

Міністерство освіти і науки України
Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира
Гнатюка

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

ХОМА ВІРА ВЯЧЕСЛАВІВНА

УДК : 577.352.38:577.64

ДИСЕРТАЦІЯ
ВЛАСТИВОСТІ МЕТАЛОТІОНЕЇНІВ ДВОСТУЛКОВОГО МОЛЮСКА
ЗА ВПЛИВУ НА ОРГАНІЗМ СТРЕСОРНИХ ЧИННИКІВ ХРОНІЧНОЇ ТА
КОРОТКОТРИВАЛОЇ ДІЇ

091 – Біологія
09 – Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело
_____ В.В. Хома

Науковий керівник (консультант): доктор біологічних наук, професор **Столяр
Оксана Борисівна**

Тернопіль 2022

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	21
ВСТУП.....	22
РОЗДІЛ I ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	28
1.1. Поліфункціональні протеїни металотіонеїни двостулкових моллюсків та їх роль у діагностиці токсичності водного середовища.....	28
<i>1.1.1. Структура та властивості</i>	<i>28</i>
<i>1.1.2. Регуляція експресії.....</i>	<i>31</i>
<i>1.1.3. Роль металотіонеїнів у гомеостазі та детоксикації металів</i>	<i>35</i>
<i>1.1.4. Окисно-відновний стан та участь у антиоксидантному захисті</i>	<i>38</i>
1.2. Біохімічні реакції водних організмів на вплив новітніх ксенобіотиків	40
РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.....	52
2.1. Відбір експериментальних груп тварин	52
2.2. Виділення та аналіз металотіонеїнів	56
<i>2.2.1. Виділення металотіонеїнів як термостабільних протеїнів.....</i>	<i>56</i>
<i>2.2.2. Визначення за вмістом тіолів</i>	<i>57</i>
<i>2.2.3. Визначення вмісту металів у металотіонеїнах та тканині.....</i>	<i>58</i>
<i>2.2.4. Електрофорез металотіонеїнів в поліактиламідному гелі.</i>	<i>58</i>
2.3. Визначення вмісту глутатіону	59
2.4. Оцінка стану системи антиоксидантного захисту	60
<i>2.4.1. Супероксиддисмутазна активність</i>	<i>60</i>
<i>2.4.2. Активність каталази.....</i>	<i>61</i>
<i>2.4.3. Загальна антиоксидантна активність</i>	<i>61</i>
<i>2.4.4. Утворенні продуктів окисного ураження ліпідів та протеїнів</i>	<i>62</i>

2.5. Визначення показників токсичності.....	63
2.5.1. Характеристика стабільності лізосомальних мембран	63
2.5.2. Активність катепсину Д	63
2.5.3. Активність каспази-3	64
2.6. Вміст протеїну	65
2.7. Статистичні методи аналізу результатів дослідження	65
РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	67
3.1. Умови хроматографічного виділення металотіонеїнів з гомогенату травної залози двостулкового молюска	67
3.1.1. Умови елюювання металотіонеїнів методом гель-розподільної хроматографії.....	67
3.1.2 Вплив компонентів елюенту на склад металів у металотіонеїн-вмісній фракції	70
3.2. Функціональні характеристики металотіонеїнів <i>U. tumidus</i> за впливу на організм ксенобіотиків при різних температурних режимах у субхронічній експозиції.....	72
3.2.1. Реакція металотіонеїнів за впливу на організм диклофенаку, ніфедипіну та Раундапу поокремо та у суміші за двох температурних режимів.....	72
3.2.2. Реакція металотіонеїнів за впливу на організм хлорпромазину та Раундапу поокремо та у суміші	79
3.3. Особливості стану системи антиоксидантного захисту та прояви окисного ураження молюска <i>U. tumidus</i> за впливу на організм ксенобіотиків при різних температурних режимах	84
3.3.1. Вплив диклофенаку, ніфедипіну та Раундапу поокремо та у суміші за двох температурних режимів на параметри системи антиоксидантного захисту та прояви окисного стресу.....	84

3.3.2. Вплив хлорпромазину та Раундапу поокремо та у суміші на параметри системи антиоксидантного захисту та прояви окисного ураження.	89
3.4. Оцінка токсичності середовища за субхронічного впливу на організм молюска ксенобіотиків при різних температурних режимах	95
3.4.1. Вплив диклофенаку, ніфедипіну та Раундапу поокремо та у суміші за двох температурних режимів на показники токсичності.....	95
3.4.2. Вплив хлорпромазину та Раундапу поокремо та у суміші на показники токсичності	99
3.5. Вплив хелаторів металів на цинк-депонувальні властивості та систему антиоксидантного захисту у травній залозі <i>U. tumidus</i> у експерименті <i>ex vivo</i>	102
3.5.1. Хроматографічна поведінка металотіонеїнів та їх металдепонувальна функція.....	102
3.5.2. Параметри системи антиоксидантного захисту та прояви окисного ураження	106
3.5.3. Активність апоптозу та ознаки цитотоксичності	107
РОЗДІЛ IV. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	110
ВИСНОВКИ	128
ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ:	131

АНОТАЦІЯ

Хома В. В. Властивості металотіонеїнів двостулкового моллюска за впливу на організм стресорних чинників хронічної та короткотривалої дії – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії 091 “Біологія” (09 – Біологія). – Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка. – Тернопіль, 2022.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню особливостей металдепонувальних властивостей та антиоксидантного потенціалу металотіонеїнів двостулкового моллюска *Unio tumidus* за субхронічного та короткотривалого впливу ксенобіотиків з метал-хелатуючими властивостями.

У сучасному складі забруднювачів водного середовища пріоритетними визнаються «мікроорганічні забруднювачі», до яких належать речовини побутового та сільськогосподарського походження, зокрема фармацевтичні препарати, засоби особистого вжитку, відходи сільського господарства. Їх біологічна небезпека у водоймах ускладнюється непрогнозованою поведінкою їх поєднання, особливо, за кліматичних змін. Відтак, прогноз реальних загроз для біоти комбінованого забруднення водойм повинен ґрунтуватися на застосуванні адекватних експериментальних схем та чутливих і специфічних молекулярних мішеней, критично задіяних у біологічній активності ксенобіотиків.

Двостулкові моллюски є визнаними біоіндикаторами стану водойм, завдяки фільтруючому способу харчування та осілому способу існування. Проте дослідження впливу на них токсикантів водного середовища зосереджено переважно на експериментах з використання окремих ксенобіотиків у високих концентраціях.

З’являється дедалі більше аргументів щодо залучення есенціальних металів, зокрема цинку, у реакції стресу та детоксикації. Метаболізм та розподіл цинку у клітинах забезпечується функціонуванням цинк-депонувальних протеїнів та метал-транспортних систем. Металотіонеїни (МТ) –

це універсальні у тваринному світі метал-депонувальні протеїни, до складу яких входить близько 30% цистеїну. Традиційно МТ вважають біомаркерами забруднення токсичними металами. Разом з тим, ці індукбельні тіоли володіють антиоксидантним потенціалом.

Гербіцид Раундап (комерційна форма гліфосату) та фармацевтичні препарати ніфедипіну, диклофенаку, хлорпромазину є одними із найпоширеніших забруднювачів водойм. Важливо, що кожен з них, окрім специфічних цільових ефектів, здатний впливати на гомеостаз металів безпосередньо у організмах чи довкіллі, хелатуючи їх та/або регулюючи метал-транспортні канали.

Тому у дисертаційному дослідженні ми використали ці модельні ксенобіотики для з'ясування особливостей функціонування МТ у наближених до екологічно реальних умов існування двостулкового молюска *U. tumidus*. Для цього молюсків впродовж 14 днів піддавали впливу диклофенаку (Dc, 600 нг/л), ніфедипіну (Nf, 700 нг/л), Раундапу (Rn, 33,8 мкг/л, що відповідає ~80 нМ гліфосату) окремо при 18 °C та спільно при 18 °C (Mіx) та 25 °C (MіxT), а також Раундапу (Rn, 16,9 мкг/л, що відповідає ~40 нМ гліфосату) при температурах 18 °C та при 25°C (RnT), хлорпромазину (Cpz, 18,0 мкг/л) та суміші Раундапу і хлорпромазину при 18 °C (RnCpz). Концентрації ксенобіотиків відповідали їх вмісту у прісних водоймах та, для Раундапу, 0,5 та 1,0 розрахованої концентрації, яка не дає ефекту (PNEC). Температурний режим 25 °C відповідав встановленим показникам для басейну р. Дністер у літній час. Для з'ясування механізму впливу Раундапу на гомеостаз цинку порівнювали його дію з впливом хелатора цинку N,N,N',N'-тетракіс(2-піридилметил)етилендіаміну (ТПЕНу) у моделі *ex vivo*, у якій зразки травної залози перлівниці піддавали дії Раундапу, ZnCl₂, ТПЕНу та їх комбінацій ZnТПЕН або ZnRn у концентрації 3 мкМ.

Згідно аналізу спектру в ультрафіолетовій ділянці (УФ-спектр) та вмісту металів у складі елюату визначено, що необхідною умовою для виділення МТ методом гель-розподільної хроматографії та забезпечення оптимального вмісту

цинку є відсутність консерванту азиду натрію у гелі та використання тіолозахисного агента меркаптоетанолу.

