

Оценка совместного влияния температурного стресса, загрязнения и паразитарной инвазии на активность ферментов антиоксидантной системы у легочного моллюска *Lymnaea stagnalis*

А. С. ХОМИЧ¹, Д. В. АКСЕНОВ-ГРИБАНОВ^{2,3}, О. А. БОДИЛОВСКАЯ¹, Ю. А. ШИРОКОВА²,
Е. П. ЩАПОВА², Ю. А. ЛУБЯГА², Ж. М. ШАТИЛИНА^{2,3}, В. А. ЕМШАНОВА², А. П. ГОЛУБЕВ¹

¹ Международный государственный экологический институт им. А. Д. Сахарова
Белорусского государственного университета
220070, Минск, ул. Долгобродская, 23
E-mail: andy3331@mail.ru

² Научно-исследовательский институт биологии
Иркутского государственного университета
664003, Иркутск, ул. Ленина, 3
E-mail: denis.axengri@gmail.com

³ Байкальский исследовательский центр
664003, Иркутск, ул. Ленина, 21
E-mail: brc@contact@gmail.com

Статья поступила 18.03.2016

Принята к печати 12.09.2016

АННОТАЦИЯ

Проведен многофакторный анализ совместного воздействия загрязнения водоема, паразитарной инвазии и экспериментальной гипертермии на активность ферментов антиоксидантной системы (пероксидазы, каталазы и глутатион-S-трансферазы) у легочного моллюска *Lymnaea stagnalis* из чистого оз. Нарочь и загрязненного Чижовского водохранилища Республики Беларусь.

Установлено, что на активность пероксидазы наибольшее влияние оказывает одновременное воздействие паразитарной инвазии и загрязнения водоема, а также и паразитарной инвазии, сопряженной с экспериментальной гипертермией. Показано, что совместное воздействие паразитарной инвазии и загрязнения водоема влияет на активность каталазы. В то же время взаимосвязи между исследуемыми факторами и активностью фермента глутатион-S-трансферазы не выявлено. Обнаружено отсутствие взаимного влияния трех изученных факторов на активность исследованных ферментов.

Ключевые слова: пероксидаза, глутатион-S-трансфераза, каталаза, антропогенная нагрузка, паразитарная инвазия, трематоды, стресс, *L. stagnalis*.

Любая водная экосистема обладает сложным набором лабильных биологических связей, которые нарушаются под воздействием антропогенных факторов. В первую очередь это касается пресноводных экосистем, поскольку именно благодаря своей значимости

в жизнедеятельности человека, пресные водоемы чаще всего попадают в сферу промышленного освоения. В результате именно на пресные водоемы оказывается наибольшая антропогенная нагрузка, зачастую носящая негативный характер [Gladyshev et al., 2001; Camargo, Alonso, 2006; Chuiko et al., 2007]. Это отрицательно отражается на состоянии биоты водоемов, в том числе состоянии сообществ пресноводных моллюсков – одной из доминирующих групп зообентоса в экосистемах континентальных водоемов умеренной зоны Евразии.

Легочный моллюск *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758) является широко распространенным видом моллюсков. Представители данного вида способны к существованию в водоемах с высокими уровнями индустриально-бытового, теплового и радиационного загрязнения [Голубев, 2014]. В связи с этим данный вид – один из видов-индикаторов для оценки последствий антропогенного загрязнения водоемов [Grosell et al., 2006; Gnatiushina et al., 2011; Teskey et al., 2012; Axenov-Gribanov et al., 2015]. Однако в большинстве подобных исследований не учитывается, что в природных водоемах *L. stagnalis* является промежуточным хозяином ряда паразитических трематод [Soldánová et al., 2010]. Попавшие в организм моллюска личинки первой свободноживущей стадии трематод (мирацидии) локализуются в пищеварительной железе (печени), где в результате партеногенетического размножения последовательно развиваются в стадии спорцисты, редии и церкария. При этом численность паразитов в организме моллюсков от стадии к стадии быстро возрастает [Haas, 2003]. Это негативно сказывается на состоянии всего организма и вызывает существенные изменения ряда важнейших физиологических и биохимических показателей [Tunholi-Alves et al., 2014; Kruukova et al., 2014].

