

PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY / ФІЗІОЛОГІЯ ТА БІОХІМІЯ

Fisheries Science of Ukraine, 2026; 3(77): 152-171
DOI: <https://doi.org/10.61976/fsu2026.03.152>
UDC 577.121:594.381.5:574.64

Received: 30.07.2026
Received in revised form: 28.08.2026
Published: 30.09.2026

DYNAMICS OF β -CAROTENE CONTENT IN THE HEMOLYMPH AND HEPATOPANCREAS OF *LYMNAEA STAGNALIS* (LINNAEUS, 1758) UNDER CHRONIC PHENOL EXPOSURE

L. Muzyka, lidiya.muzyka@ukr.net, ORCID ID
0000-0001-7752-7853, Zhytomyr Ivan Franko
State University, Zhytomyr

G. Kyrychuk, kyrychuk@zu.edu.ua, ORCID ID
0000-0002-1059-2834, Zhytomyr Ivan Franko
State University, Zhytomyr

ДИНАМІКА ВМІСТУ β -КАРОТИНУ В ГЕМОЛІМФІ ТА ГЕПАТОПАНКРЕАСІ *LYMNAEA* *STAGNALIS* (LINNAEUS, 1758) ЗА ХРОНІЧНОЇ ДІЇ ФЕНОЛУ

Л. В. Музика, lidiya.muzyka@ukr.net, ORCID
ID 0000-0001-7752-7853, Житомирський дер-
жавний університет імені Івана Франка, м.
Житомир

Г. Є. Киричук, kyrychuk@zu.edu.ua, ORCID
ID 0000-0002-1059-2834, Житомирський дер-
жавний університет імені Івана Франка, м.
Житомир

Purpose. To establish the patterns of change in the β -carotene content in the hemolymph and hepatopancreas of *Lymnaea stagnalis* under the effect of phenol at concentrations of 0.0005, 0.002, 0.005 and 0.01 mg/dm³ at different exposure durations (2, 7, 14, and 21 days).

Methodology. The study was conducted on sexually mature, uniformly sized *L. stagnalis* (Linnaeus, 1758) mollusks. The animals were kept in phenol solutions at concentrations of 0.0005, 0.002, 0.005 and 0.01 mg/dm³ for 2, 7, 14, and 21 days. All experiments were accompanied by a control. The β -carotene content was determined spectrophotometrically in the hemolymph and in previously homogenized hepatopancreas tissues after extraction with hexane (1:4). Two-way analysis of variance (two-way ANOVA) and Tukey's post hoc test (Tukey HSD) were used for the statistical processing of the results.

Findings. Two-way analysis of variance showed a statistically significant effect of the factors "phenol concentration" and "exposure duration" as well as of their interaction on the

Мета. Встановити закономірності змін вмісту β -каротину в гемолімфі та гепатопанкреасі *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758) за дії фенолу у концентраціях 0,0005, 0,002, 0,005 та 0,01 мг/дм³ за різної тривалості експозиції (2, 7, 14 та 21 доба).

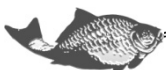
Методика. Дослідження проведено на статевозрілих однорозмірних молюсках виду *L. stagnalis*. Тварин утримували у розчинах фенолу у концентраціях 0,0005, 0,002, 0,005 та 0,01 мг/дм³ протягом 2, 7, 14 і 21 доби. Усі досліді супроводжувались контролем. Вміст β -каротину визначали спектрофотометричним методом у гемолімфі та гомогенаті гепатопанкреасу після екстракції гексаном (1:4). Для статистичної обробки результатів застосовано двофакторний дисперсійний аналіз (Two-way ANOVA) та апостеріорний тест Тьюкі (Tukey HSD).

Результати. Двофакторний дисперсійний аналіз показав статистично значущий вплив факторів «концентрація фенолу» та «тривалість експозиції», а також їхньої взаємодії на вміст β -каротину у гепатопанкре-



© The Author(s). Open access. CC BY 4.0

How to cite this article: Muzyka, L., & Kyrychuk, G. (2026). Dynamics of β -carotene content in the hemolymph and hepatopancreas of *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758) under chronic phenol exposure. *Fisheries Science of Ukraine*, 3, 152-171. <https://doi.org/10.61976/fsu2026.03.152>



β -carotene content in the hepatopancreas ($p < 0.001$) and hemolymph ($p < 0.001$) of the mollusks studied, which indicates the nonlinear and time-dependent nature of the response of the carotenoid system. In the hepatopancreas of *L. stagnalis*, at the early stage of exposure (2 days) under the effect of phenol at a concentration of 0.0005 and 0.005 mg/dm³, the β -carotene content decreased significantly, by 42.4–46.8% ($p < 0.001$ –0.01), whereas prolongation of the exposure to 21 days was accompanied by an increase in this parameter by 31.2–51.5% ($p < 0.01$ –0.05), which indicates a reorganization of carotenoid metabolism under conditions of prolonged toxic effect. In the hemolymph of the mollusks studied, the changes were more variable; however, on day 21 of exposure, the effect of phenol, irrespective of the concentration, caused an increase in the β -carotene content by 15.83–46.95% relative to the control ($p < 0.01$ –0.05).

Originality. The temporal and tissue-specific dynamics of β -carotene content in the hemolymph and hepatopancreas of *Lymnaea stagnalis* under chronic phenol exposure within the concentration range of 0.0005–0.01 mg/dm³ were established, and the pattern of these changes was shown to depend on the combined effects of phenol concentration and exposure duration.

Practical Value. The results obtained expand current understanding of the reorganization of carotenoid metabolism in freshwater mollusks under conditions of phenol intoxication and substantiate the potential of using β -carotene as a biochemical marker of phenol pollution in the ecotoxicological monitoring of freshwater ecosystems.

Keywords: freshwater mollusks, aquatic bioresources, aquatic toxicology, carotenoids, ecotoxicological monitoring.

PROBLEM STATEMENT AND ANALYSIS OF LAST ACHIEVEMENTS AND PUBLICATIONS

Freshwater mollusks are an important component of the bioresources of inland water bodies and play a significant role in the functioning of natural and artificial aquatic ecosystems. They participate in the transformation of organic matter,

асі ($p < 0,001$) та гемолімфі ($p < 0,001$) досліджуваних молюсків, що свідчить про нелінійний і часозалежний характер відповіді каротиноїдної системи. У гепатопанкреасі *L. stagnalis* на ранньому етапі експозиції (2 доби) за дії фенолу у концентраціях 0,0005 та 0,005 мг/дм³ вміст β -каротину достовірно зменшувався на 42,4–46,8 % ($p < 0,001$ –0,01), тоді як пролонгація впливу до 21 доби супроводжувалася зростанням показників на 31,2–51,5 % ($p < 0,01$ –0,05), що свідчить про перебудову каротиноїдного обміну за умов тривалого токсичного навантаження. У гемолімфі зміни були більш варіабельними, однак на 21 добу експозиції дія фенолу незалежно від концентрації зумовлювала збільшення вмісту β -каротину на 15,83–46,95 % щодо контролю ($p < 0,01$ –0,05).

Наукова новизна. Встановлено особливості часової та тканинно-специфічної динаміки вмісту β -каротину в гемолімфі та гепатопанкреасі *L. stagnalis* за хронічної дії фенолу у діапазоні концентрацій 0,0005–0,01 мг/дм³ та показано залежність характеру цих змін від поєднаної дії концентрації фенолу і тривалості експозиції.

Практична значущість. Отримані результати розширюють сучасні уявлення про перебудову каротиноїдного обміну у прісноводних молюсків за умов фенольної інтоксикації та обґрунтовують перспективність використання β -каротину як потенційного біохімічного маркера фенольного забруднення під час екотоксикологічного моніторингу прісноводних екосистем.

Ключові слова: прісноводні молюски, водні біоресурси, водна токсикологія, каротиноїди, екотоксикологічний моніторинг.

ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМИ ТА АНАЛІЗ ОСТАННІХ ДОСЛІДЖЕНЬ І ПУБЛІКАЦІЙ

Прісноводні молюски є важливим компонентом біоресурсів внутрішніх вод і відіграють істотну роль у функціонуванні природних та штучних водних екосистем. Вони беруть участь у трансформації органічної речовини, колообігу біогенних елементів, процесах біоло-



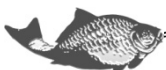
the circulation of biogenic elements, the processes of biological self-purification of water bodies, and also form the prey base for many species of commercial and non-commercial fish, influencing the biological productivity of fishery water bodies [1–3]. Due to their sedentary lifestyle, high population size, ability to accumulate pollutants, and relative tolerance to changes in environmental conditions, freshwater mollusks are widely used as effective biomonitors, bioindicators, and test organisms in ecotoxicological studies [4–6]. Disturbance of the physiological and biochemical state of these animals due to the action of xenobiotics can negatively affect not only the viability of their populations, but also the functioning of food chains, the state of the prey base of ichthyofauna, and the biological productivity of fishery water bodies [2–4]. In this regard, the study of early physiological and biochemical reactions of mollusks to the action of toxicants is of great importance for assessing the ecological state of water bodies, predicting the consequences of anthropogenic pollution of aquatic ecosystems, and determining the degree of stability and bioproduktive potential of aquatic bioresources.