Вплив 40 та 80 нМ Раундапу та фармацевтичних препаратів диклофенаку, ніфедипіну та хлорпромазину на організм *U. tumidus* протягом 14 діб поокремо та у суміші за двох температурних режимів продемонстрував, що 80 нМ Раундапу (особливо, на 43 %), а також диклофенак, ніфедипін та суміш цих ксенобіотиків при тепловій дії викликають зростання вмісту MT-SH на 26-57,8% порівняно з контролем та дисбаланс вмісту MT-SH/MT-Me, що свідчить про збільшення антиоксидантного потенціалу MT та одночасне зниження їх здатності зв'язувати метали. Змінюється і співвідношення металів у складі MT із зростанням частки купруму та/або кадмію. У всіх групах молюсків за впливу 80 нМ Раундапу, окремо, або у комбінації, зростає вміст недепонованих у MT купруму та кадмію у тканині та зменшується співвідношення Zn/Cu. Диклофенак викликав зростання вмісту недепонованого цинку, який, проте, нівелювався за комплексного впливу. Відтак, за впливу на організм 80 нМ Раундапу окремо та у поєднанні з фармацевтичними препаратами, особливо за підвищеної температури, проявляється домінуюча дія Раундапу як дестабілізатора вмісту та співвідношення цинку у клітинах травної залози молюска.

Дослідження впливу на організм 40 нМ Раундапу окремо та у комбінації з хлорпромазином або за підвищеної температури виявило зростання концентрації MT-SH відповідно на 33,6 - 57,7 %, тоді як хлорпромазин не змінював його. Разом з тим, рівень цинку у MT зростав у всіх дослідних групах, найбільше за впливу Раундапу при підвищеній температурі та хлорпромазину, а вміст цинку в тканині суттєво зменшився (на 15,9 та 24,6% відповідно). Відтак, дослідження вмісту MT та балансу його метальованої форми стосовно загального вмісту MT та вмісту цинку у тканині виявило залежні від природи та концентрації (для Раундапу) ксенобіотика зміни цих показників.

Оцінка антиоксидантного потенціалу MT показала, що дія на організм 80 нМ Раундапу окремо та у поєднанні, а також диклофенаку та ніфедипіну

викликає пригнічення активності супероксиддисмутази (СОД), (за виключенням дії суміші при підвищеній температурі, яка активує СОД), зростання вмісту окисненого глутатіону (GSSG), а в суміші – і відновленого глутатіону (GSH), що проявляється як зниження редокс-індексу GSH у всіх групах (максимально на 26%) крім групи МіхТ. У всіх групах цієї серії зростає утворення продуктів перекисного окиснення ліпідів (ТБК-АП) та окисних модифікацій протеїнів (ОМП). Концентрація 40 нМ Раундапу навпаки, активує СОД та загальну антиоксидантну активність, не змінює порівняно з контролем вміст та редокс індекс GSH, а у поєднанні з хлорпромазином чи підвищеною температурою викликає посилення загальної антиоксидантної активності, вмісту та редокс-індексу GSH. Разом з тим, у всіх дослідних групах зростає утворення ТБК-АП (на 7,0-16,3%) та окисних модифікацій протеїнів (на 13,2-32,5%) (крім Rn-групи) порівняно з контролем. Вплив хлорпромазину вирізняється пригніченням каталазної активності. Відтак, Раундап, залежно від концентрації та поєднання з іншими факторами середовища, проявляє прооксидантний (80 нМ) або антиоксидантний (40 нМ) вплив, причому прооксидантний ефект посилюється у комбінованих експозиціях, особливо за підвищеної температури, та нівелює специфічний вплив фармацевтичних препаратів на цинк-залежні характеристики. Обчислення інтегральних індексів (Антиоксидантно-прооксидантний баланс (АПБ) та Інтегральний індекс біомаркерних реакцій (IBR)) засвідчило, що стан системи антиоксидантного захисту визначається переважно реакцією низькомолекулярних тіолів.

У дослідних групах встановлено зміни активності центрального виконавчого ензиму апоптозу каспази-3. Вона зростає за впливу 40 нМ Раундапу окремо та у суміші з хлорпромазином, а також за дії ніфедипіну та поєднаної дії фармацевтичних препаратів та 80 нМ Раундапу, особливо за теплової дії (на 230%). Відтак, у більшості експериментальних груп виявляється взаємозв'язок між зменшенням вмісту лабільного цинку або збільшенням вмісту цинк-МТ та активацією каспази-3, що узгоджується з уявленнями про лімітуючу роль лабільного цинку як інгібітора каспази-3.

Раундап (80 нМ) та ніфедипін пригнічували активність лізосомальної протеази катепсину Д, а диклофенак та комбінація чинників викликали збільшення його лізосомальної активності на 53 – 57 %. За впливу суміші та теплового чинника одночасно посилюються активності каспази-3 та екстралізосомального катепсину Д. Відтак, комбінована дія ксенобіотиків та підвищеної температури викликають потужну активацію цитозольних процесів апоптозу та/або аутофагії.

Встановлено ознаку цитотоксичності як зменшення стабільності лізосомальних мембран за дії 40 нМ Раундапу у поєднанні з тепловим впливом та, особливо, 80 нМ Раундапу (зменшення у 1,6 разів), тоді як хлорпромазин та, особливо, ніфедипін окремо та у поєднаннях викликали стабілізацію лізосом (у 1,9-2,7 разів). Такий ефект ніфедипіну відповідає його ефектам на моделях хребетних тварин.

Для з'ясування механізму деметалюючого впливу Раундапу на МТ молюска, ми здійснили експеримент *ex vivo*, у якому порівняли вплив Раундапу та хелатора цинку ТПЕНу у суміші з іонами цинку за інкубації тканини у експериментальному середовищі. Результати цього експерименту переконливо довели, що раундап не має прямого впливу на акумуляцію цинку у МТ, на відміну від ТПЕНу. Лише ТПЕН поокремо та за спільної з цинком дії викликав протилежні до дії цинку ефекти, зменшуючи рівень МТSH, збільшуючи каспазну-3 активність та лізосомальну стабільність. З іншого боку, Раундап мав прооксидантний та цитотоксичний ефект, знижуючи рівень GSH та лізосомну стабільність. Спільним проявом для всіх експериментальних груп у цьому експерименті було зниження у 2-8 разів співвідношення GSH/GSSG. Проведене нами дослідження *ex vivo* вперше засвідчило успішність використання хелатора цинку ТПЕНу для з'ясування цинк-залежних біохімічних реакцій у двостулкових молюсків.

Відтак, у дисертаційній роботі встановлено особливості функціонального стану МТ двостулкових молюсків *U. tumidus* за впливу Раундапу у низьких екологічно реальних концентраціях. Доведено, що дестабілізуюча дія Раундапу

на цинк-залежні функції реалізується опосередковано через його прооксидантний вплив та ураження лізосомальних мембран. Інтегральний аналіз довів, що серед досліджуваних ефектів Раундапу, його вплив на клітинні низькомолекулярні тіоли МТ та GSH/GSSG був найбільш вираженим та послідовним, що робить ці показники перспективним біомаркерами токсичного впливу Раундапу.

Відзначено, що фармацевтичні препарати диклофенак, ніфедипін та хлорпромазин, у екологічно реальних концентраціях спричинюють низку специфічних реакцій МТ, системи антиоксидантного захисту, ензимів апоптозу та функціонального стану лізосом. Проте більшість цих реакцій, за виключенням стабілізації лізосом, нівелюється за спільного впливу з Раундапом. Отримані результати вивчення комбінованого субхронічного (*in vivo*) та безпосереднього (*ex vivo*) впливу Раундапу та фармацевтичних препаратів у поєднанні з тепловим впливом на молюска *U. tumidus* свідчать про перспективність запропонованих дослідних схем для оцінки екологічно реального впливу забруднювачів водного середовища на біоту.

Ключові слова: двостулкові молюски, металотіонеїни, цинк, глутатіон, антиоксидантна система, Раундап, диклофенак, ніфедипін, температурний вплив, хлорпромазин, ТПЕН, *ex vivo*.

SUMMARY

Khoma V.V. The responses of metallothioneins in bivalve mollusc under the effect on the organism of stressful agents in chronic or short-term exposures. Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

Thesis for the degree of Doctor of Philosophy 091 "Biology" (09 - Biology). - Ternopil Volodymyr Hnatiuk National Pedagogical University. - Volodymyr Hnatiuk National Pedagogical University, Ternopil, 2022.

The dissertation is devoted to research of the peculiarities of metal-binding responses and antioxidant potential of metallothioneins in bivalve mollusk *U. tumidus* under the subchronic or short-term exposures to xenobiotics with metal-chelating properties.

In the contemporary composition of the pollution of aquatic environment, the priority belongs to "microorganic pollutants", which include compounds of biological and agricultural origin, namely pharmaceuticals, personal care products, agricultural waste. Their biological hazards in water is complicated by the unpredictable behavior of their combination, especially in climate extremes. Therefore, the forecast of real hazards for the biota of combined water pollution should be based on the utilizing of adequate experimental schemes and sensitive and specific molecular targets, that are critically involved in the biological activity of xenobiotics.

Bivalve mollusks are recognized bioindicators of the aquatic pollution due to the filter-feeding and sedentary style of life. However, research on the effects of aquatic toxicants on them is focused mainly on experiments using individual xenobiotics in high concentrations.

There are growing evidence of the involvement of essential metals, namely zinc, in stress and detoxification responses. Metabolism and distribution of zinc within the cells is supported by the functioning of zinc-buffering proteins and metal transport systems. Metallothioneins (MT) are universal metal-accumulative animal proteins, which contain about 30% of cysteine. MT is traditionally considered as a biomarker of toxic metal contamination. Besides, these inducible thiols have also antioxidant potential.