В настоящее время предложен новый метод оценки последствий стрессового воздействия негативных факторов среды на организм, так называемый “стресс на стресс”, определяемый по уровням изменений биомаркеров у особей, адаптированных к какому-либо фактору среды при дополнительном воздействии иного экспериментального стрессово-

го фактора [Hellou, Law, 2003]. Предполагается, что такое воздействие может привести к быстрому истощению адаптивных ресурсов организма, позволяющему оценить эффекты хронического воздействия негативных факторов в природных условиях. Цель настоящего исследования – оценка совместного воздействия антропогенного загрязнения, паразитарной инвазии и экспериментальной гипертермии на активность ферментов антиоксидантной системы (пероксидазы, каталазы и глутатион-S-трансферазы) у *L. stagnalis* из относительно чистого оз. Нарочь и сильно загрязненного Чижовского водохранилища Республики Беларусь.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Гастроподы для настоящего исследования собирали в двух водоемах: оз. Нарочь, расположенном в 160 км от г. Минска (54°90,71' с. ш., 26°70,61' в. д.) и Чижовском водохранилище, расположенном в черте г. Минска (53°85,46' с. ш., 27°62,51' в. д.). Данные модельные водоемы значительно различаются по степени экологической и антропогенной нагрузке.

Чижовское водохранилище расположено на р. Свислочь на юго-восточной окраине г. Минска, вблизи выхода реки за пределы городской черты. Этот технический водоем является коллектором, собирающим ливневые стоки практически со всей территории города, а также часть коммунальных стоков и сбросных вод ряда крупных промышленных предприятий, в том числе ПО “Минскстройматериалы”, ТЭЦ-2, ТЭЦ-3, ТЭЦ-4 и др. [Камлюк и др., 2002]. По микробиологическим показателями Чижовское водохранилище относится к IV классу чистоты водоемов (“загрязненная вода”) [Бондаревич и др., 2015].

Озеро Нарочь является центральным природным элементом Национального парка “Нарочанский” и самым известным курортом Республики Беларусь. Всевозрастающая (начиная с 1950-х гг.) антропогенная и рекреационная нагрузка на озеро и его водосбор привела к значительным изменениям состояния озерной экосистемы. Трофический статус озера повысился с мезотрофного в начале 1950-х гг. до эвтрофного к середине

1970-х гг. Однако в связи с проведением в 1980-е и последующие годы мероприятий по снижению хозяйственной деятельности в водосборном бассейне озера, процесс его дальнейшего эвтрофирования оказался приостановлен. К настоящему времени трофический статус оз. Нарочь заметно снизился, а содержание в озерной воде приоритетных загрязнителей значительно ниже их предельно допустимых концентраций [Остапеня и др., 2012]. По индексу загрязнения воды, озеро в настоящее время относится к II классу чистоты (“чистая вода”).

Для выполнения поставленной выше цели в летний период из обоих водоемов отобраны половозрелые особи (высота раковины не менее 40 мм) в количестве не менее 200 шт. с каждого. Температура воды в обоих водоемах в момент отлова не превышала 20–22 °С. В Чижовском водохранилище моллюсков отбирали вблизи впадения в него канала Слепянской водной системы, а в оз. Нарочь – на участке литорали от курортного поселка Нарочь до одноименного туристического комплекса.

Моллюсков из каждого водоема доставляли в лабораторию, где их в течение двух суток содержали при комнатной температуре (20–23 °С) в отдельных емкостях при плотности 3–5 особей/л². Отсутствие гибели и высокая двигательная активность моллюсков в этот период позволяют считать, что содержание в лабораторных условиях не являлось для особей *L. stagnalis* стрессовым.

Перед экспериментом особей из обоих водоемов разделяли на две группы. Первая являлась контрольной, а вторую (опытную) подвергали острому температурному стрессу. Для проведения экспериментов животных переносили из акклимационных условий (20–23 °С) в термостатируемые аквариумы с температурой воды 35 °С и экспонировали там в течение 4 ч, что соответствует времени гибели 10 % особей. Известно, что для взрослых особей *L. stagnalis* данная температура является экстремальной [Van der Schalie, Berry, 1973; Golubev, 1995; Golubev et al., 2005]. При экспозиции в температурном диапазоне 34–36 °С у исследуемого вида наблюдается снижение физиологической активности. При этих условиях относительно слабые механические раздражители не вызывают безусловных

рефлекторных реакций у исследуемого вида. Таким образом, в данных условиях животное подвергается сильнейшему тепловому, а возможно, и болевому стрессу [Сидоров, 2003]. По окончании экспозиции у живых организмов контрольной и экспериментальной групп отбирали мышечную ткань ноги. Пробы мышечной ткани от каждой особи фиксировали в микропробирках и замораживали в жидком азоте.

После забора мышечной ткани для каждой особи проводили паразитологический анализ с применением общепринятого метода компрессии [Дороженкова, Бекиш, 2007]. Для этого фрагмент выделенной из тела моллюска пищеварительной железы раздавливали в капле воды между двумя предметными стеклами, и полученный препарат просматривали под бинокулярным микроскопом МБС-10 (увеличение ×56) для выявления наличия личиночных стадий развития трематод.