Among the wide range of organic pollutants, phenolic compounds pose a particular danger to aquatic ecosystems, the constant influx of which with wastewater from petrochemical, coke, woodworking, pharmaceutical, and pulp and paper industries causes chronic pollution of surface water bodies even at relatively low concentrations [7–9]. In surface waters, phenolic compounds are found at a wide range of concentrations – from submicrogram values to tens and hundreds of milligrams per dm³, which reflects the different levels of anthropogenic load, the diversity of their sources of supply, and the intensity of natural degradation processes [9].

Phenol is characterized by high solubility in water, relative chemical stability in

гічного самоочищення водойм, а також формують кормову базу багатьох видів промислових і непромислових риб, впливаючи на біологічну продуктивність рибогосподарських водойм [1–3]. Завдяки малорухливому способу життя, високій чисельності популяцій, здатності акумулювати забруднювальні речовини та відносній толерантності до змін умов середовища прісноводні молюски широко використовуються як ефективні біомонітори, біоіндикатори та тест-організми в екотоксикологічних дослідженнях [4–6]. Порушення фізіолого-біохімічного стану цих тварин за дії ксенобіотиків може негативно позначатися не лише на життєздатності їхніх популяцій, а й на функціонуванні ланцюгів живлення, стані кормової бази іхтіофауни та біологічній продуктивності рибогосподарських водойм [2–4]. У зв'язку з цим, дослідження ранніх фізіолого-біохімічних реакцій молюсків на дію токсикантів має важливе значення для оцінювання екологічного стану водойм, прогнозування наслідків антропогенного забруднення водних екосистем і визначення ступеня стійкості та біопродуктивного потенціалу водних біоресурсів.

Серед широкого спектра органічних забрудників особливу небезпеку для водних екосистем становлять фенольні сполуки, постійне надходження яких зі стічними водами підприємств нафтохімічної, коксохімічної, деревообробної, фармацевтичної та целюлозно-паперової промисловості зумовлює хронічне забруднення поверхневих водойм, навіть за відносно низьких рівнів концентрації [7–9]. У поверхневих водах фенольні сполуки виявляються у широкому діапазоні концентрації — від субмікрограмових значень до десятків і сотень міліграмів на дм³, що відображає різний рівень антропогенного навантаження, різноманітність джерел їх надходження та інтенсивність процесів природної деградації [9].



the aquatic environment, and the ability to easily be involved in the metabolic processes of aquatic organisms due to rapid penetration into tissues, which creates the risk of developing its chronic sublethal effects [8–11]. Under conditions of chronic exposure to even low concentrations of phenol, animals develop persistent biochemical changes that precede the development of morphological damage and a decrease in the reproductive potential of populations. Due to its significant reactivity, phenol participates in numerous redox processes and exhibits pronounced toxicity, which causes an imbalance in the prooxidant-antioxidant system, intensification of the formation of reactive oxygen species and the development of oxidative stress [12–14]. In addition, phenol and its derivatives can serve as specific metabolic inhibitors, as they are able to inhibit enzyme activity, adenosine triphosphate (ATP) synthesis, uncouple oxidation and phosphorylation processes, and cause the development of hepatotoxic, mutagenic, and carcinogenic effects in the body [11, 15].

In modern ecotoxicology, a system of early biomarkers is widely used, which capable of detecting disturbances in cellular metabolism before lethal effects occur. The most informative indicators include components of the antioxidant system, in particular, low-molecular-weight antioxidants, detoxification enzymes, lipid peroxidation products, and pigment metabolites [16–18]. One of the important components of the nonspecific antioxidant system (ns-AOS) are carotenoids, in particular β -carotene, which are able to neutralize reactive oxygen species, stabilize biomembranes, exhibit provitamin A activity, stimulate the immune response, and participate in the regulation of signaling pathways that mediate cellular stress [17, 19–21].

Фенол характеризується високою розчинністю у воді, відносною хімічною стабільністю у водному середовищі та здатністю легко залучатися до метаболічних процесів гідробіонтів через швидке проникнення в тканини, що створює ризик розвитку його хронічної сублетальної дії [8–11]. За умов хронічного впливу навіть низьких концентрацій фенолу у тварин формуються стійкі біохімічні зміни, які передують розвитку морфологічних ушкоджень і зниженню репродуктивного потенціалу популяцій. Завдяки значній реакційній здатності фенол бере участь у численних окисно-відновних процесах і виявляє виражену токсичність, що зумовлює дисбаланс прооксидантно-антиоксидантної системи, інтенсифікацію утворення активних форм кисню та розвиток оксидативного стресу [12–14]. Окрім цього, фенол і його похідні можуть слугувати специфічними метаболічними інгібіторами, адже здатні пригнічувати активність ензимів, синтез АТФ, роз'єднувати процеси окиснення і фосфорилування та викликати розвиток гепатотоксичних, мутагенних та канцерогенних ефектів в організмі [11, 15].

У сучасній екотоксикології широко використовується система ранніх біомаркерів, здатних фіксувати порушення клітинного метаболізму до появи летальних ефектів. До найінформативніших показників належать компоненти антиоксидантної системи, зокрема, низькомолекулярні антиоксиданти, ензими детоксикації, продукти перекисного окиснення ліпідів та пігментні метаболіти [16–18]. Одним із важливих компонентів неспецифічної антиоксидантної системи (АОС) є каротиноїди, зокрема β -каротин, які здатні нейтралізувати активні форми кисню, стабілізувати біомембрани, проявляти провітамінну А-активність, стимулювати імунну відповідь та брати участь у регуляції сигнальних шляхів, що опосередковують клітинний стрес [17, 19–21].



HIGHLIGHT OF THE EARLIER UNRESOLVED PARTS OF THE GENERAL PROBLEM. AIM OF THE STUDY

Despite a significant number of studies devoted to the toxic effects of phenol and changes in individual indicators of the antioxidant system of aquatic organisms, the dynamics of β -carotene content in various tissues and organs of freshwater mollusks remain poorly understood.

Previous studies established dose- and tissue-specific dynamics of changes in the content of β -carotene in the body of freshwater mollusks under different durations of exposure to toxicants of different chemical nature, in particular ammonium chloride, phenol, and heavy metal ions, which indicates the complex nature of the interaction between the nature of the toxicant and the physiological and biochemical state of their body [22–25]. At the same time, the patterns of the temporal dynamics of the content of β -carotene in the hepatopancreas and hemolymph of *L. stagnalis* under chronic exposure to phenol in a wide range of concentrations remain insufficiently understood. In this regard, a comparative study of the hepatopancreas as the main organ of metabolism, deposition and biotransformation of xenobiotics and hemolymph, which provides transport of substances between organs and reflects systemic changes in the body, is important. Analysis of the temporal dynamics of β -carotene in these functionally different components of the body allows deepening our understanding of the peculiarities of the tissue-specific compensatory and adaptive response of freshwater mollusks under conditions of phenol intoxication.

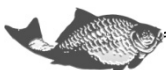
Given the above, the aim of the study was to establish the patterns of changes in the content of β -carotene in the hemolymph and hepatopancreas of *Lymnaea stagnalis* under the action of phenol at concentrations of 0.0005, 0.002, 0.005 and 0.01 mg/dm³ for different durations of exposure (2, 7, 14 and 21 days).

ВИДІЛЕННЯ НЕВИРІШЕНИХ РАНІШЕ ЧАСТИН ЗАГАЛЬНОЇ ПРОБЛЕМИ. МЕТА РОБОТИ

Незважаючи на значну кількість досліджень, присвячених токсичній дії фенолу та змінам окремих показників антиоксидантної системи гідробіонтів, особливості динаміки вмісту β -каротину у різних тканинах та органах прісноводних молюсків залишаються недостатньо вивченими.

У попередніх дослідженнях нами встановлено дозо- та тканиноспецифічну динаміку змін вмісту β -каротину в організмі прісноводних молюсків за різнотривалої дії токсикантів різної хімічної природи, зокрема хлориду амонію, фенолу та іонів важких металів, що вказує на складний характер взаємодії між природою токсиканту та фізіолого-біохімічним станом організму [22–25]. Водночас, особливості часової динаміки вмісту β -каротину у гепатопанкреасі та гемолімфі *L. stagnalis* за хронічної дії фенолу в широкому діапазоні концентрації залишаються недостатньо з'ясованими. У зв'язку з цим, актуальним є порівняльне дослідження гепатопанкреаса як основного органа метаболізму, депонування та біотрансформації ксенобіотиків і гемолімфи, яка забезпечує транспорт речовин між органами та відображає системні зміни в організмі. Аналіз часової динаміки β -каротину в цих функціонально різних компонентах організму дає змогу поглибити уявлення про особливості тканиноспецифічної компенсаторно-адаптаційної відповіді прісноводних молюсків за умов фенольної інтоксикації.