The herbicide Roundup (commercial form of glyphosate) and pharmaceuticals nifedipine, diclofenac, chlorpromazine are among the most common water pollutants. Importantly, each of them, in addition to specific target effects, is able to affect the homeostasis of metals directly in organisms or the environment, chelating them and/or regulating metal transport channels.

Therefore, in our research, we used these model xenobiotics to elucidate the peculiarities of MT functioning in the ecologically relevant exposures of bivalve mollusk *U. tumidus*. To do this, the mollusks were exposed for 14 days to diclofenac (Dc, 600 ng / l), nifedipine (Nf, 700 ng / l), Roundup (Rn, 33.8 μg / l, corresponding to ~ 80 nM glyphosate) separately at 18 ° C and jointly at 18 ° C (Mix) and 25 ° C (MixT), as well as Roundup (Rn, 16.9 μg / l, corresponding to ~ 40 nM glyphosate) at 18 ° C and 25 ° C), chlorpromazine (Cpz, 18.0 μg / l) and a mixture of Roundup and chlorpromazine at 18 ° C (RnCpz). Xenobiotic concentrations were corresponded to their freshwater content and, for Roundup, 0.5 and 1.0 of the calculated no-effect concentration (PNEC). The temperature regime of 25 ° C was corresponded to the indicated values for the Dniester river basin in summer. To elucidate the mechanism of Roundup influence on zinc metabolism, its effect was compared with the effect of zinc chelator N, N, N', N'-tetrakis (2-pyridylmethyl) ethylenediamine (TPEN) in an ex vivo model in which samples of mollusc digestive gland were exposed to Roundup, ZnCl₂, TPEN and combinations of ZnTPEN or ZnRn at a concentration of 3 μM .

Due to the analysis of the spectrum in the ultraviolet region (UV spectrum) and the metal content in the eluate, it was determined the obligate conditions for the isolation of MT by gel-exclusive chromatography for the insure of the optimal zinc content. It is the absence of sodium azide preservative in the gel and the use of mercaptoethanol for the thols preservation.

The effects of 40 and 80 nM Roundup and the pharmaceuticals diclofenac, nifedipine and chlorpromazine on the *U. tumidus* for 14 days separately and in a mixture at two temperature regimes have shown that 80 nM Roundup (especially, 43%), as well as diclofenac, nifedipine the mixture of these xenobiotics under the

heating effect, causes an increase in MT-SH content by 26-57.8% compared to control and imbalance of MT-SH/MT-Me content ratio, which indicates an increase in the antioxidant potential of MT and a simultaneously decrease in their ability to bind metals. The ratio of metals in the composition of MT was also changed with the increasing of copper and/or cadmium rate. In all groups of mollusks under the effect of 80 nM Roundup, alone or in combination, the content of copper and cadmium in the non-binded in MT form in the tissue increased and the Zn/Cu ratio decreased. Diclofenac caused an enhancing in the content of unbounded zinc, which, however, was leveled in the combine exposures. Concequently, the effect of 80 nM Roundup alone and in combination with pharmaceuticals, especially at elevated temperature, have shown the dominant effect of Roundup as a destabilizer of the content and ratio of zinc in the mollusk digestive gland.

A 40 nM Roundup effect alone and in combination with chlorpromazine or at elevated temperature revealed an increase in MT-SH concentration of 33.6 - 57.7%, respectively, while chlorpromazine did not alter it. At the same time, the level of zinc in MT increased in all experimental groups, mostly under the effect of Roundup at elevated temperature and chlorpromazine, and the content of zinc in the tissue decreased significantly (by 15.9 and 24.6%, respectively). Therefore, the study of MT content and the balance of its metalated form in relation to the total MT content and zinc content in the tissue revealed changes in these indicators that depend on the nature and concentration (for Roundup) of the xenobiotic.

The evaluation of the MT antioxidant potential showed that the effect of 80 nM Roundup alone and in combination, as well as diclofenac and nifedipine on the organism causes inhibition of superoxide dismutase (SOD) (except for the mixture at elevated temperature, which activates SOD), and content of the reduced glutathione (GSH), which is manifested as a decrease in the redox index of GSH in all groups (maximum by 26%) except the group MixT. In all groups of this series, the lipid peroxidation products formation (TBARS) and protein carbonyls (PC) is increasing. Concentration of 40 nM Roundup, on the contrary, activates SOD and

total antioxidant activity, does not change the GSH/GSSG content and redox ratio compared to control, and in combination with chlorpromazine or elevated temperature causes an increase in total antioxidant activity, content and GSH redox-index.

At the same time, in all experimental groups the formation of TBARS (by 7.0-16.3%) and protein carbonyls (by 13.2-32.5%) (except for the Rn group) increases compared to the control. The effect of chlorpromazine is characterized by inhibition of catalase activity. Therefore, Roundup, depending on the concentration and combination with other environmental factors, has a prooxidant (80 nM) or antioxidant (40 nM) effect, and the prooxidant effect is enhanced in combined exposures, especially at elevated temperatures, and eliminates the specific effect of pharmaceuticals on zinc-dependent characteristics. The calculation of the integrated indices (Antioxidant-Prooxidant Balance (APB) and Integral Index of Biomarker Reactions (IBR)) showed that the state of the antioxidant defense system is determined mainly by the reaction of low molecular weight thiols.

Changes in the activity of the central executive apoptotic enzyme caspase-3 were found in the experimental groups. It increases in the exposures to 40 nM Roundup alone and in a mixture with chlorpromazine, as well as under the effect of nifedipine and the combined effect of pharmaceuticals and 80 nM Roundup, especially under thermal action (by 230%). Thus, in most experimental groups, there is the relation between a decrease in labile zinc or an increase in zinc-MT and caspase-3 activation, which is consistent with the information concerning the limiting role of labile zinc as a caspase-3 inhibitor. Roundup (80 nM) and nifedipine inhibited the lysosomal protease activity of cathepsin D, and diclofenac; and a combine exposure caused an increase in its lysosomal activity by 53 - 57%. Under the effect of the mixture and the thermal factor, the activities of caspase-3 and extralysosomal cathepsin D are simultaneously enhanced. Consequently, the combined effect of xenobiotics and elevated temperature caused a most powerful response of the cytosolic processes of apoptosis and/or autophagy.

Cytotoxicity was observed as a decrease in the stability of lysosomal membranes under the effect of 40 nM Roundup in combination with thermal exposure and, in particular, of 80 nM Roundup (1.6-fold reduction), while chlorpromazine and especially nifedipine alone and in combination caused lysosome stabilization by 1.9-2.7 times. This effect of nifedipine was corresponded to its effects on vertebrate animal models.

To elucidate the mechanism of the demetalation effect of Roundup on the mollusk MT, we performed an ex vivo experiment comparing the effects of Roundup and the zinc chelator TPEN in a mixture with zinc ions during tissue incubation in the experimental medium. The results of this experiment convincingly proved that the Roundup has no direct effect on the accumulation of zinc in MT, in contrast to TPEN. Only TPEN alone and in combination with zinc caused opposite effects to zinc, reducing MTSH levels, increasing caspase-3 activity and lysosomal stability. On the other hand, Roundup had a prooxidant and cytotoxic effect, reducing GSH levels and lysosomal stability. A common manifestation for all experimental groups in this experiment was a 2-8-fold decrease in the GSH / GSSG ratio. Our ex vivo study was the first known experiment that demonstrated the successful utilizing of the zinc chelator TPEN to elucidate the zinc-dependent biochemical reactions in bivalve molluscs.

To summarise, in the dissertation the peculiarities of the functional state of MT of bivalve mollusks *U. tumidus* under the effect of Roundup in low ecologically relevant concentrations are established. It is proved that the destabilizing effect of Roundup on zinc-dependent functions is realized indirectly through its prooxidant effect and damage to lysosomal membranes. Integrative analysis showed that among the studied effects of Roundup, its effect on cellular low molecular weight thiols MT and GSH/GSSG was the most pronounced and consistent, which makes these indicators promising biomarkers of toxic effects of Roundup.

It is noted that the pharmaceutical compounds diclofenac, nifedipine and chlorpromazine in ecologically relevant concentrations cause a number of specific responses of MT as well as antioxidant defense system, apoptosis enzymes and

functional state of lysosomes. However, most of these responses, with the exception of lysosome stabilization, were diminished by co-exposure with Roundup. The results of the study of the combined subchronic (in vivo) and direct (ex vivo) effects of Roundup and pharmaceuticals in combination with the thermal effects on *U. tumidus* indicate the advantages of the proposed research schemes to assess the ecologically relevant impact of aquatic pollutants on biota.