Таким образом, в контрольной и опытной группах из обоих водоемов выделены подгруппы инвазированных и неинвазированных особей. Предложенный дизайн эксперимента позволил оценить силу влияния трех факторов (загрязнение водоема, инвазированность личинками трематод и температурный стресс) на активность ключевых ферментов антиоксидантной защиты у *L. stagnalis* (табл. 1).

Активность ферментов антиоксидантной системы (пероксидазы, каталазы и глутатион-S-трансферазы) исследовали с применением спектрофотометрических методов [Nabig et al., 1974; Aebi, 1984; Drotar et al., 1985] с модификациями М. А. Тимофеева (2006, 2010). Измерения проводили на спектрофотометре Cary 50 (Varian, США) при $\lambda = 340$ нм для пероксидазы, при $\lambda = 240$ нм для каталазы и при $\lambda = 436$ нм для глутатион-S-трансферазы. Для оценки удельной активности ферментов в образцах определяли содержание суммарного белка по методу М. Бредфорд [Bradford, 1976]. Все эксперименты проведены в пяти биологических параллелях. Биохимический анализ каждой пробы проведен в трех аналитических измерениях.

Статистическую значимость различий средних значений активности ферментов проводили методом Манна – Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для дифференцированной оценки степени

Блок-схема многофакторного эксперимента по оценке воздействия различных факторов на активность ферментов антиоксидантной защиты у большого прудовика *Lymnaea stagnalis*

Фактор			Вариант эксперимента
загрязненность	инвазированность	температура	
Чистый водоем (озеро Нарочь)	Инвазированные особи	Контроль	1
		Гипертермия 4 ч	2
	Неинвазированные особи	Контроль	3
		Гипертермия 4 ч	4
Загрязненный водоем (Чижовское водохранилище)	Инвазированные особи	Контроль	5
		Гипертермия 4 ч	6
	Неинвазированные особи	Контроль	7
		Гипертермия 4 ч	8

влияния разных факторов на активность ферментов использован метод дисперсионного анализа в пакете статистических программ ANOVA. Все расчеты выполнены с использованием программы STATISTICA 8.0 [Боровиков, 2003].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Активность пероксидазы у представителей *L. stagnalis*, собранных в обоих водоемах, в мышечной ткани контрольных как инвазированных, так и неинвазированных особей между собой не отличалась (см. рисунок, а). У гастропод, отловленных в оз. Нарочь, активность пероксидазы у неинвазированных особей составила $0,40 \pm 0,1$ нКат/мг белка, а у инвазированных – $0,55 \pm 0,26$ нКат/мг. У неинвазированных гастропод Чижовского водохранилища активность фермента в контрольной группе составила $0,26 \pm 0,1$ нКат/мг белка, а у инвазированных особей – $0,36 \pm 0,16$ нКат/мг белка.

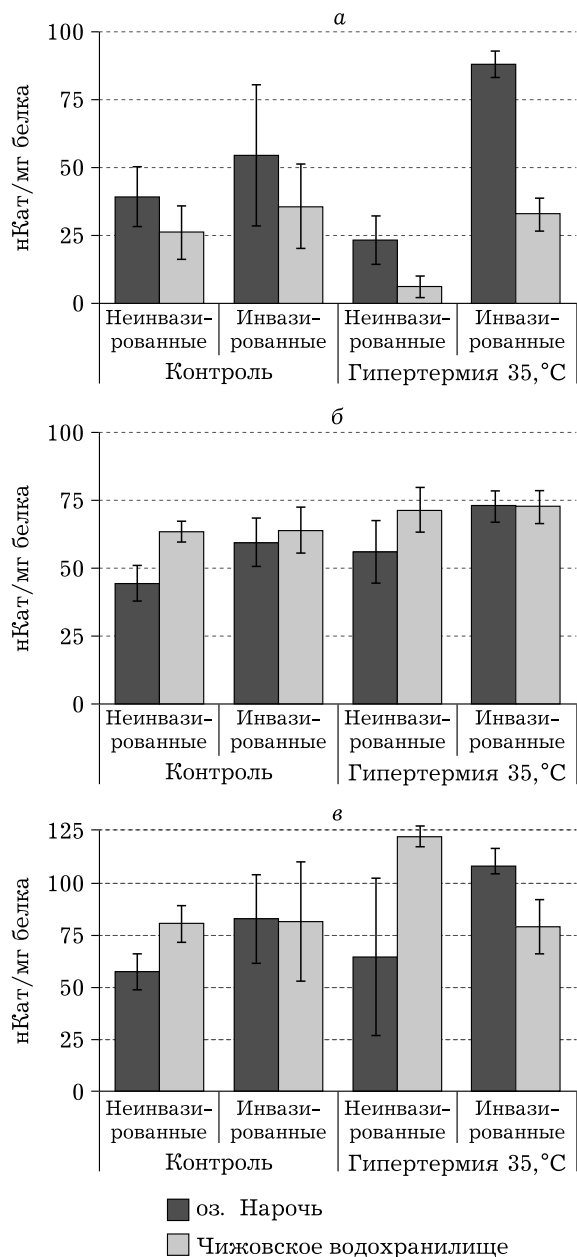
Установлено, что активность пероксидазы у обеих групп моллюсков, собранных в оз. Нарочь и экспонированных в условиях острой гипертермии, статистически значимо выше по сравнению с моллюсками из Чижовского водохранилища (см. рисунок, а). Так, активность пероксидазы у инвазированных представителей *L. stagnalis* оз. Нарочь, подвергнутых температурному стрессу, составила $0,88 \pm 0,04$ нКат/мг белка против $0,33 \pm$