Зважаючи на викладене, метою дослідження було встановлення закономірностей змін вмісту β -каротину в гемолімфі та гепатопанкреасі *L. stagnalis* за дії фенолу у концентрації 0,0005; 0,0020; 0,0050 та 0,0100 мг/дм³ за різної тривалості експозиції (2, 7, 14 та 21 доба).



MATERIALS AND METHODS

The material for the study were 200 individuals of uniformly sized *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758) (shell height – 37.94 ± 2.04 mm; body weight – 4.78 ± 0.81 g), collected in October–November in the Teteriv River basin near the village of Dryhliv, Zhytomyr region. The toxicological study was preceded by a 14-day acclimation of animals to laboratory conditions. Phenol of analytical grade was used at concentrations of 0.0005, 0.002, 0.005 and 0.01 mg/dm³, which corresponded to 0.5; 2; 5 and 10 MPC for fisheries water bodies. The control were mollusks kept in dechlorinated tap water without the addition of toxicant. The exposure was 2, 7, 14 and 21 days. Mollusks of the control and experimental groups were kept in 10 individuals in 5-liter aquariums with aerated tap water that had been settled for 24 hours at stable temperature, pH, and dissolved oxygen content ($t = 8\text{--}20^\circ\text{C}$; $\text{pH} = 7.3\text{--}7.7$; oxygen content = $8.5\text{--}8.9$ mg/dm³). A separate aquarium was used for each experiment variant. After exposure, each individual was analyzed separately ($n = 10$). To maintain the purity of the experiment, maintain the specified phenol concentrations, and prevent the accumulation of exometabolites, the water and solutions in the aquariums were replaced with fresh water daily. Macerated cabbage leaves were used to feed the mollusks. The diet and feeding regimen were the same for all study groups.

After the appropriate exposure period, hemolymph was collected from the mollusks of the control and experimental groups by direct exsanguination, after which the animals were dissected and the hepatopancreas was removed. To exclude the influence of trematode invasion on the studied parameter, only uninfested individuals were used.

The carotenoid content was determined spectrophotometrically in terms of β -caro-

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Матеріалом для дослідження слугували 200 екз. однорозмірних *L. stagnalis* (висота черепашки — $37,94 \pm 2,04$ мм; маса тіла — $4,78 \pm 0,81$ г), зібраних у жовтні–листопаді в басейні р. Тетерів поблизу с. Дригів Житомирської області. Токсикологічному дослідженню передувала 14-добова аклімація тварин до лабораторних умов. У токсикологічних дослідженнях використовували фенол кваліфікації ч.д.а. у концентрації 0,0005; 0,0020; 0,0050 та 0,0100 мг/дм³, що відповідали 0,5; 2,0; 5,0 і 10,0 ГДК_{рибогосп}. Контролем слугували молюски, яких утримували у дехлорованій водопровідній воді без додавання токсиканту. Експозиція становила 2, 7, 14 та 21 добу. Молюсків контрольної та дослідних груп утримували по 10 екз. в акваріумах об'ємом 5 л з відстояною протягом доби аерованою водопровідною водою за стабільних температур, рН та вмісту розчиненого кисню ($t = 8\text{--}20^\circ\text{C}$; $\text{pH} = 7,3\text{--}7,7$; вміст кисню = $8,5\text{--}8,9$ мг О₂/дм³). Для кожного варіанта досліду використовували окремий акваріум. Після завершення експозиції кожну особину аналізували окремо ($n = 10$). Для дотримання чистоти експерименту, підтримання заданих рівнів концентрації фенолу та запобігання накопиченню екзометаболітів воду та розчини в акваріумах щодоби замінювали на свіжі. Для підгодівлі молюсків використовували мацероване листя капусти. Раціон та режим годівлі були однаковими для всіх досліджуваних груп.

Після завершення відповідного терміну експозиції у молюсків контрольної та дослідних груп методом прямого знекровлення відбирали гемолімфу, після чого тварин препарували й вилучали гепатопанкреас. Для виключення впливу трематодної інвазії на досліджуваний показник використовували лише неінвазованих особин.



tene. Samples of biological material were homogenized at a ratio of 1:3, after which the accompanying lipids were saponified (10 N KOH, 70 °C) and the carotenoids were extracted with hexane. The optical density of the hexane fraction was determined at a wavelength of 450 nm, using pure hexane as a blank. The calculation was performed using the specific absorption coefficient of β -carotene $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2500$. The content of carotenoids in the hepatopancreas and hemolymph was expressed in mg/g of fresh weight, normalizing the result to the weight of the corresponding sample. A total of 800 biochemical determinations were performed.

For statistical analysis of the results, the Statistica 10.0 software package was used. Given the structure of the experiment (the influence of two independent variables: the time factor and the toxicant concentration factor), a two-way analysis of variance (Two-way ANOVA) was applied. Comparative analysis of β -carotene content between the control and experimental groups at different exposure times (2, 7, 14 and 21 days) was carried out using Post-hoc analysis using the Tukey HSD test. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. Correlation analysis using Pearson's correlation coefficient (r) was used to assess the relationship between phenol concentration, exposure duration, and β -carotene content in the hepatopancreas and hemolymph.

STUDY RESULTS AND THEIR DISCUSSION

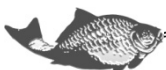
To assess the dynamics of β -carotene content in the hepatopancreas and hemolymph of *L. stagnalis* under conditions of phenol intoxication, a two-factor analysis of variance was used. A statistical-

Вміст каротиноїдів визначали спектрофотометричним методом у перерахунку на β -каротин. Зразки біологічного матеріалу гомогенізували у співвідношенні 1:3, після чого проводили омилення супутніх ліпідів (10N KOH, 70°C) та екстрагували каротиноїди гексаном. Оптичну густину гексанової фракції визначали за довжини хвилі 450 нм, використовуючи чистий гексан як холосту пробу. Розрахунок проводили з використанням питомого коефіцієнта поглинання β -каротину $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2500$. Вміст каротиноїдів у гепатопанкреасі та гемолімфі виражали у мг/г сирової маси, нормуючи результат на масу відповідної проби. Усього виконано 800 біохімічних визначень.

Для статистичного аналізу результатів використовували програмний пакет «Statistica 10.0». З огляду на структуру експерименту (вплив двох незалежних змінних: фактор часу та фактор концентрації токсиканту), застосовано двофакторний дисперсійний аналіз (Two-way ANOVA). Порівняльний аналіз вмісту β -каротину між контрольною та дослідними групами у різні терміни експозиції (2, 7, 14 та 21 доба) здійснювали з використанням Post-hoc-аналізу за критерієм Тьюкі (Tukey HSD test). Статистично достовірними вважали відмінності за $p < 0,05$. Для оцінки взаємозв'язку між концентрацією фенолу, тривалістю експозиції та вмістом β -каротину у гепатопанкреасі й гемолімфі застосовано кореляційний аналіз із використанням коефіцієнта кореляції Пірсона (r).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для оцінки динаміки вмісту β -каротину в гепатопанкреасі та гемолімфі *L. stagnalis* за умов фенольної інтоксикації застосовано двофакторний дисперсійний аналіз. Встановлено статистично



ly significant relationship between the factors “phenol concentration” and “exposure duration” was found both in the hepatopancreas ($F(12, 180) = 5.67$; $p < 0.001$) and in the hemolymph ($F(12, 180) = 8.52$; $p < 0.001$) of the studied mollusks (Fig. 1).

This indicates the phase and time-dependent nature of changes in the studied parameter, in which the effect of phenol is determined by the combined effect of its concentration and duration of exposure. The results of the post hoc analysis using the Tukey HSD test also confirmed the presence of statistically significant differences between individual experimental variants ($p < 0.05$).

It was found that after 2 days of exposure, the effect of phenol caused a decrease in the content of β -carotene in the hepatopancreas of *L. stagnalis*, the severity of which depended on the toxicant concentration (Fig. 2).

At the same time, the largest deviation from control (by 42.4–46.8% ($p < 0.001$ – 0.01)) was recorded under the action of phenol at concentrations of 0.0005 and 0.005 mg/dm³, which corresponded to 0.5 and 5 MPC.

The observed decrease in β -carotene

значущу взаємодію факторів «концентрація фенолу» та «тривалість експозиції» як у гепатопанкреасі ($F(12, 180) = 5,67$; $p < 0,001$), так і в гемолімфі ($F(12, 180) = 8,52$; $p < 0,001$) досліджуваних молюсків (рис. 1).