Key words: bivalve molluscs, metallothioneins, zinc, glutathione, antioxidant system, Roundup, diclofenac, nifedipine, temperature impact, chlorpromazine, TPEN, ex vivo.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці в яких опубліковані наукові результати дисертації:

Видання, що входять до науково-метричної бази даних Scopus:

1. Khoma, V., Martinyuk, V., Matskiv, T., Yunko, K., Gnatyshyna, L. & Stoliar, O. (2022) Does roundup affect zinc functions in a bivalve mollusk in *ex vivo* exposure? *Ecotoxicology*. *Ecotoxicology*, 31, 335–340. doi: 10.1007/s10646-021-02512-4
2. Khoma, V., Martinyuk, V., Matskiv, T. Gnatyshyna L., Baranovsky V., Gladiuk M., ...Stoliar O. (2022). Environmental concentrations of Roundup in combination with chlorpromazine or heating causes biochemical disturbances in the bivalve mollusc *Unio tumidus*. *Environ Sci Pollut Res*, 29, 14131–14142. doi: 10.1007/s11356-021-16775-1
3. Khoma, V., Gnatyshyna, L., Martinyuk, V., Mackiv, T., Mishchenko, L., Manusadzianas, L., Stoliar O. (2021) Common and particular biochemical responses of *Unio tumidus* to herbicide, pharmaceuticals and their combined exposure with heating. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, 111695. doi: 10.1016/j.ecoenv.2020.111695
4. Khoma, V.V., Gnatyshyna, L.L., Martyniuk, V.V., Mackiv, T.R., Mishchuk, N.Y., Stoliar, O.B. (2020). Metallothioneins contribution to the response of bivalve mollusk to xenobiotics. *Ukr. Biochem. J.*, 92(5), 86-96. doi: 10.15407/ubj92.05.087

Наукові фахові видання:

1. Khoma, V., Gnatyshyna, L., Martinyuk, V., Mackiv, T., Yunko, K., Formanchuk, ...Stoliar, O. (2020a) Combine exposures to low roundup concentration induces thiolome response in the digestive gland of bivalve mollusk. *Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія: Біологія*, 3–4 (80), 72-78. doi: 10.25128/2078-2357.20.3-4.9

2. Khoma, V. V., Martinyuk, V. V., Mackiv, T. R., Gnatyshyna, L. L., Springe, G., Stoliar, O. B. (2020b) The effect of Roundup on the bivalve *Unio tumidus* mollusk utilizing *ex vivo* approach. *Biol. Stud.*, 14, 41–50. doi: <https://doi.org/10.30970/sbi.1401.61>

3. Khoma, V. V. (2019) The content of metals in metallothioneins of the bivalve mollusk *Unio tumidus* depending on different in situ and in vitro exposures. *Biol. Stud.*, 13(1), 61-70. doi: <https://doi.org/10.30970/sbi.1301.583>

Патенти:

1. Гнатишина Л.Л., Загречук Г. Я., Мудра А. Є., Хома В. В., Мартинюк В. В., Мацьків Т. Р., Столяр О.Б. Спосіб експрес аналізу токсичності ксенобіотиків у водних екосистемах: 149750 UA, МПК А61К 35/08 (2015.01), А23L 17/50 (2016.01), G01N 33/18 (2006.01) № u202103868; заявл. 05.07.2021; опубл. 01.12.2021, Бюл. № 48

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. Khoma, V., Martyniuk, V., Matskiv, T., Yunko, K., Zacic, U., Gnatyshyna, L., & Stoliar, O. (2021). Biochemical manifestations of chlorpromazine effect in the single and combine exposures on the model organism. *В Modern approach of experimental and preclinical pharmacology: матеріали Міжнар. дист. наук.-практ. конф. (19 лютого 2021 року)* (с.11-12). НФаУ.

2. Khoma, V., Martyniuk, V., Matskiv, T., Yunko, K., Gnatyshyna, L., Manusadzianas, L., & Stoliar, O. (2021). Hormetic-like biochemical responses of bivalve mollusk to roundup and chlorpromazine are distorted in the combine exposures. In *Youth and Progress of Biology: Abstracts of XVII International Scientific Conference for Students and PhD Students (Lviv, April 19–21, 2021)* (pp. 59-60). LLC Romus-Poligraf.

3. Stoliar, O., Khoma, V., Martyniuk, V., Gnatyshyna, L., & Mackiv, T. (2021). The capability of Roundup to distort Zinc functionality in bivalve mollusk in

the ex vivo and in vivo exposures. In *ISEE Conference Abstracts*. ISEE doi: 10.1289/isee.2021.P-482

4. Khoma, V., Gnatyshyna, L., Horyn, O., Lahita, V., Mishchuk, O., & Stoliar O. (2019). Biochemical responses of bivalve mollusk in the co-exposure to diclofenac, nifedipine and glyphosate are distorted by heating. In *Youth and Progress of Biology: Program and Abstracts of XIV International Scientific Conference for Students and PhD Students, dedicated to the 135th anniversary of J. Parnas (Lviv, April 9–11, 2019)* (pp. 41–42). Lviv.

5. Khoma, V., Gnatyshyna, L., Horyn, O., Rarok, Yu., & Stoliar, O. (2019). Biochemical responses of bivalve mollusks to the combine effect of pharmaceuticals, herbicide and heating. *Ukr. Biochem. J.*, 91(2), 92.

6. Khoma, V., Gnatyshyna, L., Rarok, Y., Horyn, O., & Stoliar, O. (2019). Demetalation of metallothioneins as a constituent of stress response in bivalve mollusk caused by co-exposure to diclofenac, nifedipine, glyphosate and heating. In *6th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation*. (p. 32), PROCEEDINGS.

7. Khoma, V., Martinyuk, V., Mackiv, T., Lushchak, L., Gnatyshyna, L., & Stoliar, O. (2020). Biochemical responses of bivalve mollusk in the single and combine exposures to roundup. In *Youth and progress of biology xvi international scientific conference for students and phd students dedicated to the 75th anniversary of the faculty of biology of Ivan Franko national university of Lviv and 90th anniversary from the birthday of prof. M.P. Derkach (Lviv, april 27-29, 2020)* (pp. 42-43). Lviv.

8. Khoma, V.V., Martinyuk, V.V., Mackiv, T.R., Yunko, K.B., Formanchuk, R.T., Rarok, Y.S., Garasymiv, O.I., Sahno, A.I., Lushchak, L.V., Kozachuk, I.A., Gnatyshyna, L.L., & Stoliar, O.B. (2020) Complex effect of roundup and heating on bivalve mollusk *U. tumidus* utilizing *in vivo* and *ex vivo* approaches. В *Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції «Тернопільські біологічні читання – Ternopil bioscience – 2020» присвяченої 80-річчю хіміко-біологічного*

факультету Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка (22-23 травня 2020 р., Тернопіль (с. 107). Вектор.

9. Khoma, V.V., Martinyuk, V.V., Mackiv, T.R., Yunko, K.B., Formanchuk, R.T., Gnatyshyna, L.L., & Stoliar, O.B. Heating distorts biochemical responses of bivalve mollusk to mixture of pharmaceuticals and pesticide. In *“Current aspects of biochemistry, cell biology and physiology”* (1-2 October 2020 Dnipro, Ukraine) (pp. 145-147). Lira.

10. ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АОС	– Антиоксидантна система
АПБ	– Інтегральний показник антиоксидантно-прооксидантного балансу
СОД	– Супероксиддисмутаза
АФК	– Активні форми кисню
ДТНБ	– 5,5-дитіобіс-2-нітробензойна кислота
КАТ	– Каталаза
ОМП	– Окисні модифікації протеїнів
ТБК	– 2-тіобарбітурова кислота
ТБК-АП	– ТБК-активні продукти
ПОЛ	– Перекисне окиснення ліпідів
МТ	– Металотіонеїни
МТ-SH	– Металотіонеїни, визначені за кількістю SH- груп (загальний вміст)
МТ-Ме	– Металотіонеїни, визначені за кількістю зв'язаних металів (метальована форма)
УФ-спектри	– Спектри абсорбції в ультрафіолетовому діапазоні
GSH	– Глутатіон відновлений
GSSG	– Глутатіон окиснений
PNEC	– (з англ. predicted no-effect concentration) прогнозована неефективна концентрація речовини в будь-якому середовищі, нижче якої негативні ефекти, швидше за все, не виникнуть під час тривалого або короткочасного впливу.

ВСТУП

Актуальність теми. Протягом останніх десятиліть забруднення води є однією з найсерйозніших екологічних загроз (IPCC, 2014; Ge et al., 2020; Miller et al., 2018; Shaltami et al., 2020). Його особливістю в останні роки виступає посилення біологічної загрози так званих «мікроорганічних забруднювачів», які охоплюють широкий перелік речовин, різноманітних за походженням, будовою, характером дії, зокрема фармацевтичних препаратів та засобів особистого вжитку, ветеринарних відходів, продуктів та відходів харчового виробництва, їх біоактивних метаболітів (Whalley et al., 2018; Dodds & Whiles, 2010; Shaltami et al., 2020; Milano & Chèvre, 2019). Особливо небезпечно, що навіть у наномолярних концентраціях ці забруднювачі можуть проявляти токсичний ефект для водної біоти. Ці новітні забруднювачі поєднуються у водному середовищі з традиційними ксенобіотиками, такими як продукти діяльності сільського господарства, зокрема пестицидами. При цьому, реакційна здатність цих речовин у водоймах та в організмі істотно залежить від впливу змінних фізичних чинників, зокрема температурного режиму (Wagner, 2021). Відтак, прогноз реальних загроз для біоти комбінованого забруднення водойм новітніми ксенобіотиками повинен ґрунтуватися на застосуванні адекватних експериментальних схем та чутливих і специфічних показників стресу та токсичності.

Двостулкові молюски є визнаними біоіндикаторами стану водойм, оскільки вони мають унікальні властивості адсорбувати ксенобіотики завдяки фільтруючому способу живлення та ведуть осілий спосіб існування, тобто відображають стан середовища у певному місці (Matozzo et al., 2019; Scudiero et al., 2014). Проте дослідження впливу на них токсикантів водного середовища зосереджено переважно на гостротоксичних експериментах з використання окремих ксенобіотиків у високих концентраціях та здебільшого присвячене морським молюскам (Matozzo et al., 2020).