$0,06$ нКат/мг у популяции моллюска Чижовского водохранилища. В случае с неинвазированными особями величина активности пероксидазы составила $0,24 \pm 0,08$ нКат/мг белка у *L. stagnalis* оз. Нарочь и $0,06 \pm 0,03$ нКат/мг у *L. stagnalis* Чижовского водохранилища.

Многофакторный дисперсионный анализ выявил статистически значимое воздействие отдельных факторов (загрязнения водоема и паразитарной инвазии) на активность пероксидазы (табл. 2). Как следует из представленных материалов, температурный стресс как самостоятельный стресс-фактор не оказал статистически значимого воздействия на изменение активности данного фермента. Однако синергический эффект взаимодействия повышенной температуры с фактором инвазированности оказался статистически значимым.

Коэффициент множественной корреляции (R^2), показывающий какую часть изменчивости исследованного параметра обуславливают факторы, учтенные в настоящей модели для активности пероксидазы, составил 0,66 (66 %). Таким образом, остальные 34 % вариативности активности этого фермента определяют факторы, не учтенные в анализируемой модели.

Активность фермента глутатион-S-трансферазы (см. рисунок, б) у представителей контрольной группы неинвазированных особей Чижовского водохранилища статистичес-



Оценка активности ферментов АОС в мышечной ткани у представителей *L. stagnalis*, обитающих в оз. Нарочь и Чижовском водохранилище, отличающихся по своей зараженности личинками трематод при температурно индуцированном стрессе (а – пероксидаза; б – глутатион-S-трансфераза; в – каталаза). Столбики – средние величины, усы – стандартное отклонение.

ки значительно превышала активность фермента у особей из оз. Нарочь. У инвазированных особей различий в активности данного фермента не наблюдали. Так, активность глутатион-S-трансферазы у неинвазированных моллюсков, отловленных в оз. Нарочь, состави-

Т а б л и ц а 2
Влияние различных факторов на активность ферментов АОС у *L. stagnalis*

Источник изменчивости	Степень свободы	Пероксидаза			Глутатион-S-трансфераза			Каталаза					
		сумма квадратов	средний квадрат	F	р	сумма квадратов	средний квадрат	F	р	сумма квадратов	средний квадрат	F	р
Общая	1	4,32	4,32	207,40	0,00	1154,56	1154,56	638,83	0,00	208 319,30	208 319,30	345,09	0,00
Водоем	1	0,50	0,50	23,78	0,00	5,86	5,86	3,24	0,08	1160,80	1160,80	1,92	0,18
Инвазия	1	0,61	0,61	29,36	0,00	4,93	4,93	2,73	0,11	331,70	331,70	0,55	0,47
Температура	1	0,00	0,00	0,06	0,80	7,56	7,56	4,18	0,05	2332,40	2332,40	3,86	0,06
Водоем · Инвазия	1	0,07	0,07	3,59	0,07	0,38	0,38	0,21	0,65	18,50	18,50	0,03	0,86
Водоем · Температура	1	0,20	0,20	9,70	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	305,50	305,50	0,51	0,48
Инвазия · Температура	1	0,05	0,05	2,28	0,14	0,06	0,06	0,03	0,86	1746,20	1746,20	2,89	0,10
Водоем · Инвазия · Температура	1	0,05	0,05	2,28	0,14	0,06	0,06	0,03	0,86	1746,20	1746,20	2,89	0,10
Ошибка	26	0,54	0,02			46,99	1,81			15 695,30	603,70		

Примечание. F – критерий Фишера; р – уровень значимости; жирный шрифт – воздействие фактора или синергический эффект от взаимодействия факторов на исследуемый параметр являются статистически значимыми.

