають збільшення вмісту вітелогеніну та 17 $\beta$ -естрадіолу, активацію ароматази і холінестерази [21, 29]. Однак такі висновки зроблено переважно при дослідженні концентрацій забрудників, що на порядок перевищують їх реальний вміст у природних водоймах, у гострому експерименті та на прикладі хребетних [21]. У нашому дослідженні у молюсків за дії ФПЗОП та комплексного природного забруднення ознаки порушення синаптичної передачі нервових імпульсів (пригнічення активності холінестерази) були відсутні.

Металотіонеїни — внутрішньоклітинні низькомолекулярні стресорні протеїни, які депонують йони цинку, міді та кадмію. Їх синтез може індукуватися різними ендогенними та екзогенними субстанціями, насамперед металами, активними формами кисню, а також глюкокортикоїдами тощо [32]. Збільшення кількості МТ у клітинах має сприяти зменшенню специфічної токсичності йонів металів, а також пошкоджуючих впливів прооксидантних сполук через регуляцію внутрішньоклітинного вмісту фізіологічних металів, зокрема цинку і міді [16]. Наприклад, показано, що зв'язування цинку з МТ сприяє стабілізації лізосомальних мембран і захисту клітин від окисного ушкодження [39]. Згідно з нашими результатами, за дії всіх досліджуваних сполук вміст МТ зростає на 28—95%. Залучення додаткових можливостей зв'язування металів МТ сприяє зменшенню проявів ознак цитотоксичності:  $MT-Me = 67,14 - 1,12 LC^* + 2,09 СОД + 89,90 ДНКф + 0,21 ОР$ ,  $R^2 = 0,61$ ,  $F(4,25) = 9,59$   $p < 0,001$ , де  $LC$  — лізосомальна стабільність,  $СОД$  — активність супероксиддисмутази,  $ДНКф$  — ступінь фрагментації ланцюгів ДНК,  $ОР$  — утворення оксирадикалів, \* показник вносить вірогідний вклад у математичну модель.



Інтегральний аналіз біохімічних показників травної залози молюски за дії модельних чинників та природного комплексного забруднення: а — індекс окисного стресу; б — класифікаційне дерево за CART-алгоритмом.

Найбільш істотного системного ураження молюски зазнають за дії триклозану та естрону (див. рисунок). За їх наномолярних концентрацій у тварин виявлено ознаки окисного ураження, гено- та цитотоксичності. Важливо, що обрана нами концентрація триклозану порівняно з такою у крові людини після 12 тижнів використання зубної пасти з цією речовиною [10] та у



сечі [9], естро́ну — з такою в тканині ендометрію жінок у менопаузі [37]. За дії триклозану та естро́ну описано ознаки цитотоксичності (зменшення виживання клітин), генотоксичності (ушкодження ДНК), збільшення вмісту активних форм кисню у клітинах людини в умовах *in vitro* та *in vivo* [25, 32], що узгоджується з отриманими нами результатами з використанням молюсків. Відтак, з огляду на високу подібність реакції, молюски можуть бути використані як альтернативні моделі для прогнозу негативних наслідків дії ФПЗОГ для людини і розуміння механізмів їх токсичності за умови багатофакторних впливів та синергічно-антагоністичних взаємодій *in vivo*.

Ібупрофен у концентрації, що відповідає фоновому вмісту у поверхневих водах [30] та є на порядок нижчою від рекомендованої добової дози препарату для людини, є відносно безпечним: він не викликає проявів цито- та генотоксичності у молюсків. Однак, зважаючи на значні обсяги використання цього препарату в Україні (з-поміж 15 нестероїдних протизапальних препаратів, зареєстрованих в Україні, за рівнем продажу ібупрофен займає друге місце) [6], слід враховувати той факт, що ібупрофен порушує редокс-рівновагу у клітині, насамперед за рахунок дисбалансу системи СОД/каталаза та збільшення вмісту КПБ.

### Висновки

За дії естро́ну, триклозану та ібупрофену у травній залозі молюсків відбуваються прооксидантні зміни (за рахунок пригнічення каталазної активності та збільшення вмісту КПБ), зростає вміст стрес-залежних металотіонеїнів та активність глутатіонтрансфери, як у особин після тривалого перебування у природному токсичному середовищі. За ознаками цито- і генотоксичності ступінь токсичності середовища існування зростає у ряду: ібупрофен — природна забруднена водойма — естро́н — триклозан. Двостулковий молюск перлівниця є зручною і коректною експериментальною моделлю для оцінки потенційних біоризиків використання фармацевтичних препаратів і засобів особистої гігієни для людини.