З'являється дедалі більше аргументів щодо залучення метаболізму есенціальних металів і їх балансу у клітинах, зокрема цинку, який є другим за

вмістом в організмі мікроелементом, у реакції стресу та детоксикації (Sharma et al., 2021). Метаболізм та розподіл цинку у клітинах безпосередньо забезпечується функціонуванням цинк-зв'язуючих протеїнів та метал-транспортних систем. Металотіонеїни (МТ) – це універсальні у тваринному світі метал- (здебільшого цинк) депонувальні протеїни. МТ двостулкових моллюсків вирізняються унікальним різноманіттям форм на генному рівні та здатністю до їх вибіркової експресії залежно від природи індуктора (Kang, 2006; Murata et al., 1999). Традиційно МТ вважають біомаркерами забруднення середовища токсичними металами, зокрема кадмієм, цинком та міддю, оскільки вони індукують їх експресію (Amiard et al., 2006). Разом з тим, отримано низку даних, зокрема і у НДЛ порівняльної біохімії та молекулярної біології ТНПУ (Stoliar & Stoika, 2022), які не обмежують уявлення про МТ двостулкових моллюсків як специфічні молекулярні мішені токсичних металів у екологічно-релевантних моделях, проте свідчать про їх участь у антиоксидантному захисті за впливу інших, ніж метали, пошкоджуючих чинників середовища (Isani & Carpenè, 2014; Kang, 2006). Для МТ вищих тварин було доведено, що вирішальне значення для функціонування цих протеїнів має величина відновного потенціалу у клітинах (Krężel & Maret, 2017).

Пестицид Раундап (комерційна форма гліфосату) та фармацевтичні препарати ніфедипін, диклофенак, хлорпромазин є одними із найпоширеніших у своїх групах забруднювачів. Проте кожен з них, окрім загальноновизнаних токсичних ефектів, здатний впливати на гомеостаз металів безпосередньо у цільових організмах чи довкіллі, хелатуючи їх як Раундап (Mertens, 2018; Sonier & Weger, 2010) та диклофенак (Refat et al., 2013), або опосередковано – регулюючи метал-транспортні канали як ніфедипін (Ludwiczek et al., 2007; Yu et al. 2017; Li et al., 2015; Gao et al., 2005) та хлорпромазин (Ogata et al., 1990; Woollorton & Mathie, 1993; Müller et al., 1991; Choi et al., 2001). Зокрема, однією із найбільш доведених властивостей гліфосату є адгезія йонів металів, яка може порушувати мобільність есенціальних металів, їх співвідношення або розподіл

у воді, ґрунті та в організмах тварин (Sonier & Weger, 2010; Mertens, 2018; Аблятіпова та ін., 2018).

Тому актуальною задачею у оцінці здатності МТ двостулкових молюсків виступати у якості біомаркерів забруднення водного середовища є з'ясування їх можливості брати участь у метаболізмі цинку та антиоксидантному захисті за впливу на організм ксенобіотиків органічної природи, які є реальними забруднювачами водою.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконувалась у межах держбюджетних тем МОН України № 132Б «Екотоксикологічна оцінка впливу гідроелектростанцій на довкілля» (номер державної реєстрації 0118U003123), № М/35-2018 «Мультимаркерний підхід для оцінки впливу гідроелектростанцій на довкілля» номер державної реєстрації 0117U003263) та №№ М/19-2020б М/70-2021 «Розробка набору біопроб - біомаркерів для оцінки впливу фармацевтичних препаратів на водні екосистеми» (номер державної реєстрації 0120U1103537).

Мета і завдання дослідження. Мета роботи – з'ясувати роль металотіонеїнів двостулкового молюсків *Unio tumidus* у зв'язуванні металів та їх антиоксидантний потенціал за впливу на організм Раундапу залежно від супутніх стресорних факторів.

Для досягнення мети було визначено такі *завдання*:

1. Виділити металотіонеїни з тканини молюска та оцінити їх властивості за впливу на організм Раундапу у відповідних екологічно реальних концентраціях окремо та у сумішах з фармацевтичними препаратами ніфедипіну, диклофенаку та хлорпромазину за двох температурних режимів (18°C та 25°C).

2. Охарактеризувати стан системи антиоксидантного захисту молюска за впливу на організм Раундапу у відповідних екологічно реальних концентраціях окремо та у сумішах з фармацевтичними препаратами ніфедипіну, диклофенаку та хлорпромазину за двох температурних режимів (18°C та 25°C).

3. З'ясувати наявність ознак цитотоксичності у організмі молюска за впливу досліджуваних чинників.

4. З'ясувати стан цинк-залежних біохімічних функцій у організмі двостулкового молюска за впливу Раундапу у моделі *ex vivo*.

Об'єкт дослідження – металодепонувальні протеїни металотіонеїни двостулкового молюска *U. tumidus*.

Предмет дослідження – рівень металювання та антиоксидантний потенціал металотіонеїнів у двостулкових молюсків *U. tumidus* за впливу на організм Раундапу у відповідних екологічно реальним концентраціях окремо та у сумішах з фармацевтичними препаратами ніфедипіну, диклофенаку та хлорпромазину за двох температурних режимів (18°C та 25°C).

Методи дослідження – розподільча хроматографія (виділення МТ), електрофорез в поліакриламідному гелі (виділення МТ), спектрофотометричні (визначення вмісту МТ, цинку, метаболітів та активності ензимів, рівня стабільності лізосомальних мембран), спектральні (визначення вмісту металів), мікроскопічні (визначення рівня ядерних аномалій та стабільності лізосомальних мембран), методи математичної статистики.

Наукова новизна одержаних результатів.

У дисертаційній роботі проаналізовано оптимальні умови виділення МТ двостулкового молюска із збереженням їх складу металів. Встановлено високу чутливість ступеню металювання МТ молюсків до дії Раундапу у концентраціях, що відповідають 1,0 та 0,5 очікуваної концентрації, яка прогнозовано не дає ефекту (PNEC), та його посилення за впливу на організм двох досліджених концентрацій Раундапу за температури 25°C. Доведено посилення ефекту обох концентрацій Раундапу у комбінації з лікарськими препаратами хлорпромазином чи диклофенаком та ніфедипіном при 18°C та 25°C. Вперше виявлено, що Раундап спричинює вплив посередництвом прооксидантної дії та, опосередковано через цей механізм, модулює метал-депонувальні властивості металотіонеїну та цинк-залежних протеїнів, зокрема каспази-3. Визначено специфічні ознаки впливу фармацевтичних препаратів на

стан металотіонеїнів, показники стресу та детоксикації в організмі молюска. Зокрема, виявлено активацію біогенезу лізосом у травній залозі молюска за впливу регуляторів кальцієвих каналів хлорпромазину та ніфедипіну (окремо та у сумішах). Температурний режим виявився критичним фактором, що впливає на акумуляцію металу у складі МТ та його розподіл у клітині за впливу ксенобіотиків. Вперше запропоновано модель *ex vivo* для з'ясування впливу Раундапу на функцію МТ. У експерименті з блокатором цинку ТПЕНОм доведено, що пряма дія Раундапу на тканину травної залози молюска пов'язана з прооксидантним впливом та не впливає на депонувальну функцію МТ, щодо цинку, та активність цинк-залежної каспази-3.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати щодо рівню металювання металотіонеїнів у тканинах молюска можуть бути використані як оціночний критерій стійкості водних екосистем. Напрацьована модель *ex vivo* запропонована для раннього діагностики токсичності суміші ксенобіотиків. Доведено, що за ознакою стабільності лізосомальних мембран реакція молюсків відповідає ефектам, відомим для вищих тварин, що мотивує використання цього модельного організму для вивчення впливу фармацевтичних препаратів.

Особистий внесок здобувача. Підбір та аналіз літератури, постановка методик дослідження, одержання експериментальних даних, їх оформлення здійснювались автором самостійно. Організація експерименту по відборі тварин з водойм, аналізу вмісту металів проводилась спільно з іншими співробітниками держбюджетних тем. Планування основних напрямків досліджень, аналіз отриманих даних та їх обговорення проведено спільно з науковим керівником д.б.н. проф. Столяр О. Б. Друковані роботи підготовлено за безпосередньої участі автора.

Апробація результатів дисертації.

Основні положення дисертації були представлені на міжнародних та всеукраїнських конференціях, зокрема на XV, XVI, XVII Міжнародних наукових конференціях студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології»

(Львів, 2019.; 2020; 2021); Конференції молодих вчених «Сучасні аспекти біохімії та біотехнології – 2019» (Київ, 2019); 6 Українському конгресі з біології клітини з міжнародним представництвом (м. Яремче, 2019); V Міжнародна наукова конференція «Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології» (Дніпро, 2020); Міжнародній науково-практичній конференції «Тернопільські біологічні читання – Ternopil bioscience – 2020» (Тернопіль, 2020), Міжнародна дистанційна науково-практична конференція «Modern approach of experimental and preclinical pharmacology» (Харків, 2021); 33 Конференція Міжнародного товариства епідеміології навколишнього середовища (Нью-Йорк, 2021).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 17 праць, у тому числі 1 патент на корисну модель, 7 статей у фахових виданнях, з яких 3 статті у виданнях з сумарним імпаکت-фактором 13,35, h=4 згідно баз даних Scopus (Author ID: 57203854447), 9 – матеріали і тези доповідей на з'їздах і конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація викладена на 159 сторінках комп'ютерного набору, складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, результатів роботи та їх обговорення, аналізу та узагальнення результатів, висновків, переліку використаних джерел, який включає 228 джерел (з них 226 латиною). Робота ілюстрована 37 рисунками, 4 таблицями.