ла $4,48 \pm 1,29$ нКат/мг белка, тогда как у инвазированных *L. stagnalis* – $5,98 \pm 1,7$ нКат/мг. У неинвазированных моллюсков, отловленных в Чижовском водохранилище, данный параметр составил $6,39 \pm 0,37$ нКат/мг белка, в то время как у инвазированных *L. stagnalis* – $6,43 \pm 1,85$ нКат/мг.

Экспозиция гастропод в условиях экспериментальной гипертермии не приводила к изменению активности глутатион-S-трансферазы во всех вариантах (см. рисунок, б). Анализируя материалы, представленные в табл. 2 коэффициент множественной корреляции активности глутатион-S-трансферазы в наших исследованиях не превысил 0,34 (34 %). Следовательно, свыше 66 % вариабельности активности данного фермента определяют факторы, не учтенные в настоящей модели.

Согласно полученным материалам, характеризующим активность каталазы, у неинвазированных особей, отловленных в оз. Нарочь, активность фермента в контрольной группе составила $57,44 \pm 8,6$ нКат/мг белка. У зараженных представителей *L. stagnalis* того же водоема она составила $82,93 \pm 21,2$ нКат/мг белка. У неинвазированных моллюсков, отловленных в Чижовском водохранилище, активность каталазы составила $80,73 \pm 8,65$ нКат/мг белка, а у инвазированных *L. stagnalis* – $81,73 \pm 28,61$ нКат/мг. Таким образом, у неинвазированных представителей *L. stagnalis*, обитающих в загрязненном Чижовском водохранилище, показана более высокая активность каталазы, чем у неинвазированных представителей *L. stagnalis*, обитающих в чистом оз. Нарочь.

Воздействие повышенной температуры в течение 4 ч привело к статистически значимому понижению активности каталазы у неинвазированных особей, отловленных в чистом оз. Нарочь по сравнению с неинвазированными особями – обитателями Чижовского водохранилища. Ее активность у неинвазированных моллюсков, отловленных в чистом оз. Нарочь, составила $64,75 \pm 37,34$ нКат/мг белка, а у неинвазированных особей Чижовского водохранилища – $122,23 \pm 4,07$ нКат/мг.

В то же время у инвазированных моллюсков популяции оз. Нарочь, подвергшихся воздействию гипертермии, наблюдали повышенную активность исследуемого фермента

($108,27 \pm 9,45$ нКат/мг белка) по сравнению с особями из Чижовского водохранилища ($79,25 \pm 13,53$ нКат/мг белка).

Многофакторный дисперсионный анализ показал (см. табл. 2), что такие факторы, как загрязнение водоемов, инвазированность и температурный стресс по отдельности не оказывают статистически значимого воздействия на активность каталазы. Из синергических эффектов только совместное влияние инвазированности и температурного стресса оказало статистически значимый эффект на активность фермента. Коэффициент множественной корреляции (R^2) для каталазы составил 0,38 (38 %). Остальные 62 % факторов, влияющих на активность фермента, не учтены в этом исследовании.

ОБСУЖДЕНИЕ

Различные стрессовые условия, такие как температура, химическое загрязнение и паразитарная инвазия оказывают прямое воздействие на физиологическое состояние водных организмов, а отклонение указанных факторов от оптимальных значений приводят к развитию оксидативного стресса. Он сопровождается увеличением продукции активных форм кислорода, а одним из защитных механизмов при таких стрессовых нагрузках выступает активация ферментов антиоксидантной защиты [Lushchak, 2011] и иных молекул, являющихся в организме биомаркерами стрессовых состояний.

Поскольку метаболизм гидробионтов зачастую зависит от температурных изменений в окружающей среде, увеличение температуры среды приводит к активации метаболизма вместе с увеличением потребления кислорода и, соответственно, к окислительному повреждению клеток и клеточных структур за счет накопления активных форм кислорода [Spees et al., 2003]. В ряде исследований показано, что повышение температуры ведет к активации ферментов антиоксидантной системы, что свидетельствует о развитии окислительного стресса и активации защитных механизмов неспецифической стресс-адаптации [Chapple, 1997; Bachtold, 2000; Abele et al., 2001; Lushchak et al., 2005].

В ходе проведенного исследования установлено, что совместное влияние загрязнения водоема, паразитарной инвазии и гипертермии оказывает статистически значимый эффект на активность пероксидазы. Совместное воздействие загрязнения и паразитарной инвазии приводит к изменению активности каталазы, тогда как на активность глутатион-S-трансферазы не влияет ни один из исследуемых факторов.