Це вказує на фазовий і часозалежний характер змін досліджуваного показника, за якого ефект фенолу визначається сукупною дією його концентрації та тривалості експозиції. Результати апостеріорного аналізу за критерієм Тьюкі (Tukey HSD) також підтвердили наявність статистично значущих відмінностей між окремими варіантами дослідів ($p < 0,05$).

З'ясовано, що вже через 2 доби експозиції дія фенолу викликала зниження вмісту β -каротину в гепатопанкреасі *L. stagnalis*, вираженість якого залежала від концентрації токсиканту (рис. 2).

При цьому найбільше відхилення від контролю (на 42,4–46,8% ($p < 0,001$ – $0,01$)) зафіксовано за дії фенолу в концентрації 0,0005 та 0,0050 мг/дм³, що відповідало 0,5 та 5,0 ГДК.

Виявлене зниження вмісту β -каротину може відображати його можливе залучення до неферментативної ланки

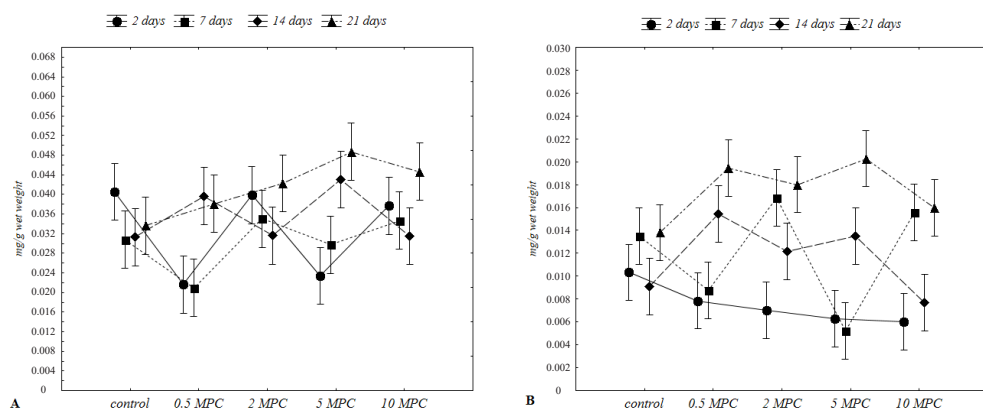


Fig. 1. Relationships of the factors “phenol concentration” and “exposure duration” on the content of β -carotene in *Lymnaea stagnalis*: A – hepatopancreas; B – hemolymph

Note. Vertical bars correspond to the 95% confidence interval (95% CI).



DYNAMICS OF β -CAROTENE CONTENT IN THE HEMOLYMPH AND HEPATOPANCREAS OF *LYMNAEA STAGNALIS* (LINNAEUS, 1758) UNDER CHRONIC PHENOL EXPOSURE

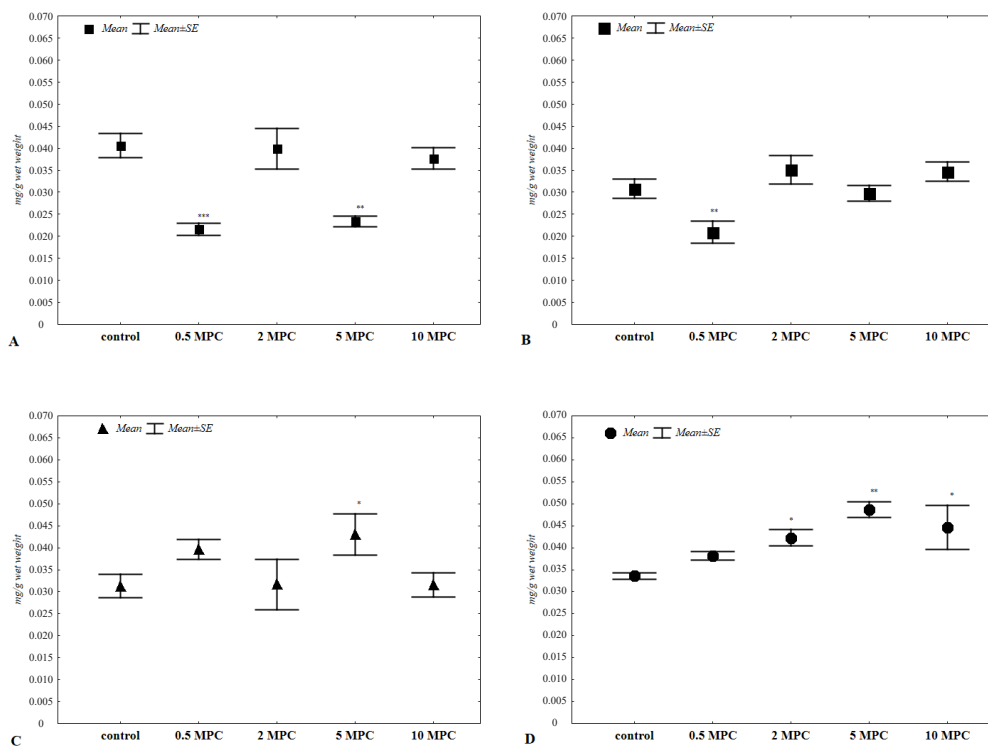


Fig. 2. Dynamics of the β -carotene content in the hepatopancreas of *Lymnaea stagnalis* under the effect of different phenol concentrations ($M \pm SE$; $n = 10$): A – 2 days; B – 7 days; C – 14 days; D – 21 days; * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$ compared with the control (Tukey HSD test)

content may reflect its possible involvement in the non-enzymatic link of antioxidant defense at the initial stage of toxic exposure. According to modern ideas, phenol is capable of inducing the formation of reactive oxygen species, therefore, the decrease in β -carotene content is probably associated with its use in the processes of neutralizing prooxidants and maintaining the structural and functional integrity of cell membranes. A similar decrease in the content of low molecular weight antioxidants is associated in the literature with the initial stages of the development of prooxidant-antioxidant imbalance [13, 14, 21]. A similar pattern has been described in the freshwater gastropod *Pomacea canaliculata*, in which the development of oxidative imbalance under the influence

антиоксидантного захисту на початковому етапі токсичного впливу. Згідно із сучасними уявленнями, фенол здатний індукувати утворення активних форм кисню, тому зменшення вмісту β -каротину, ймовірно, пов'язане з його використанням у процесах нейтралізації прооксидантів і підтримання структурно-функціональної цілісності клітинних мембран. Подібне зниження вмісту низькомолекулярних антиоксидантів у літературі пов'язують із початковими етапами розвитку прооксидантно-антиоксидантного дисбалансу [13, 14, 21]. Подібну закономірність описано у прісноводного червоного моллюска *Pomacea canaliculata*, у якого за дії неесенціальних елементів розвиток окисного дисбалансу супроводжувався спо-



of non-essential elements was accompanied by the consumption of β -carotene as a component of non-enzymatic antioxidant protection [26].

At the same time, under the action of phenol at concentrations corresponding to 2 and 10 MPC, no statistically significant changes in the content of β -carotene were detected compared to the control, which may indicate a change in the nature of the organism's reaction depending on the toxicant concentration. The lack of proportional enhancement of the effect with increasing phenol concentration indicates a non-monotonic nature of the response of the carotenoid system to toxic load.

Presumably, this pattern may be due to a change in the ratio between the processes of utilization and recovery of β -carotene at different intensities of toxic effects [27].

When the exposure duration increased to 7 days, a further decrease in β -carotene content by 32.2% ($p < 0.01$) was recorded under the effect of a subthreshold phenol concentration, however, increasing the dose load to the level of 2–10 MPC did not cause statistically significant differences between the samples. Such dynamics may indicate a partial stabilization of the parameter in individual experimental groups, while differences between experimental variants indicate a dependence of the reaction on the level of toxic load. In addition, the restoration of the parameter to the control level after its initial decrease under the action of phenol at a concentration of 0.005 mg/dm³, on the one hand, may indicate a temporary stabilization of the carotenoid pool and compensatory changes, and on the other hand, indicates a change in the body's metabolic response compared to the initial stage of intoxication.

The turning point of the experiment was the 14-day exposure of animals to a poisoned environment, during which no statistically significant differences in β -carotene content in most experimental groups were found compared to the con-

живанням β -каротину як компонента неферментативного антиоксидантного захисту [26].

Водночас, при дії фенолу за рівнів концентрації, що відповідали 2 та 10 ГДК, статистично значущих змін вмісту β -каротину порівняно з контролем не виявлено, що може свідчити про зміну характеру реакції організму залежно від концентрації токсиканту. Відсутність пропорційного посилення ефекту зі збільшенням концентрації фенолу свідчить про немонотонний характер відповіді каротиноїдної системи на токсичне навантаження.