РОЗДІЛ І ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Поліфункціональні протеїни металотіонеїни двостулкових молюсків та їх роль у діагностиці токсичності водного середовища

1.1.1. Структура та властивості

Протеїни металотіонеїни (MT) уперше було виділено Margoshes та Vallee (1957), як кадмій-вмісний протеїн з тканини нирки коня. На сьогодні відомо, що це внутрішньоклітинні, термостабільні, низькомолекулярні протеїни, експресія яких виявлена у більшості живих організмів від бактерій до людини (Klaassen et al., 1999; Blindauer et al., 2014). У тварин найбільша їх кількість трапляється в паренхімних тканинах, тобто в печінці, підшлунковій залозі, нирках, кишечнику. Загалом спостерігаються різні варіації концентрації MT в різних тканинах і видах організмів, що відображає також вплив віку, стадії розвитку, режиму харчування та інших ще не повністю ідентифікованих факторів. Дослідження транскрипту MT в гемоцитах, зябрах, гепатопанкреасі, статевих залозах, аддукторах і мантиї молюсків продемонструвало найвищий рівень у гепатопанкреасі, що ймовірно пов'язано з фізіологічними функціями тканини, зокрема детоксикації (Ge et al., 2020). Хоча MT є цитоплазматичним протеїном, вони також можуть функціонувати в інших компартментах клітини (Lynes et al., 2006), та мігрувати з цитозолу до ядра у відповідь на окислювальний і металевий стрес (Cherian & Apostolova, 2000).

MT – генетично поліморфна білкова родина з підродинами, підгрупами та ізоформами. Серед найбільш розповсюджених є чотири основні ізоформи металотіонеїнів, це MT-1 і MT-2, які присутні практично у всіх тканинах, оскільки їх експресія індукується різними стресами, наприклад тепловим шоком, глюкокортикоїдами, окисним стресом, голодуванням, а також впливом металів; MT-3, який виконує специфічну функцію фактора інгібітора росту (GIF) у центральній нервовій системі, та MT-4, який функціонує в клітинах плоского епітелію (Pavić et al., 2019).

Для MT характерний унікальний хімічний склад, який забезпечує специфічну дво-доменну структуру, утворену метал-тіолатними кластерами.

Молекула МТ – це поліпептидний ланцюг утворений з 61-79 амінокислотних залишків в залежності від виду живого організму (Isani & Carpenè, 2014; Kägi, 1991), серед яких відсутні ароматичні амінокислоти, що зумовлює специфічні спектральні властивості, а саме відсутність типового для протеїнів поглинання у діапазоні близько 280 нм (Kägi, 1991). Секвенування цих протеїнів показало, що близько 30% амінокислотного складу припадає на цистеїн (Cys) (Nam & Kim, 2017), який розміщується в наступних послідовностях Cys-X-Cys, Cys-XX-Cys і Cys-Cys, де «X» позначає амінокислоту, відмінну від цистеїну. (Kojima et al., 1976). Для більшості видів представників хребетних тварин характерна α/β – доменна структура МТ – α -домен складається з амінокислот 31–68 і розташований на С-кінці поліпептиду, тоді як β -домен містить амінокислоти 1–30 та розміщений на N-кінці (Dziegiel et al., 2016). Два метал-зв’язуючі домени розділені послідовністю, що не містить цистеїну, часто позначається як спейсер або лінкер (Babula et al., 2012).

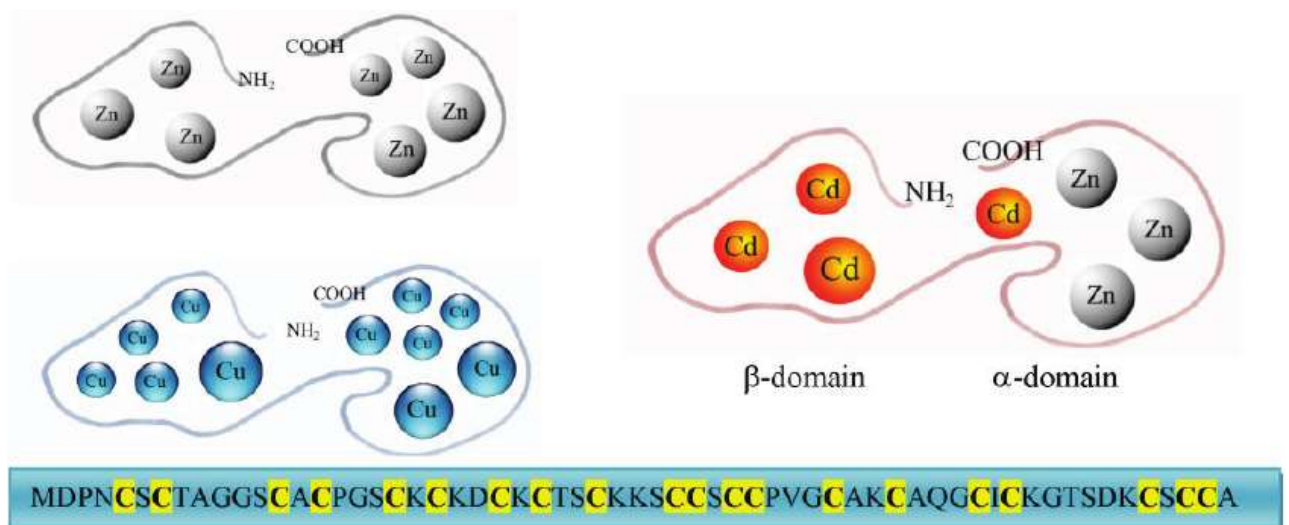


Рис. 1.1.1. Доменна структура металотіонеїнів за Isani G. and Carpenè E. (2014).

Для представників безхребетних тварин характерні різні комбінації доменів у структурі МТ, наприклад із поєднанням двох β -доменів, чи α -N-кінцевим і β -С-кінцевим доменами, або з однодоменним складом (Isani & Carpenè, 2014; Carpenè et al., 2007), зокрема для моллюсків характерна дво-

доменна будова, яка поєднує варіанти шести доменів — α , β_1 , β_2 , β_3 , γ та δ — у специфічний для видів комбінації. (Calatayud et al., 2021). Доменна структура забезпечується здатністю атомів сульфуру цистеїну координувати одно- та двовалентні метали утворюючи метал-тіолатні кластери (домени) тетраедричної (або тригональної) структури (Hamer, 1986; Robbins et al., 1991). Молекула МТ може зв'язувати до 12 одновалентних атомів або до 7 двовалентних атомів металів, з утворенням гомо- або гетеро-металічних комплексів. Так, α -домен може координувати 4 йони металу і є більш стабільним, тоді як β -домен координує 3 йони металу та є більш реакційно здатним (Рис.1.1.1). Відповідно, можна припустити, що β -домен переважно бере участь у фізіологічних процесах, таких як знешкодження активних форм кисню (АФК), або гомеостаз незамінних металів, тоді як α -домен, має, ймовірно, більш важливе значення для детоксикації важких металів (Hübner & Haase, 2021). МТ здатні зв'язувати до 18 різних видів йонів металів, але в умовах *in vivo* вони координують переважно цинк (Zn) або кілька різних йонів металів у гетерометалічній молекулі (Coyle et al., 2001; Nath et al., 1988; Robbins et al., 1991), оскільки саме МТ зв'язують Zn міцніше, за інші протеїни ($K_{A(Zn)}(Zn_7MT) = 3,2 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$ при pH 7,4). Як наслідок, концентрація цинку в них вища, в порівнянні з іншими протеїнами та становить 5-10% від загального вмісту цього металу в гепатоцитах людини (50 мкмоль в клітині) (Maret et al., 1999; Maret, 2004). Проте лише чотири йони Zn міцно зв'язані з високою спорідненістю, тоді як два йони цинку - з проміжною спорідненістю, і одна ділянка слабо зв'язує сьомий йон цинку з наномолярною спорідненістю, що дозволило висловити гіпотезу, про неможливість утворення в нормальних умовах *in vivo* насиченого цинком металотіонеїну (Krężel & Maret, 2017). Завдяки спорідненості йонів Zn до сульфуру SH-груп, МТ є термодинамічно стабільними. Проте йони Cd^{2+} , Cu^+ , Ag^+ , Hg^{2+} Pb^{2+} , та Bi^{2+} можуть заміщувати Zn в доменах МТ (Kägi & Schäffer, 1988; Nath et al., 1988).

Метал-тіолтані кластери зумовлюють характеристичний УФ-спектр МТ з максимумом поглинання в ультрафіолетовому діапазоні – для Cd-МТ

характерний пік при 254 нм, для Cu-МТ спостерігається зміщення піку поглинання у бік ближнього ультрафіолету, а для Zn-МТ в сторону дальнього ультрафіолету (Мелконян, 1984). Вказані спектральні ознаки, а також відсутність максимуму поглинання при 280 нм, унікальна термостабільність (при нагріванні до 85-90°C у буферному розчині, рН ~8,0 протягом 5-10 хв. не осаджуються, не втрачають йони металу та зберігають особливості спектру) та молекулярна маса близько 7–8 кДа використовуються для виділення та ідентифікації МТ (Suzuki et al., 1986).

У клітинах МТ зустрічаються у трьох молекулярних формах (Bell & Vallee, 2009; Ziller & Fraissinet-Tachet, 2018): тіоніни (T_{ox}) - окиснені форми (у молекулі МТ цистеїнові залишки утворюють дисульфідні зв'язки -S-S-), які слабо реакційно здатні; тіонеїни (T_{red} , апо-МТ), відновлені форми (у молекулі МТ цистеїнові залишки перебувають у відновленому стані -S-H), які можуть зв'язувати реакційноздатні хімічні форми, такі як активні форми металів, активні форми кисню (АФК) і активні форми нітрогену (АФН); металовмісні форми (МТ-Me) (у молекулі МТ цистеїнові залишки утворюють зв'язки з двовалентними металічними елементами -S-Me-S- або одновалентними S-Me), високоактивні та функціонально зв'язані з багатьма іншими протеїнами (Ziller & Fraissinet-Tachet, 2018).