\*\*

*Сравнивали состояние стресс-чувствительных и детоксикационных систем двусторчатого моллюска жемчужницы *Unio tumidus* из условно чистого водоема при воздействии триклозана (500 нг/л), ибупрофена (250 нг/л) и эстро́на (100 нг/л) и из загрязненного сточными водами. Установлены признаки окислительного стресса и генотоксичности у моллюсков из загрязненного водоема. Воздействие всех исследуемых соединений у моллюсков вызывает прооксидантные изменения под влиянием триклозана и эстро́на увеличивалась проницаемость лизосомальных мембран, влияние эстро́на приводило к увеличению содержания оксирадикалов, а ибупрофен не вызывал признаков генотоксичности. Следовательно, воздействие исследованных веществ — распространенных составляющих сточных вод — модулирует физиолого-биохимические реакции моллюсков даже в наномолярных концентрациях.*

\*\*

*Stress-response and detoxification systems of bivalve mollusk *Unio tumidus* from reference site after impact of triclosan (500 ng/l), ibuprofen (250 ng/l) and estrone (100 ng/l) and from the polluted by the waste water site were compared after the exposure during 14*



days. Signs of oxidative stress and genotoxicity in mollusks from the polluted site were detected. In all exposed groups of mollusks prooxidative changes occurred. Triclosan and estrone causes increase of lysosomal membranes permeability, and estrone provoked increase of oxyradical formation. The signs of genotoxicity were not observed only under the action of ibuprofen. Thus, the effect of the considered compounds, which common components of wastewater even at nanomolar concentrations has modulated physiological and biochemical responses of mollusks.

\*\*

1. Арсан О.М. Состояние и перспективы развития водной экотоксикологии // Гидробиол. журн. — 2007. — Т. 43, № 6. — С. 50—60.
2. Гангзюра В.П., Груб'янюк В.В. Концепція шкодочинності в екології. — Тернопіль: Вид-во Терноп. пед. ун-ту, 2008. — 144 с.
3. Деклараційний патент на корисну модель № 52992 (UA), МПК (2009), A51K 38/04, B63C 9/00, C12N 9/00, G01N 9/00, G01N 33/00. Спосіб оцінки токсичності водного середовища / О. Б. Столяр, Г. І. Фальфушинська, Л. Л. Гнатишина (Україна); Заявл. 22.01.2010; Опубл. 27.09.2010, Бюл. № 18.
4. Лукашев Д.В. Содержание тяжелых металлов в воде и двустворчатых моллюсках на различных участках русла реки Южный Буг // Вод. ресурсы. — 2010. — Т. 37, № 3. — С. 351—355.
5. Луцк В.І., Багнюкова Т.В., Луцк О.В. Показники оксидативного стресу. 1. Тиобарбітурактивні продукти і карбонільні групи білків // Укр. біохім. журн. — 2004. — Т. 76, № 3. — С. 136—141.
6. Яковлєва Л.В., Литвиненко Г.Л. Аналіз фармацевтичного ринку нестероїдних протизапальних лікарських засобів в Україні // Клін. фармація. — 2010. — Т. 14, № 3. — С. 20—24.
7. Aebi H. Catalase // Methods of enzymatic analysis / Ed. by H. U. Bergmeyer. — London: Acad. Press, 1974. — P. 673—677.
8. Anderson M.E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples // Meth. Enzymol. — 1985. — Vol. 113. — P. 548—555.
9. Asimakopoulos A.G., Thomaidis N.S., Kannan K. Widespread occurrence of bisphenol A diglycidyl ethers, p-hydroxybenzoic acid esters (parabens), benzophenone type-UV filters, triclosan, and triclocarban in human urine from Athens, Greece // Sci. Total Environ. — 2014. — Vol. 470—471. — P. 1243—1249.
10. Bagley D.M., Lin Y.J. Clinical evidence for the lack of triclosan accumulation from daily use in dentifrices // Amer. J. Dent. — 2000. — Vol. 13, N 3. — P. 148—152.
11. Barsiene J., Andreikenaite L., Rybakovas A. Cytogenetic damage in perch (*Perca fluviatilis* L.) and duck mussel (*Anodonta anatina* L.) exposed to crude oil // Ekologiya. — 2006. — Vol. 1. — P. 25—31.
12. 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.
13. Blaise C., Gagné F., Eullaffroy P., Féraud J.-F. Ecotoxicity of selected pharmaceuticals of urban origin discharged to the Saint-Lawrence river (Québec, Canada): a review // Braz. J. Aquat. Sci. Technol. — 2006. — Vol. 10, N 2. — P. 29—51.