Імовірно, така закономірність може бути зумовлена зміною співвідношення між процесами використання та відновлення β -каротину за різної інтенсивності токсичного впливу [27].

При збільшенні тривалості експозиції до 7 діб зареєстровано подальше зменшення вмісту β -каротину на 32,2% ($p < 0,01$) за дії допорогової концентрації фенолу, проте збільшення дозового навантаження до рівня 2–10 ГДК не викликало статистично достовірних відмінностей між вибірками. Така динаміка може свідчити про часткову стабілізацію показника в окремих дослідних групах, тоді як відмінності між варіантами досліду вказують на залежність реакції від рівня токсичного навантаження. Окрім цього, відновлення показника до контрольного рівня після його початкового зниження за дії фенолу в концентрації 0,0050 мг/дм³, з одного боку, може свідчити про тимчасову стабілізацію каротиноїдного пулу та компенсаторні зміни, а з іншого — вказує на зміну метаболічної відповіді організму порівняно з початковим етапом інтоксикації.

Переломним етапом експерименту стала 14-добова експозиція тварин у затруєному середовищі, за якої у більшості дослідних груп статистично зна-



trol, and a tendency to its increase was observed in some cases. The largest deviation was recorded under the action of phenol at a concentration of 0.005 mg/dm^3 (5 MPC), at which the β -carotene content exceeded the control by 37.6% ($p < 0.05$). Such dynamics may indicate a transition from the initial stress response to the compensatory-adaptive phase. Such restoration, and in some cases exceeding the control level of antioxidant components, is considered as one of the possible manifestations of adaptive restructuring during chronic toxic exposure and is discussed in the context of non-monotonic dose-time responses characteristic of hormetic effects [27].

When increasing the dose load of phenol to 0.01 mg/dm^3 , no statistically significant differences from the control were found. The changes obtained may be associated with different intensity of β -carotene involvement in metabolic and protective processes at different stages of exposure, in which at the initial stage of intoxication, the use of β -carotene in protective reactions probably prevailed, and after 14 days of exposure, a tendency was observed to restore its content, and in some groups – an increase in values relative to the control.

With an increase in the time spent by the studied animals in the poisoned environment up to 21 days, an increase in the content of β -carotene was observed in the vast majority of experimental variants. Thus, under the influence of phenol in the concentration range of $0.002\text{--}0.01 \text{ mg/dm}^3$, an increase by 31.2–51.5% ($p < 0.01\text{--}0.05$) was recorded, which may be associated with the adaptive response of the body to prolonged toxic load and, in particular, with changes in carotenoid metabolism. One possible explanation for this increase is a change in the intensity of enzymatic biotransformation of β -carotene in the hepatopancreas, an organ involved in digestion, metabolism, and nutrient deposition in mollusks. It is known that diox-

чущих відмінностей вмісту β -каротину порівняно з контролем не виявлено, а в окремих випадках спостерігалася тенденція до його підвищення. Найбільше відхилення зареєстровано за дії фенолу у концентрації $0,0050 \text{ мг/дм}^3$ (5 ГДК), за якої вміст β -каротину перевищував контрольний на 37,6% ($p < 0,05$). Така динаміка може свідчити про перехід від початкової стресової відповіді до компенсаторно-адаптаційної фази. Подібне відновлення, а в окремих випадках і перевищення контрольного рівня антиоксидантних компонентів, розглядають як один із можливих проявів адаптивної перебудови за хронічного токсичного впливу та обговорюють у контексті немонотонних дозо-часових реакцій, характерних для горметичних ефектів [27].

При збільшенні дозового навантаження фенолом до $0,0100 \text{ мг/дм}^3$ статистично достовірних відмінностей від контролю не встановлено. Отримані зміни можуть бути пов'язані з різною інтенсивністю залучення β -каротину до метаболічних і захисних процесів на різних етапах експозиції, за якої на початковому етапі інтоксикації, ймовірно, переважало використання β -каротину в захисних реакціях, а після 14 діб експозиції спостерігалася тенденція до відновлення його вмісту, а в окремих групах — збільшення показників відносно контролю.

При збільшенні часу перебування досліджуваних тварин у затруєному середовищі до 21 доби відмічено збільшення вмісту β -каротину у переважній більшості варіантів досліду. Так, за дії фенолу у діапазоні концентрації $0,0020\text{--}0,0100 \text{ мг/дм}^3$ зафіксовано зростання показника на 31,2–51,5% ($p < 0,01\text{--}0,05$), що може бути пов'язане з адаптивною відповіддю організму на тривале токсичне навантаження та, зокрема, зі змінами метаболізму каро-



ygenase enzymes play an important role in the metabolism of β -carotene, which catalyze its oxidative cleavage with the formation of retinoids [28]. Therefore, it can be assumed that under conditions of prolonged toxic exposure to phenol, a change in the activity of these enzymes may be accompanied by a slowdown in the biotransformation of β -carotene and, accordingly, its accumulation in the hepatopancreas. A likely concomitant mechanism is the development of oxidative stress, described under the action of phenol and other toxicants in aquatic organisms [18, 20]. In particular, in *L. stagnalis*, under the action of tebuconazole, a time- and concentration-dependent increase in the levels of reactive oxygen species and malondialdehyde was found against the background of a decrease in the total antioxidant capacity, which indicates a violation of the prooxidant-antioxidant balance [29]. Under such conditions, β -carotene, as a lipophilic antioxidant, is likely involved in neutralizing reactive oxygen species and maintaining the structural integrity of biomembranes, and its increased content in the hepatopancreas may reflect an enhanced antioxidant response of the organism.

Unlike the hepatopancreas, in which a consistent change in β -carotene content was observed – from initial depletion to subsequent recovery and increase in the level, the hemolymph was characterized by a more variable response, which is probably due to the functional features of the hemolymph, which provides transport of metabolites between organs, while the hepatopancreas is the main site of deposition and metabolism of carotenoids [4]. Such variability in hemolymph values clearly reflects its sensitivity to current systemic changes in the body depending on the combination of concentration and time factors.

At the initial stage of the experiment (exposure – 2 days), a decrease in the

тиноїдів. Одним із можливих пояснень такого підвищення є зміна інтенсивності ферментативної біотрансформації β -каротину в гепатопанкреасі — органі, що бере участь у травленні, метаболізмі та депонуванні поживних речовин у моллюсків. Відомо, що важливу роль у метаболізмі β -каротину відіграють ферменти діоксигенази, які каталізують його окисне розщеплення з утворенням ретиноїдів [28]. Тому можна припустити, що за умов тривалого токсичного впливу фенолу зміна активності цих ферментів може супроводжуватися уповільненням біотрансформації β -каротину та, відповідно, його накопиченням у гепатопанкреасі. Імовірним супутнім механізмом є розвиток оксидативного стресу, описаний за дії фенолу та інших токсикантів у водних організмів [18, 20]. Зокрема, у *L. stagnalis* за дії тебуконазолу встановлено часо- та концентраційнозалежне підвищення рівнів активних форм кисню та малонового діальдегіду на тлі зниження загальної антиоксидантної ємності, що свідчить про порушення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги [29]. За таких умов β -каротин як ліпофільний антиоксидант, імовірно, залучається до нейтралізації активних форм кисню та підтримання структурної цілісності біомембран, а його підвищений вміст у гепатопанкреасі може відображати посилення антиоксидантної відповіді організму.

На відміну від гепатопанкреасу, в якому простежувалася послідовна зміна вмісту β -каротину — від початкового виснаження до подальшого відновлення і підвищення рівня, гемолімфа характеризувалася більш варіабельною відповіддю, що, ймовірно, пов'язано з функціональними особливостями гемолімфи, яка забезпечує транспорт метаболітів між органами, тоді як основним місцем депонування та метаболізму каротиноїдів є гепатопанкреас [4]. Така



content of β -carotene was observed in the hemolymph of *L. stagnalis* at all tested phenol concentrations compared to the control (Fig. 3)

Under the effect of low concentrations (0.5 and 2 MPC), the content of β -carotene decreased by 24.01–32.04%, however, these changes had a trend character ($p > 0.05$), while increasing the dose load of phenol to the level of 5 and 10 MPC was accompanied by a statistically significant decrease by 39.11 and 41.94%, respectively ($p < 0.05$). The detected changes may reflect an early rearrangement of the systemic distribution of carotenoids in response to the toxic effects of phenol and are probably associated with changes in their metabolism, deposition and redistribution in the mollusk body [4, 17].

With an increase in the duration of ex-

варіабельність показників у гемолімфі чітко відображає її чутливість до поточних системних змін в організмі залежно від поєднання концентраційного та часового факторів.

На початковому етапі експерименту (експозиція — 2 доби) у гемолімфі *L. stagnalis* за всіх досліджуваних рівнів концентрації фенолу спостерігалось зниження вмісту β -каротину порівняно з контролем (рис. 3).