1.1.2. Регуляція експресії

МТ можуть конститутивно експресуватися та/або індукуватися у відповідь на кілька видів стресу та молекулярних сигналів (Breton & Prentiss, 2019). Регуляція рівня МТ відбувається на транскрипційному рівні, але також можуть відбуватися посттранскрипційні, трансляційні та посттрансляційні модифікації (Ge et al., 2020; Migliaccio et al., 2020; Vignesh & Deepe Jr., 2017; Yiwen et al., 2022).

На сьогоднішній день на експериментальних моделях більш вивчені регуляторні механізми індукції ізоформ МТ-1 і МТ-2. Для хребетних було показано, що механізм індукції цих протеїнів складний і динамічний та

ініціюється багатьма факторами: йонами важких металів (незамінні, Zn(II) і Cu(I)/Cu(II), та токсичні, Cd(II), Hg(II), Pb(II) та інші), глюкокортикоїдами, бактеріальними ендотоксинами, випромінювання (УФ, рентгенівським та γ -променями), тепловим шоком, пошкодженням тканин, вірусними інфекціями, хіміотерапевтичними препаратами, гіпоксією та реоксигенацією, інтерферонами та іншими факторами (Dziegiel et al., 2016; Ghoshal & Jacob, 2001; Naq et al., 2003; Krężel & Maret, 2021). Аналіз будови промоторної ділянки гена МТ показав, що він містить кілька відмінних послідовностей для зв'язування факторів транскрипції, зокрема металочутливий елемент (MRE) (активується MRE-зв'язуючим транскрипційним фактором-1 (MTF-1)) (Saydam et al., 2002; Yiwen et al., 2022), глюкокортикоідчутливі елементи (GRE) (активується стероїдними гормонами) і елементи антиоксидантної відповіді (ARE) (активується електрофільними частинками) (Bi et al., 2004; van Lookeren Campagne et al., 2000). Йони металів, а особливо йони цинку, є найпотужнішими індукторами експресії МТ-1/2. Оскільки саме цинк як опосередковано може ініціювати транскрипцію через GRE та ARE (Krężel & Maret, 2021), так і безпосередньо зв'язуватися з MTF-1, який взаємодіє в промоторних областях генів МТ-1/2, з послідовністю MRE через шість доменів цинкового пальця, що призводить до ініціації транскрипції гена (Dziegiel et al., 2016; Otsuka, 2021; Saydam et al., 2002). Елементи MRE також були ідентифіковані в промоторних областях гена МТ-3, хоча існують протилежні результати щодо можливої індукції експресії цієї ізоформи йонами металу (Garrett et al., 2002). Токсикологічні дослідження показали, що йони металів, відмінні від цинку, також можуть викликати експресію гена МТ-1/2. Підвищені кількості МТ-1/2 були виявлені в печінці, нирках і кишечнику експериментальних тварин після впливу кадмію, ртуті та цинку (Vašák & Meloni, 2011). Хоча йони металів, відмінні від цинку, здатні індукувати експресію МТ-1/2, цей механізм відрізняється від індукції йонами цинку, оскільки вони безпосередньо не зв'язуються з MTF-1. Йони ендогенних важких металів не можуть активувати MTF-1, але завдяки своїй вищій спорідненості з

протеїнами MT-1/2 вони здатні витіснити йони цинку з молекул і підвищувати рівень вільного внутрішньоклітинного цинку. У свою чергу, вільні йони цинку зв'язуються з MTF-1, що призводить до активації транскрипції гена MT-1/2 (Dong et al., 2015; Kojima et al., 1976; Murata et al., 1999; W.-C. Wang et al., 2014).

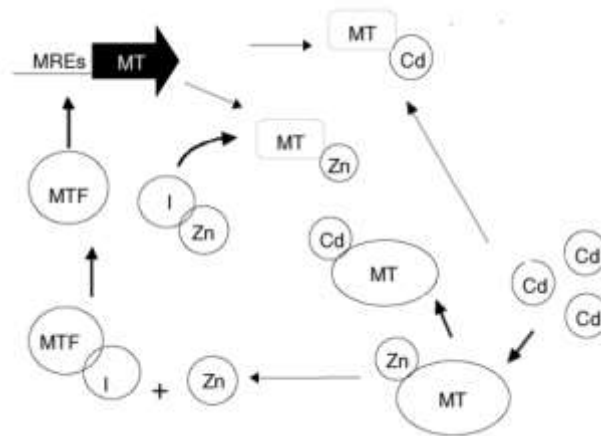


Рис.1.1.2.1. Приклад моделі індукції MT викликаній впливом Cd. MT – металотіонеїн; MRE – металочутливий елемент у промоторі; MTF – фактор транскрипції металу; I – інгібітор транскрипції (Amiard et al., 2006).

Так, в експериментальній моделі для риби *Siganus virgatus*, було показано швидке збільшення експресії мРНК гена MT викликане дією Cd (II) (1 мг/л) в 15 разів на 3 день та в 27 разів на 5 день порівняно з контролем, вплив Zn (II) (2 мг/л) також викликав тотожну реакцію, але в меншій мірі – в 2,5 раза збільшувався рівень експресії на 3 день і в 4,7 раза на 5 день порівняно з контролем. Крім того, рівень експресії мРНК гена MT значно підвищувався після впливу суміші 0,003 мг/л Cd(II) і 0,2 мг/л Zn(II). Зі збільшенням концентрації кожного металу зростав рівень експресії мРНК гена MT. Проте в цьому ж дослідженні не спостерігали жодних змін у експресії мРНК гена MT у осіб, підданих різним концентраціям Cu (Sakatoku et al., 2020). Для двостулкового молюска *Macra veneriformis* також повідомляється про підвищення експресії гена MT та рівня протеїну за впливу Cd і Hg на п'ятий день експерименту, тоді як суміш цих металів вже на третій день викликала максимальний рівень цього

показника (Fang et al., 2013). В обох дослідженнях спостерігається активація детоксикаційної системи, як відповідь на стрес.

Багато досліджень дійсно продемонстрували підвищення рівня МТ після впливу As, Cd, Cu, Pb, Ni чи Zn в лабораторних або польових умовах (Le et al., 2016; X. Liu & Wang, 2016). Проте, у дослідженні Liu & Wang (2016) на двостулковому молюску *Crassostrea hongkongensis* із забрудненого металами лиману показано, що рівень МТ в зябрах устриць позитивно корелювали з накопиченням Cd в тканині. Однак накопичення Cu, Ni та Zn в устрицях може призвести до зменшення вмісту МТ. Однією з можливих причин є насичення МТ металами в зябрах через хронічний вплив забрудників в середовищі існування. Тобто, рівень експресії МТ залежить від дози важких металів. Однак індукція МТ може пригнічуватися при хронічному чи гостротоксичному впливу металів (Walker et al., 2014).

Отже, характеристики експресії генів МТ при дії різних металів дещо відрізнялися, очевидно через вибіркочуватність МТ до детоксикації різних металів, видову специфічність та тривалість впливу.

Окислювальний стрес, також здатен підвищувати експресію МТ шляхом активації і MRE, і ARE (Vašák & Meloni, 2011) Утворення вільних радикалів, таких як перекис водню (H_2O_2), під впливом різних факторів може призводити до окиснення молекули МТ, що супроводжується вивільненням з протеїну зв'язаних йонів цинку, які зв'язуються з MTF-1 та в подальшому ініціюють експресію генів (Krężel & Maret, 2021; Dong et al., 2015; Andrews, 2000). Так, дослідження на ембріональних клітинах мишей (Qu et al., 2013) показало, що H_2O_2 активує експресію генів МТ-I та МТ-II.

Щодо дії інших факторів (прооксидантів) на експресію МТ повідомляється лише для окремих видів. У дослідженнях (de Francisco et al., 2016) продемонстровано чинники-прооксиданти які активують експресію генів МТ 1/2 в інфузорії *Tetrahymena*, серед них гербіцид паракват, фармацевтичний препарат манадіон, підвищена температура, та кисле рН. Для двостулкового молюска *Mytilus coruscus* зараження бактеріями *Vibrio parahemolyticus* і

Aeromonas hydrophila спочатку викликало зростання експресії генів МТ, а потім зниження, максимум експресії спостерігали через 4 години після інфікування *V.parahemolyticus* (збільшення у 40 раз), а при стресі *A.hydrophila* через 24 години (збільшення у 100 раз). Автори отримані результати розглядають, як активацію системи антиоксидантного захисту, а МТ надають роль антиоксиданта.

Було показано, що область ARE реагує на H_2O_2 і кадмій, але не на цинк. У дослідженнях *in vitro* на мишачих клітинах видалення промоторної області ARE гена МТ-1 ослабило експресію T_{red} у відповідь на H_2O_2 і кадмій, що свідчить про активацію експресії окисним стресом (Andrews, 2000; Hübner & Haase, 2021).

Для водних безхребетних, зокрема двостулкових молюсків, механізми регуляції експресії МТ, вивчені відносно мало, та лише в окремих дослідженнях демонструється індукція експресії МТ металами (Le et al., 2016; Amiard et al., 2006).