14. Buth J.M., Steen P.O., Sueper C. et al. Dioxin photoproducts of triclosan and its chlorinated derivatives in sediment cores // Environ. Sci. Technol. — 2010. — Vol. 44, N 12. — P. 4545—4551.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. Fent K., Weston A.A., Caminada D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals // Aquat. Toxicol. — 2006. — Vol. 76. — P. 122—159.
20. 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. 249, N 22. — P. 7130—7139.
21. Han S., Choi K., Kim J. et al. Endocrine disruption and consequences of chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and freshwater cladocerans *Daphnia magna* and *Moina macrocopa* // Aquat. Toxicol. — 2010. — Vol. 98, N 3. — P. 256—264.
22. Heckmann L.H., Callaghan A., Hooper H.L. et al. Chronic toxicity of ibuprofen to *Daphnia magna*: effects on life history traits and population dynamics // Toxicol. Lett. — 2007. — Vol. 172. — P. 137—145.
23. Jobling S., Williams R., Johnson A. et al. Predicted exposures to steroid estrogens in U.K. rivers correlate with widespread sexual disruption in wild fish populations // Environ. Health Perspect. — 2006. — Vol. 114, suppl. 1. — P. 32—39.
24. Kolpin D.W., Furlong E.T., Meyer M.T. et al. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams 1999—2000: a national reconnaissance // Environ. Sci. Technol. — 2002. — Vol. 36, N 6. — P. 1202—1211.
25. Kwon J.T., Lee M., Seo G.B. et al. Cytotoxic effects of air freshener biocides in lung epithelial cells // Nat. Prod. Commun. — 2013. — Vol. 8, N 9. — P. 1301—1304.
26. Matozzo V., Formenti A., Donadello G., Marin M.G. A multi-biomarker approach to assess effects of triclosan in the clam *Ruditapes philippinarum* // Mar. Environ. Res. — 2012. — Vol. 74. — P. 40—46.
27. Ohkawa H., Ohishi N., Tagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction // Anal. Biochem. — 1979. — Vol. 95, N 2. — P. 351—358.
28. Olive P.L. DNA precipitation assay: a rapid and simple method for detecting DNA damage in mammalian cells // Environ. Mol. Mutagen. — 1988. — Vol. 11, N 4. — P. 487—495.

29. *Oliveira R., Domingues I., Koppe Grisolia C., Soares A.M.* Effects of triclosan on zebrafish early-life stages and adults // *Environ. Sci. Pollut. Res. Intern.* — 2009. — Vol. 16, N 6. — P. 679—688.
30. *Panga P., Santos L.H., Amorim C.G. et al.* Pilot monitoring study of ibuprofen in surface waters of north of Portugal // *Ibid.* — 2013. — Vol. 20, N 4. — P. 2410—2420.
31. *Paris-Palacios S., Biagiante-Risbourg S., Fouley A., Vernet G.* Metallothioneins in liver of *Rutilus rutilus* exposed to  $\text{Cu}^{2+}$ . Analysis by metal summation, SH determination and spectrofluorimetry // *Comp. Biochem. Physiol. C.* — 2000. — Vol. 126C, N 2. — P. 113—122.
32. *Rogan E.G., Cavalieri E.L.* Oxidative stress in the metabolism of estrogens leading to cancer initiation: prevention by specific antioxidants // *Oxidative stress: diagnostics, prevention, and therapy.* — 2011. — ACS Symp. Ser., Chapter 4. — Vol. 1083. — P. 83—98.
33. *Singer H., Müller S., Tixier C., Pillonel L.* Triclosan: occurrence and fate of a widely used biocide in the aquatic environment: field measurements in wastewater treatment plants, surface waters, and lake sediments // *Environ. Sci. Technol.* — 2002. — Vol. 36, N 23. — P. 4998—5004.
34. *Stoliar O.B., Lushchak V.I.* Environmental pollution and oxidative stress in fish // *Oxidative stress — environmental induction and dietary antioxidant question* / Ed. By V. Lushchak. [On-line access <http://www.intechopen.com/books/oxidative-stress-environmental-induction-and-dietary-antioxidants/environmental-pollution-and-oxidative-stress-in-fish>].
35. *Tamura I., Kanbara Y., Saito M. et al.* Triclosan, an antibacterial agent, increases intracellular  $\text{Zn}^{2+}$  concentration in rat thymocytes: its relation to oxidative stress // *Chemosphere.* — 2012. — Vol. 86, N 1. — P. 70—75.
36. *Tong A.Y., Peake B., Braund R.* Disposal practices for unused medications around the world // *Environ. Intern.* — 2011. — Vol. 37, N 1. — P. 292—298.
37. *Vermeulen-Meiners C., Jaszmann L.J., Haspels A.A. et al.* The endogenous concentration of estradiol and estrone in normal human postmenopausal endometrium // *J. Steroid. Biochem.* — 1984. — Vol. 21, N 5. — P. 607—612.
38. *Viarengo A., Burlando B., Cavaletto M. et al.* Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis* // *Amer. J. Physiol.* — 1999. — Vol. 277, N 6. — P. 1612—1619.
39. *Ying G.-G., Kookana R. S., Ru Y.-J.* Occurrence and fate of hormone steroids in the environment // *Environ. Int.* — 2002. — Vol. 28, N 6. — P. 545—551.
40. *Zapolska-Downar D., Zapolska-Downar A., Bukowska H. et al.* Ibuprofen protects low density lipoproteins against oxidative modification // *Life Sci.* — 1999. — Vol. 65, N 22. — P. 2289—2303.
41. *Zuccato E., Castiglioni S., Fanelli R. et al.* Pharmaceuticals in the environment in Italy: causes, occurrence, effects and control // *Environ. Sci. Pollut. Res. Intern.* — 2006. — Vol. 13, N 1. — P. 15—21.

<sup>1</sup> Тернопільський національний педагогічний університет

<sup>2</sup> Тернопільський державний медичний університет