За дії низьких рівнів концентрації (0,5 та 2,0 ГДК) вміст β -каротину знижувався на 24,01–32,04%, однак ці зміни мали характер тенденції ($p > 0,05$), тоді як підвищення дозового навантаження фенолом до рівня 5,0 та 10,0 ГДК супроводжувалося статистично достовірним зниженням показника на 39,11 та 41,94% відповідно ($p < 0,05$). Виявле-

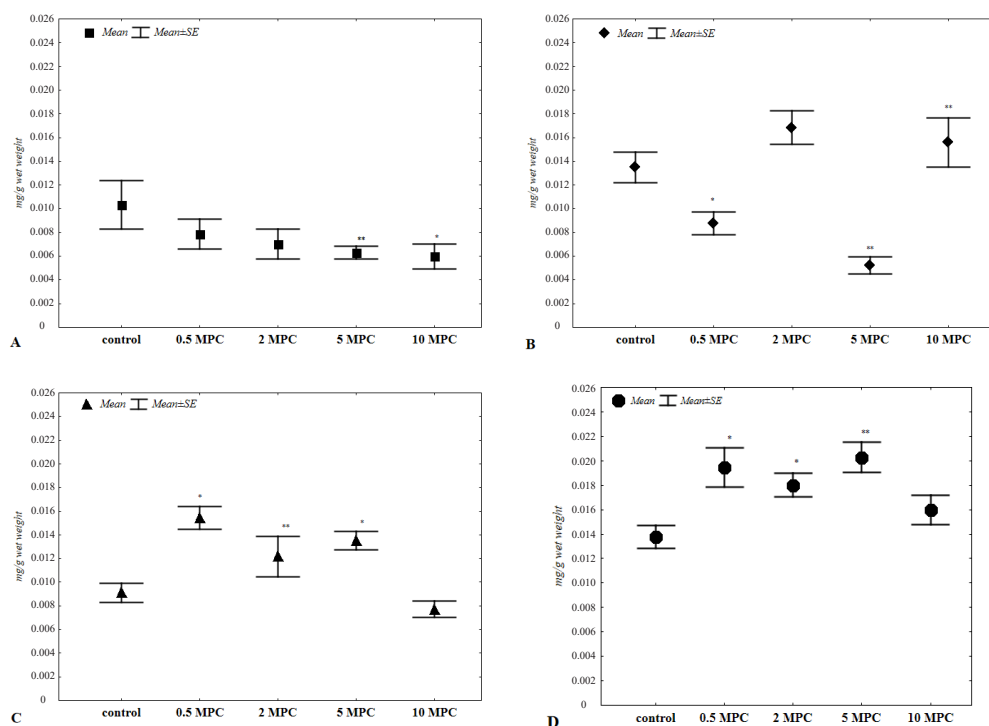
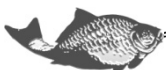


Fig. 3. Dynamics of the β -carotene content in the hemolymph of *Lymnaea stagnalis* under the effect of different phenol concentrations ($M \pm SE$; $n = 10$): A – 2 days; B – 7 days; C – 14 days; D – 21 days; * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$ compared with the control (Tukey HSD test)



posure to 7 days, the nature of the metabolic response changed, since under the action of phenol at concentrations of 0.0005 mg/dm³ and 0.005 mg/dm³, a decrease by 34.96–61.47% ($p < 0.01$ –0.05) was recorded. At the same time, the effect of the toxicant at a concentration of 0.01 mg/dm³ was accompanied by a statistically significant increase in the content of β -carotene by 15.55% ($p < 0.01$), while at a phenol concentration of 0.002 mg/dm³ there was a tendency to increase by 24.75% compared to the control ($p > 0.05$).

Presumably, such an increase may be a consequence of increased intertissue transport of carotenoids or changes in the characteristics of their metabolism under conditions of more intense toxic load. It cannot be ruled out that at high concentrations of phenol, there is a disruption of the structural and functional state of cell membranes, which may contribute to the redistribution of carotenoids between tissues and hemolymph [17, 21].

On the 14th day of exposure, the effect of phenol at concentrations of 0.0005–0.005 mg/dm³ caused an increase in the content of β -carotene in the hemolymph of *L. stagnalis* by 33.58–69.65% ($p < 0.01$ –0.05) compared to the control. An exception to the general dynamics was the tendency to decrease the carotenoid content (by 15.49%), recorded under the influence of the maximum phenol concentration used in the study (10 MPC). During the longest exposure (21 days), the content of β -carotene in the hemolymph of mollusks increased by 15.83–46.95% compared to the control. A statistically significant increase was found under the influence of phenol at concentrations of 0.0005–0.005 mg/dm³, while at a concentration of 0.01 mg/dm³ only a tendency to its increase was observed. Such dynamics may indicate the participation of hemolymph in maintaining systemic carotenoid homeostasis, which is consistent with its transport function [30].

ні зміни можуть відображати ранню перебудову системного розподілу каротиноїдів у відповідь на токсичний вплив фенолу та, ймовірно, пов'язані зі змінами їхнього метаболізму, депонування та перерозподілу в організмі молюсків [4, 17].

За збільшення тривалості експозиції до 7 діб характер метаболічної відповіді змінювався, адже за дії фенолу у концентрації 0,0005 мг/дм³ та 0,0050 мг/дм³ зафіксовано зниження показників на 34,96–61,47% ($p < 0,01$ –0,05). Водночас, вплив токсиканту в концентрації 0,0100 мг/дм³ супроводжувався статистично достовірним збільшенням вмісту β -каротину на 15,55% ($p < 0,01$), тоді як за концентрації фенолу 0,0020 мг/дм³ спостерігалася тенденція до підвищення цього показника на 24,75% порівняно з контролем ($p > 0,05$).

Імовірно, таке зростання може бути наслідком посилення міжтканинного транспорту каротиноїдів або зміни особливостей їх метаболізму за умов інтенсивнішого токсичного навантаження. Не можна також виключати, що за високих рівнів концентрації фенолу відбувається порушення структурно-функціонального стану клітинних мембран, яке може сприяти перерозподілу каротиноїдів між тканинами та гемолімфою [17, 21].

На 14 добу експозиції дія фенолу у концентрації 0,0005–0,0050 мг/дм³ викликала збільшення вмісту β -каротину у гемолімфі *L. stagnalis* на 33,58–69,65% ($p < 0,01$ –0,05) порівняно з контролем. Виняток із загальної динаміки становила тенденція до зменшення вмісту каротиноїду (на 15,49%), зафіксована за дії максимальної використаної нами концентрації фенолу (10 ГДК). За найтривалішої експозиції (21 доба) вміст β -каротину в гемолімфі молюсків збільшувався на 15,83–46,95% відносно контролю. Статистично значуще підвищення показника встановлено за дії фенолу у



Since the two-factor analysis of variance showed that the duration of exposure is one of the determining factors in the change in β -carotene content, a correlation analysis was conducted to quantitatively assess this effect. A statistically significant positive correlation was established between the duration of exposure and the content of β -carotene in the hepatopancreas and hemolymph of *L. stagnalis*. At the same time, this relationship in the hepatopancreas had a moderate strength ($r = 0.31$; $p < 0.05$), while it was more pronounced in the hemolymph ($r = 0.56$; $p < 0.05$). At the same time, correlation analysis showed a weak positive statistically significant relationship between phenol concentration and β -carotene content in the hepatopancreas ($r = 0.15$; $p < 0.05$), while no significant correlation was found in the hemolymph ($r = -0.05$; $p > 0.05$). The results obtained do not indicate the presence of a simple linear dependence of the “dose–effect” type, which may be associated with the determining effect of the duration of exposure and the development of compensatory and adaptive reactions [16, 27, 31].

It should also be taken into account that the content of carotenoids in the body of mollusks may depend on their intake with food. In this study, all experimental groups were maintained on the same feeding regimen (macerated cabbage leaves), which minimized the influence of this factor on intergroup differences, but does not allow us to completely exclude its possible contribution to the temporal dynamics of the studied indicator.

Thus, a comparative analysis of the temporal dynamics of β -carotene content showed that the hepatopancreas and hemolymph differ not only in magnitude, but also in the nature of the response to the action of phenol. In the hepatopancreas, a consistent change in the dynamics of β -carotene was observed – from its initial decrease to a further increase in its content,

концентрації 0,0005–0,0050 мг/дм³, тоді як за 0,0100 мг/дм³ спостерігалася лише тенденція до його збільшення. Така динаміка може свідчити про участь гемолімфи у підтриманні системного каротиноїдного гомеостазу, що узгоджується з її транспортною функцією [30].