Повышенная активность пероксидазы, наблюдаемая в ходе температурного стрессового воздействия у гастропод чистого оз. Нарочь в сравнении с обитателями загрязненного Чижовского водохранилища свидетельствует о высокофункциональном адаптивном ответе, направленном на утилизацию образующихся активных форм кислорода [Troschinski et al., 2014]. Поскольку воздействие повышенной температуры (совместно с фактором инвазированности) повлияло только на активность пероксидазы и не повлияло на активность иных ферментов, это, в свою очередь, является показателем высокой чувствительности указанного фермента как биомаркера стрессового состояния приданных условиях.

По данным ряда авторов [Connors et al., 1991; Ataev, Coustau, 1999; Adema et al., 2001], клеточные реакции эктотермных организмов играют важную роль в защитных реакциях на заражение трематодами. Так, между внутренней поверхностью фиброзно-лейкоцитарной капсулы беспозвоночного и телом паразита сохраняется узкий просвет, где накапливаются цитотоксические факторы [Атаев, Молевщиков, 2004] и компоненты антиоксидантной системы, в том числе ферменты [Connors et al., 1991]. Выявленное совместное влияние загрязненности водоема и паразитарной инвазии на активность каталазы также может быть связана с интенсификацией свободнорадикальных процессов в клетке в ответ на повышенное стрессовое воздействие. Сниженная активность фермента, отмечаемая у инвазированных гастропод загрязненного водоема обуславливается истощением энергетических ресурсов клетки, например – гликогена трематодами, замедлением метаболизма моллюска и активацией иных, менее энергозатратных механизмов поддержания энергетического гомеостаза [Noshachka, Somero, 2016].

Следует отметить, что паразитарная инвазия оказывает неодинаковое воздействие на уровень активности исследованных ферментов у *L. stagnalis*, что необходимо учитывать при проведении экотоксикологических и мониторинговых исследований с особями этого вида из природных популяций. Однако уже сейчас можно с высокой долей уверенности отметить, что в ряду изученных ферментов антиоксидантной защиты пероксидаза является наиболее чувствительным биомаркером стрессовых состояний.

Работа выполнена в рамках Задания № 5.3.14 Государственной программы научных исследований Республики Беларусь “Химические технологии и материалы, природно-ресурсный потенциал”, а также при частичной финансовой поддержке проектов Минобрнауки РФ (ГЗ 1354-2014/51, 6.9654.2017), РНФ (14-14-00400), CRDF (FSCX-15-61168-0), РФФИ (14-04-00501, 15-54-04062, 16-34-60060) и ФГБОУ ВО “ИГУ”.

ЛИТЕРАТУРА

- Атаев Г. Л., Молевщиков А. В. Защитные реакции моллюсков. 1. Клеточные реакции // Паразитология. 2004. № 4. С. 342–351.
- Бондаревич Н. В., Козловский И. С., Новик Г. И. Микробиологический планктон реки Свислочь с руслом в городе Минске // Экологические проблемы промышленных городов: мат-лы 7-й Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием (Саратов, 8–10 апреля 2015 г.): тез. докл. Саратов, 2015. С. 24–26.
- Боровиков В. П. Искусство анализа данных на компьютере. СПб.: Statistica, 2003. 700 с.
- Голубев А. П. Самооплодотворение у пресноводных легочных моллюсков. Количественная оценка и адаптивное значение. Минск: Право и экономика, 2014. 222 с.
- Дороженкова Т. Е., Бекиш О. Я. Л. Способ определения видовой принадлежности церкариев птичьих трематод семейства Schistosomatidae в брюхоногих легочных моллюсках // Инструкция по применению. Минск: Министерство здравоохранения Республики Беларусь, 2007. 8 с.
- Камлюк Л. В., Семенов Г. А., Еремова Н. Г. Доминантный комплекс и сезонная динамика развития зоопланктона в водохранилищах урбанизированных территорий // Вестн. БГУ. 2002. С. 40–45.
- Остапеня А. П., Жукова Т. В., Михеева Т. М., Ковалевская Р. З., Макаревич Т. А., Жукова А. А., Лукьянова Е. В., Никитина Л. В., Макаревич О. А., Дубко Н. В., Карабанович В. С., Савич И. В., Верес Ю. К. Бентификация озерной экосистемы: причины, механизмы, возможные последствия, перспективы исследований // Тр. БГУ. 2012. № 7. С. 135–148.
- Сидоров А. В. Влияние температуры на легочное дыхание, оборонительные реакции и локомоторное поведение пресноводного легочного моллюска