Оскільки проведений двофакторний дисперсійний аналіз показав, що тривалість експозиції є одним із визначальних чинників зміни вмісту β -каротину, для кількісної оцінки цього ефекту проведено кореляційний аналіз. Встановлено статистично значущий позитивний кореляційний зв'язок між тривалістю експозиції та вмістом β -каротину у гепатопанкреасі й гемолімфі *L. stagnalis*. При цьому у гепатопанкреасі цей зв'язок мав помірну силу ($r = 0,31$; $p < 0,05$), тоді як у гемолімфі був вираженішим ($r = 0,56$; $p < 0,05$). Водночас, кореляційний аналіз виявив слабкий позитивний статистично значущий зв'язок між концентрацією фенолу та вмістом β -каротину у гепатопанкреасі ($r = 0,15$; $p < 0,05$), тоді як у гемолімфі достовірної кореляції не виявлено ($r = -0,05$; $p > 0,05$). Отримані результати не вказують на наявність простої лінійної залежності типу «доза — ефект», що може бути пов'язано з визначальним впливом тривалості експозиції та розвитком компенсаторно-адаптаційних реакцій [16, 27, 31].

Слід також враховувати, що вміст каротиноїдів в організмі молюсків може залежати від їх надходження з кормом. У цьому дослідженні всі експериментальні групи утримувалися за однакового режиму годівлі (листя мацерованої капусти), що мінімізувало вплив цього чинника на міжгрупові відмінності, проте не дає змоги повністю виключити його можливий внесок у часову динаміку досліджуваного показника.

Таким чином, порівняльний аналіз часової динаміки вмісту β -каротину показав, що гепатопанкреас і гемолімфа



while in the hemolymph, the changes were more variable and were characterized by short-term fluctuations of the indicator at intermediate stages of the experiment. Such differences are probably due to the functional specialization of the studied tissues of the body, since the hepatopancreas performs metabolic, depositional and detoxification functions, while the hemolymph provides transport of substances between organs and tissues [3]. The results obtained indicate the tissue-specific nature of the restructuring of carotenoid metabolism under conditions of chronic phenol intoxication and confirm the decisive importance of the duration of exposure in the development of this response.

CONCLUSION AND PERSPECTIVES OF FURTHER DEVELOPMENT

It was established that chronic exposure to phenol at the studied concentration range of 0.0005–0.01 mg/dm³ caused pronounced tissue-specific and time-dependent changes in the content of β -carotene in the body of *L. stagnalis*. Two-factor analysis of variance confirmed a statistically significant relationship between the factors of phenol concentration and duration of exposure ($p < 0.001$), which indicates the phase nature of the restructuring of carotenoid metabolism under conditions of chronic phenol intoxication.

Differences in the nature of the metabolic response of the studied tissues (organs) to the action of phenol were established. In the hepatopancreas, the dynamics of β -carotene was characterized by a consistent transition from initial depletion of its pool to subsequent accumulation

відрізняються не лише величиною, а й характером відповіді на дію фенолу. У гепатопанкреасі простежувалася послідовна зміна динаміки β -каротину — від його початкового зниження до подальшого підвищення вмісту, тоді як у гемолімфі зміни були варіабельнішими та характеризувалися короточасними коливаннями показника на проміжних етапах експерименту. Такі відмінності, ймовірно, зумовлені функціональною спеціалізацією досліджених тканин організму, адже гепатопанкреас виконує метаболічну, депонувальну та детоксикаційну функції, тоді як гемолімфа забезпечує транспорт речовин між органами і тканинами [30]. Отримані результати свідчать про тканиноспецифічний характер перебудови каротиноїдного обміну за умов хронічної фенольної інтоксикації та підтверджують визначальну роль тривалості експозиції у формуванні цієї відповіді.

ВИСНОВКИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШОГО РОЗВИТКУ

Встановлено, що хронічний вплив фенолу у дослідженому діапазоні концентрації (0,0005–0,0100 мг/дм³) зумовлює виражені тканиноспецифічні та часозалежні зміни вмісту β -каротину в організмі *L. stagnalis*. Двофакторний дисперсійний аналіз підтвердив статистично значущу взаємодію факторів концентрації фенолу та тривалості експозиції ($p < 0,001$), що свідчить про фазовий характер перебудови каротиноїдного обміну за умов хронічної фенольної інтоксикації.

Встановлено відмінності у характері метаболічної відповіді досліджених тканин (органів) на дію фенолу. У гепатопанкреасі динаміка β -каротину характеризувалася послідовним переходом від початкового виснаження його пулу до подальшого накопичення за тривалої експозиції, тоді як у гемолімфі зміни



with prolonged exposure, while in the hemolymph, changes were more variable and reflected its transport function in carotenoid metabolism. Correlation analysis confirmed a statistically significant positive relationship between the duration of exposure and the content of β -carotene in both the hepatopancreas ($r = 0.31$; $p < 0.05$) and hemolymph ($r = 0.56$; $p < 0.05$), which indicates the determining role of the duration of exposure in the formation of the adaptive response of the mollusk body.

The results obtained expand current understanding of the peculiarities of carotenoid metabolism restructuring under conditions of phenolic intoxication and substantiate the feasibility of using β -carotene as a potential biochemical marker of sublethal toxic load under controlled conditions during ecotoxicological monitoring of freshwater ecosystems. Given the important role of *L. stagnalis* in the functioning of aquatic ecosystems and the formation of the food base of many fish species, early detection of carotenoid metabolism disorders can be used to assess the ecological state and biological productivity of fisheries water bodies.

A promising direction for further research is a comprehensive study of tissue-specific dynamics of β -carotene in other organs and tissues of *L. stagnalis*, as well as establishing the relationship between changes in carotenoid metabolism, lipid peroxidation processes, and the activity of the enzymatic antioxidant system under conditions of prolonged exposure to phenol.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors express their gratitude to the Armed Forces of Ukraine for protection and the opportunity to continue their scientific activities.

були варіабельнішими та відображали її транспортну функцію у каротиноїдному обміні. Кореляційний аналіз підтвердив статистично значущий позитивний зв'язок між тривалістю експозиції та вмістом β -каротину як у гепатопанкреасі ($r = 0,31$; $p < 0,05$), так і в гемолімфі ($r = 0,56$; $p < 0,05$), що свідчить про визначальну роль тривалості експозиції у формуванні адаптаційної відповіді організму молюсків.

Отримані результати розширюють сучасні уявлення про особливості перебудови каротиноїдного обміну за умов фенольної інтоксикації та обґрунтовують доцільність використання β -каротину як потенційного біохімічного маркера сублетального токсичного навантаження за контрольованих умов під час екотоксикологічного моніторингу прісноводних екосистем. З огляду на важливу роль *L. stagnalis* у функціонуванні водних екосистем і формуванні кормової бази багатьох видів риб, раннє виявлення порушень каротиноїдного обміну може бути використане для оцінювання екологічного стану та біологічної продуктивності рибогосподарських водойм.

Перспективним напрямом подальших досліджень є комплексне вивчення тканиноспецифічної динаміки β -каротину в інших органах і тканинах *L. stagnalis*, а також встановлення взаємозв'язку між змінами каротиноїдного обміну, процесами пероксидного окиснення ліпідів і активністю ферментативної антиоксидантної системи за умов тривалого впливу фенолу.

ПОДЯКА

Автори висловлюють вдячність Збройним Силам України за захист і можливість продовжувати наукову діяльність.



CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest regarding the results and conclusions presented in this article.

SOURCES OF FUNDING

The study was carried out within the framework of the research work of the Department of Botany, Bioresources and Biodiversity Conservation of Ivan Franko Zhytomyr State University.

КОНФЛІКТ ІНТЕРЕСІВ

Автори заявляють про відсутність будь-якого конфлікту інтересів щодо матеріалів та результатів, викладених у цій статті.

ДЖЕРЕЛА ФІНАНСУВАННЯ

Дослідження виконано в межах науково-дослідної роботи кафедри ботаніки, біоресурсів та збереження біорізноманіття Житомирського державного університету імені Івана Франка.

REFERENCES

1. Ekelund Ugge, G. M., Jonsson, A., & Berglund, O. (2022). Molecular biomarker responses in the freshwater mussel *Anodonta anatina* exposed to an industrial wastewater effluent. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(2), 2158–2170. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15633-4>
2. Atkinson, C. L., Hopper, G. W., Kreeger, D. A., Lopez, J. W., Maine, A. N., Sansom, B. J., Schwalb, A., & Vaughn, C. C. (2023). Gains and gaps in knowledge surrounding freshwater mollusk ecosystem services. *Freshwater Mollusk Biology and Conservation*, 26(1), 20–31. <https://doi.org/10.31931/fmbc-d-22-00002>
3. Strong, E. E., Gargominy, O., Ponder, W. F., & Bouchet, P. (2008). Global diversity of gastropods (Gastropoda; Mollusca) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595(1), 149–166. <https://doi.org/10.1007/s10750-007-9012-6>
4. Panda, F., Pati, S. G., Das, K., Samanta, L., Sahoo, D. K., & Paital, B. (2022). Biochemical and molecular responses of the freshwater snail *Pila* sp. to environmental pollutants, abiotic, and biotic stressors. *Frontiers in Environmental Science*, 10, 1033049. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2022.1033049>
5. Al-Alam, J., Millet, M., Khoury, D., Rodrigues, A., Akoury, E., Tokajian, S., & Wazne, M. (2024). Biomonitoring of PAHs and PCBs in industrial, suburban, and rural areas using snails as sentinel organisms. *Environmental Science and Pollution Research*, 31(3), 4970–4984. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-31493-6>
6. Kutluyer Kocabaş, F., Göktürk Aksu, E., & Kocabaş, M. (2023). Evaluation of metal pollution related to human health risk in freshwater snail *Viviparus contectus* (Millet, 1813) as a potential bioindicator species in Lake Habitat (Turkey). *Environmental Science and Pollution Research*, 30(41), 93686–93696. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-29062-y>
7. Voloshyna, O. M., & Krupiei, K. S. (2015). Vplyv fenolu ta formaldehydu na pihmentosyntezyvalnu zdattist vodnykh mikroorhanizmiv [Influence of phenol and formaldehyde on the pigment-synthesizing ability of the microorganisms]. *Pytannia bioindykatsii ta ekolohii [Problems of bioindications and ecology]*, 20(1), 166–179.
8. Guerra, R. (2001). Ecotoxicological and chemical evaluation of phenolic compounds in industrial effluents. *Chemosphere*, 44(8), 1737–1747. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(00\)00562-2](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(00)00562-2)
9. Ramos, R. L., Moreira, V. R., & Amaral, M. C. S. (2024). Phenolic compounds in water: Review of occurrence, risk, and retention by membrane technology. *Journal of Environmental Management*, 351, 119772. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.119772>



10. Anku, W. W., Mamo, M. A., & Govender, P. P. (2017). Phenolic compounds in water: sources, reactivity, toxicity and treatment methods. *Phenolic compounds – natural sources, importance and applications*, 419–443. <https://doi.org/10.5772/66927>
11. Zeng, X., Yu, J., Zhang, S., Ni, T., & Ma, D. (2023). Ecological risk of phenol on typical biota of the northern Chinese river from an integrated probability perspective: The Hun River as an example. *Environmental Monitoring and Assessment*, 195(12), 1512. <https://doi.org/10.1007/s10661-023-12089-6>
12. Muthukumaravel, K., Priyadharshini, M., Kanagavalli, V., Vasanthi, N., Ahmed, M. S., Musthafa, M. S., ... & Ravindran, B. (2023). Impact of sublethal phenol in freshwater fish *Labeo rohita* on biochemical and haematological parameters. *Environmental Monitoring and Assessment*, 195(1), 10. <https://doi.org/10.1007/s10661-022-10554-2>
13. Muthukumaravel, K., Kanagavalli, V., Pradhoshini, K. P., Vasanthi, N., Santhanabharathi, B., Alam, L., Musthafa, M. S., & Faggio, C. (2023). Potential biomarker of phenol toxicity in freshwater fish *C. mrigala*: Serum cortisol, enzyme acetylcholine esterase and survival organ gill. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 263, 109492. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109492>
14. Chakraborty, D., Mandal, A. H., Ghosh, S., Sadhu, A., Das, D., Saha, N. C., & Saha, S. (2024). The physiological effects of acute and sub-lethal exposure to phenol on antioxidant enzyme activity in the freshwater sludge worm *Tubifex tubifex*. *Toxicology Reports*, 13, 101717. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2024.101717>
15. Gami, A. A., Shukor, M. Y., Khalil, K. A., Dahalan, F. A., Khalid, A., & Ahmad, S. A. (2014). Phenol and its toxicity. *Journal of Environmental Microbiology and Toxicology*, 2(1), 11–23. <https://doi.org/10.54987/jemat.v2i1.89>
16. Lemos, M. F. (2021). Biomarker studies in stress biology: from the gene to population, from the organism to the application. *Biology*, 10(12), 1340. <https://doi.org/10.3390/biology10121340>
17. Lim, K. C., Yusoff, F. M., Karim, M., & Natrah, F. M. I. (2023). Carotenoids modulate stress tolerance and immune responses in aquatic animals. *Reviews in Aquaculture*, 15(2), 872–894. <https://doi.org/10.1111/raq.12767>
18. Oros, A., Coatu, V., Damir, N., Danilov, D., Ristea, E., & Lazar, L. (2025). Molecular mechanisms and biomarker-based early-warning indicators of heavy metal toxicity in marine fish. *Fishes*, 10(7), 339. <https://doi.org/10.3390/fishes10070339>
19. González-Peña, M. A., Ortega-Regules, A. E., Anaya de Parrodi, C., & Lozada-Ramírez, J. D. (2023). Chemistry, occurrence, properties, applications, and encapsulation of carotenoids – a review. *Plants*, 12(2), 313. <https://doi.org/10.3390/plants12020313>
20. Terao, J. (2023). Revisiting carotenoids as dietary antioxidants for human health and disease prevention. *Food & Function*, 14(17), 7799–7824. <https://doi.org/10.1039/D3FO02330C>
21. Miazek, K., Beton, K., Śliwińska, A., & Brożek-Pluska, B. (2022). The effect of β -carotene, tocopherols and ascorbic acid as anti-oxidant molecules on human and animal *in vitro/in vivo* studies: a review of research design and analytical techniques used. *Biomolecules*, 12(8), 1087. <https://doi.org/10.3390/biom12081087>
22. Muzyka, L. V., Dmytrenko, I. M., Slidzevskiy, B. L., & Kyrychuk, H. Ye. (2014). Osoblyvosti khronichnoi dii nyzkykh kontsentratsii fenolu na vmist β -karotynu v hepatopankreasi *Lymnaea stagnalis* [Peculiarities of the chronic action of low phenol concentrations on the content of β -carotene in the hepatopancreas of *Lymnaea stagnalis*]. In *Biologichni doslidzhennia-2014: Zbirnyk naukovykh prats V Vseukrainskoi naukovo-praktychnoi konferentsii molo-dykh uchenykh i studentiv* [Biological Research 2014. Proceedings of the 5th All-Ukrainian Scientific and Practical



- Conference of Young Scientists and Students*], 246–248.
23. Kyrychuk, G. E., & Muzyka, L. V. (2015). The effect of ammonium chloride concentrations on the content of carotenoid pigments in the body of *Lymnaea stagnalis*. *Biosystems Diversity*, 23(2), 154–160. <https://doi.org/10.15421/011522>
 24. Kyrychuk, G. Ye., & Muzyka, L. V. (2016). Peculiarities of the distribution of β -carotene in the organism of *Lymnaea stagnalis* under the influence of the ions of heavy metals. *Hydrobiological Journal*, 52(5), 63–72. <https://doi.org/10.1615/HydrobJ.v52.i5.70>
 25. Kyrychuk, G. Ye., Muzyka, L. V., & Mykula, M. M. (2024). Peculiarities of low concentrations of heavy metal ions' effect on β -carotene content in *Lymnaea stagnalis*. *Hydrobiological Journal*, 60(4), 72–84. <https://doi.org/10.1615/HydrobJ.v60.i4.50>
 26. Campoy-Diaz, A. D., Malanga, G., Giraud-Billoud, M., & Vega, I. A. (2023). Changes in the oxidative status and damage by non-essential elements in the digestive gland of the gastropod *Pomacea canaliculata*. *Frontiers in Physiology*, 14, 1123977. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1123977>
 27. Calabrese, E. J., & Mattson, M. P. (2017). How does hormesis impact biology, toxicology, and medicine? *NPJ Aging and Mechanisms of Disease*, 3(1), 13. <https://doi.org/10.1038/s41514-017-0013-z>
 28. Harrison, P. J., & Bugg, T. D. (2014). Enzymology of the carotenoid cleavage dioxygenases: reaction mechanisms, inhibition and biochemical roles. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 544, 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.10.005>
 29. Somuncu, S., Atmaca, H., & Ilhan, S. (2024). Effects of acute exposure to environmentally realistic tebuconazole concentrations on stress responses of kidney and digestive gland of *Lymnaea stagnalis*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 105, 104352. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2023.104352>
 30. Boisseaux, P., Delignette-Muller, M. L., Abbaci, K., Thomas, H., & Garric, J. (2016). Analysis of hemocytes in *Lymnaea stagnalis*: characterization and effects of repeated hemolymph collections. *Fish & Shellfish Immunology*, 57, 116–126. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.08.007>
 31. Livingstone, D. R. (2001). Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin*, 42(8), 656–666. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(01\)00060-1](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(01)00060-1)