- Lymnaea stagnalis* // Журн. высшей нервной деятельности. 2003. № 4. С. 513–517.
- Abele D., Tesch C., Wencke P. et al. How does oxidative stress relate to thermal tolerance in the Antarctic bivalve *Yoldia eightsi*? // Antarctic Sci. 2001. Vol. 13, N 2. P. 111–118.
- Adema C. M., Sapp K. K., Hertel L. A., Loker E. S. Immunobiology of the relationship of echinostomes with snail intermediate hosts // Echinostomes as experimental models for biological research. Kluwer Academic Publishers, 2001. P. 149–173.
- Aebi H. Catalase *in vitro* // Methods Enzymol. 1984. Vol. 105. P. 121–126.
- Ataev G. L., Coustau C. Cellular response to *Echinostomacaprioni* infection in *Biomphalaria glabrata* strains selected for susceptibility resistance // Developmental & Comparative Immunol. 1999. Vol. 23. P. 187–198.
- Axenov-Gribanov D. V., Vereshchagina K. P., Lubyaga Yu. A., Gurkov A. N., Bedulina D. S., Shatilina Zh. M., Khomich A. S., Golubev A. P., Timofeyev M. A. Stress response at the cellular and biochemical levels indicates the limitation of the environmental temperature range for Eastern Siberia populations of the common gastropod *Lymnaea stagnalis* // Malacologia. 2015. Vol. 59, N 1. P. 33–34.
- Bechtold D. A., Rush S. J., Brown I. R. Localization of the heat-shock protein Hsp70 to the synapse following hyperthermic stress in the brain // J. Neurochem. 2000. Vol. 74. P. 641–646.
- Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Analyt. Biochem. 1976. Vol. 72, N 1-2. P. 248–254.
- Camargo J. A., Alonso Á. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment // Environ. Int. 2006. Vol. 32, N 6. P. 831–849.
- Chapple J. P., Smerdon G. R., Hawkings A. J. S. Stress-70 protein induction in *Mytilus edulis*: Tissue-specific responses to elevated temperature reflect relative vulnerability and physiological function // J. Experimental Marine Biol. Ecol. 1997. Vol. 217. P. 225–235.
- Chuiko G. M., Tillitt D. E., Zajicek J. L. Chemical contamination of the Rybinsk Reservoir, northwest Russia: Relationship between liver polychlorinated biphenyls (PCB) content and health indicators in bream (*Abramis brama*) // Chemosphere. 2007. Vol. 67, N 3. P. 527–536.
- Connors V. A., Lodes M. J., Yoshin T. P. Identification of *Schistosoma mansoni* sporocyst excretory secretory antioxidant molecule and its effect on superoxide production by *Biomphalaria glabrata* hemocytes // J. Invertebrate Pathol. 1991. Vol. 58. P. 387–395.
- Drotar A., Phelps P., Fall R. Evidence for glutathione peroxidase activities in cultured plant cells. // Plant Sci. 1985. Vol. 42. P. 35–40.
- Gladyshev M. B., Gribovskaya I. V., Ivanova E. A. Metal concentrations in the ecosystem and around recreational and fish-breeding pond dugach // Water Res. 2001. Vol. 28, N 3. P. 288–296.
- Gnatishina L. L., Fal'fushinskaya G. I., Golubev A. P., Dallinger R., Stoliar O. B. Role of metallothioneins in adaptation of *Lymnaea stagnalis* (Mollusca: Pulmonata) to environment pollution // Hydrobiol. Journ. 2011. Vol. 47, N 5. P. 56–66.
- Golubev A. P. Thermoresistance and radioresistance of the population of *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda, Pulmonata) from water bodies with different types of anthropogenic pressure // Dokl. Akad. Nauk. May. 1995. Vol. 342, N 2. P. 280–283.
- Golubev A., Afonin V., Maksimova S., Androsov V. The current state of pond snail *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda, Pulmonata) populations from water reservoirs of the Chernobyl nuclear accident zone // Radioprotection. 2005. Vol. 40, N 1. P. 511–517.
- Grosell M., Gerdes R. M., Brix K. V. Chronic toxicity of lead to three freshwater invertebrates – *Brachionus calyciflorus*, *Chironomus tentans* and *Lymnaea stagnalis* // Environ. Toxicol. Chem. 2006. Vol. 25, N 1. P. 97–104.
- Haas W. Parasitic worms: strategies of host finding, recognition and invasion // Zoology. 2003. Vol. 106. P. 349–364.
- 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. P. 7130–7139.
- Hellou J., Law R. J. Stress on stress response of wild mussels, *Mytilus edulis* and *Mytilus trossulus*, as an indicator of ecosystem health // Environ. Pollution. 2003. Vol. 126, N 3. P. 407–416.
- Hochachka P. W., Somero G. N. Biochemical adaptation. Princeton Univ. Press, 2016.
- Kryukova N. A., Yurlova N. I., Rastyagenko N. M., Antonova E. V., Glupov V. V. The influence of Plagiorchis mutationis larval infection on the cellular immune response of the snail host *Lymnaea stagnalis* // J. Parasitol. 2014. Vol. 100, N 3. P. 284–287.
- Lushchak V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals // Aquatic Toxicol. 2011. N 10. P. 13–30.
- Lushchak V. I., Bagnyukova T. V., Husak V. V. et al. Hyperoxia results in transient oxidative stress and an adaptive response by antioxidant enzymes in goldfish tissues // Int. Journ. Biochem. Cell Biol. 2005. Vol. 37. P. 1670–1680.
- Soldánová M., Selbach C., Sures B., Kostadinova A., Pérez-del-Olmo A. Larval trematode communities in *Radix auricularia* and *Lymnaea stagnalis* in a reservoir system of the Ruhr River // Parasites & Vectors. 2010. Vol. 3, N 1. P. 56.
- Spees J. L., Chang S. A., Mykles D. L. et al. Molt cycle-dependent molecular chaperone and polyubiquitin gene expression in lobster // Cell Stress & Chaperones. 2003. Vol. 8, N 3. P. 258–264.
- Teskey M. L., Lukowiak K. S., Riaz H., Dalesman S., Lukowiak K. What's hot: the enhancing effects of thermal stress on long-term memory formation in *Lymnaea stagnalis* // J. Experimental Biol. 2012. Vol. 215, N 24. P. 4322–4329.
- Troschinski S., Di Lellis M. A., Sereda S., Hauffe T., Wilke T., Triebeskorn R., Kohler H. R. Intraspecific variation in cellular and biochemical heat response strategies of Mediterranean *Xeropicta derbentina* (Pulmonata, Hygromiidae) // PLoS ONE. 2014. Vol. 9 (1): e86613. doi:10.1371/journal.pone.0086613.
- Tunholi-Alves V. M., Tunholi V. M., Castro R. N., Sant'Ana L. D. O., Santos-Amaral L., de Oliveira A. P. M., Maldonado A. Activation of anaerobic metabolism in

Biomphalaria glabrata (Mollusca: Gastropoda) experimentally infected by *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda, Metastrongylidae) by high-performance liquid chromatography // Parasitol. Int. 2014. Vol. 63, N 1. P. 64–68.

Van der Schalie H, Berry E. G. Effects of temperature on growth and reproduction of aquatic snails. Office of Research and Monitoring, US Environmental Protection Agency (for sale by the Supt. of Docs., US Govt. Print Off.), 1973.

Assessment of the Joint Effect of the Thermal Stress, Pollution and Parasitic Infestation on the Activity of Antioxidative Enzymes in Pulmonate Mollusk *Lymnaea stagnalis*

A. S. KHOMICH¹, D. V. AXENOV-GRIBANOV^{2,3}, O. A. BODILOVSKAYA¹, Y. A. SHIROKOVA²,
E. P. SHCHAPOVA², Y. A. LUBYAGA², Z. M. SHATILINA^{2,3}, V. A. EMSHANOVA², A. P. GOLUBEV¹

¹ *International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University
220070, Minsk, Dolgobrodskaya str., 23
E-mail: andy3331@mail.ru*

² *Institute of Biology at Irkutsk State University
664003, Irkutsk, Lenin str., 3
E-mail: denis.axengri@gmail.com*

³ *Baikal Research Centre
664003, Irkutsk, Lenin str., 21
E-mail: brc@contact@gmail.com*

The aim of the current study was to assess synergistic effect of thermal stress, pollution and parasitic infestation on the activity of antioxidant enzymes (peroxidase, catalase, and glutathione-S-transferase) in different populations of the wide-spread species of pulmonate mollusk *Lymnaea stagnalis* distributed in the Belarus Republic water bodies.

It has been shown that the combined influence of anthropogenic effect and parasitic infestation on the one hand and experimental hyperthermia coupled with the parasitic invasion on the other hand affect the activity of peroxidase. The combined impact of parasitic infestation and contamination of the reservoir leads to the change of the catalase activity. No significant correlations between the studied factors and the activity of glutathione-S-transferase were found. The simultaneous exposure to elevated temperature, pollution and infectiousness of mollusks does not affect the activity of the studied enzymes.

Key words: peroxidase, glutathione-S-transferase, catalase, anthropogenic load, parasitic infestation, trematodes, stress, *L. stagnalis*.