Отже, МТ є стресорними протеїнами, які індукуються переважно перехідними металами та іншими ксенобіотиками-прооксидантами. Тому МТ входять до набору визнаних біомаркерів токсичності водного середовища за ознакою активації експресії у середовищі, забрудненому металами. Але доцільність використання їх в умовах забруднення поліеентами, відмінними від металів, не з'ясовано.

1.1.3. Роль металотіонеїнів у гомеостазі та детоксикації металів

Регуляція гомеостазу металів має вирішальне значення в біологічних і клітинних процесах, таких як розвиток і функціонування органів, активність ензимів, внутрішньоклітинна передача сигналів і зв'язок між клітинами (Vignesh & Deere Jr., 2017). Високий вмісту цистеїну в структурі молекули МТ та здатність зв'язувати низку різних одновалентних та двовалентних металів як *in vitro*, так і *in vivo* (Coyle et al., 2002) забезпечують здатність регулювати доступність, розподіл і транспорт йонів металу в клітинах. МТ стали важливою

ланкою в підтримці загального функціонування організму (Vignesh & Deere Jr., 2017).

Фізіологічним металом для МТ тварин є Zn, оскільки константа зв'язування Zn тіонеїном є найвищою ($>3 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$) в біологічних системах. Саме МТ – це одні з основних регуляторів Zn, які беруть участь у забезпеченні буферизації йонів Zn^{2+} , субклітинного перерозподілу Zn^{2+} та контроль передачі цих йонів (Krężel & Maret, 2017).

Ще одним фізіологічним металом, в гомеостазі якого беруть участь МТ є купрум (Cu^+). Константа зв'язування МТ Cu^+ нища ніж з Zn^{2+} та становить ($>2,0 \times 10^{16} \text{ M}^{-1}$) (Vašák & Meloni, 2011). Ця висока спорідненість свідчить про те, що МТ буферизує Cu^+ (Krężel & Maret, 2017). Нативні МТ, виділені з клітин ссавців та безхребетних, як правило, зв'язані з йонами цинку та міді (Figueira et al., 2012; Maret, 2017; Yao et al., 2015). Робота Figueira та ін. (2012) показала, що кількість та вид йонів металу, зв'язаного з МТ, змінюється залежно від умов впливу на організм. При відсутності впливу пошкоджуючих чинників 60–70% МТ зв'язані з основними металами (Zn і Cu). Цікаво, що МТ цинку та міді внутрішньоклітинно розподілені по-різному: CuMT можна знайти в лізосомах за умов надлишку купруму, тоді як Zn-MT переважно цитозольний (Krężel & Maret, 2017).

МТ, буферизуючи йони цинку та купруму, створюють запас йонів цих металів, які в подальшому використовуються у процесі синтезу металоензимів, що забезпечують функціонування багатьох клітинних процесів (Roesijadi et al., 1996; Viarengo & Nott, 1993). Так, обмін цинку спостерігався між МТ-2 і білком Gal4, який містить кластер з двома йонами цинку. Це є першим виявленим міжмолекулярним обміном цинку серед різних білків. МТ також переносить цинк до лужної фосфатази, карбоксипептидази А, гліцеролфосфатдегідрогенази та сорбітолдегідрогенази. Окрім того, спостерігався обмін цинком між МТ і факторами транскрипції цинкових «пальців». Передбачалося, що дане перенесення цинку регулює експресію генів шляхом інгібування або активації зв'язування ДНК (Bell & Vallee, 2009; Krężel & Maret, 2017; Maret, 2004)(Bell &

Vallee, 2009; Krężel & Maret, 2017; Wolfgang Maret, 2004). Фактично, цинк можна переміщати в обох напрямках — від МТ до апо-ензимів цинку і від ензимів цинку до апо-МТ (Petering & Mahim, 2017).

Подальші докази прямої взаємодії між МТ та апо-цинк-зв'язуючими протеїнами спостерігалися, коли ці пептиди були відокремлені від МТ мембраною, через яку можуть дифундувати лише йони цинку. Обміну цинку не було виявлено в системі, розділеній мембраною, порівняно зі швидким обміном, який спостерігали при змішування апо-проотеїну і МТ (Maret, 2004). Ці важливі спостереження свідчать про те, що зв'язаний цинк може доставлятися лише тоді, коли відбувається безпосередня взаємодія між МТ і акцепторами цинку (тобто МТ може служити специфічним шапероном цинку) (Bell & Vallee, 2009; Sutherland & Stillman, 2011). Хоча цинк часто необхідний для ензимативної активності, він також може пригнічувати деякі ензими, такі як каспазу-3, фруктозо-1,6-дифосфатазу, гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназу, альдегіддегідрогеназу, тирозинфосфатазу та дріжджову енолазу. Додавання апо-МТ може відновити їх ензиматичну активність, тим самим діючи як хелатуючий агент, який видаляє цинк із інгібованих ензимів (Maret et al., 1999; Sutherland & Stillman, 2011).

Коли перехідні метали (Cd, Hg або Ag) потрапляють в клітину, між ними та фізіологічними металами (Cu, Zn) виникає конкуренція за внутрішньоклітинні ліганди, зокрема МТ, тоді детоксикаційна роль МТ буде переважаючою (Ziller & Fraissinet-Tachet, 2018). Крім того, протеїни, які втратили здатність функціонувати в результаті впливу кадмію, відновлювали ці властивості після інкубації з Zn-МТ. Таким чином, МТ не тільки зв'язують надмірну кількість металів всередині клітини, але й відновлюють функціональні здатності протеїнів, інактивованих екзогенними металами (Floriańczyk, 2007). Важливість МТ у детоксикації металів чітко продемонстрована в дослідженнях, що включали вплив важких металів на нокаутних мишей МТ-1/2, що призводило до токсичних проявів металу, тоді як

у мишей з надмірною експресією МТ-1/2 не спостерігали проявів ознак токсичності (Coyle et al., 2002).

Дослідження біоаккумуляції кадмію та свинцю в травних і репродуктивних залозах *Mytilus galloprovincialis* з чотирьох різних місць забруднених металами уздовж Кампанського узбережжя продемонструвало, що рівні цих металів через 40 днів після переселення моллюсків в лабораторні умови були подібними до концентрацій, визначених до періоду пересадки. Проте, вміст МТ різко зменшився після переселення. Найбільш яскраво це проявляється в травній залозі, оскільки вміст МТ у гонадах був дуже низьким у розглянутий сезонний період. Ці дані підтверджують гіпотезу, згідно з якою в мідіях важкі метали утворюють нерозчинні преципітати і що МТ, виконують і функцію зв'язування металів, і інші важливі цитопротекторні функції в умовах комплексного забруднення. Проте менш стресові та більш контрольовані умови, в яких перебувають перенесені мідії, призвели до зниження концентрації МТ в тканинах (Scudiero et al., 2014).

1.1.4. Окисно-відновний стан та участь у антиоксидантному захисті

Завдяки властивостям залишків цистеїну МТ може діяти як окислювально-відновний буфер (Andrews, 2000; Hübner & Haase, 2021) залучаючи при цьому всі три молекулярні форми: тіонін (T_{ox}), тіонеїн (T_{red}) та металотіонеїн (МТ-Ме) та впливати на відновний стан клітини (Andrews, 2000; Hübner & Haase, 2021; Krežel & Maret, 2021; Liu et al., 2014; Vašák & Meloni, 2011; Ziller & Fraissinet-Tachet, 2018).

Залишки цистеїну окислюються АФК (наприклад, H_2O_2 , $O_2^{\cdot -}$) і АФН (наприклад, NO^{\cdot}), які утворюються в клітині, що супроводжується поступовою втратою металів молекулами і перетворенням їх на T_{ox} (Bell & Vallee, 2009; Li-Juan et al., 1998). Відповідно, за умов окисного стресу відбувається збільшення кількості дисульфідних зв'язків у молекулі МТ (Kang, 2006). Структурно наявність 20 залишків цистеїну у МТ сприятиме утворенню саме внутрішньомолекулярних дисульфідних зв'язків, але в моделі *in vitro* в окисних

умовах високі концентрації МТ призводять також до утворення димерів (Romero-Isart & Vasák, 2002). Окиснена форма МТ характеризується зниженою здатністю до зв'язування металів, що призводить до збільшення концентрації вільного металу (цинку) в клітинах, який може індукувати експресію додаткового T_{red} для зв'язування радикалів (Hübner & Haase, 2021). Так, опосередкована Ras онкогенна трансформація нормальних клітин епітелію поверхні яєчника людини індукує окислювальний стрес і збільшує кількість тіоніну та вільного цинку в клітині (Krezel & Maret, 2007).

Даний процес окиснення є оборотним, що важливо в умовах *in vivo*. У клітинах окиснення МТ регулюється глутатіоном (Bell & Vallee, 2009). Відновлений глутатіон (GSH) дозволяє відновити T_{ox} до T_{red} , тоді як окиснена форма глутатіону (GSSG) дозволяє вивільнити метал шляхом окиснення МТ-Ме (Bell & Vallee, 2009; Li-Juan et al., 1998). Отже системи МТ [T_{red} :МТ-Ме: T_{ox}] і глутатіону [GSH:GSSG] тісно взаємопов'язані та відіграють важливу роль у регуляції окисно-відновного та металевого балансу в клітині та демонструють пряму роль МТ у системі антиоксидантного захисту (Hübner & Haase, 2021; Ziller & Fraissinet-Tachet, 2018). Дослідження *in vitro* показали, що кількість Zn, що вивільняється з МТ, залежить від стану клітинного співвідношення GSH/GSSG. Висока концентрація GSH пригнічує вивільнення Zn, оскільки МТ стабілізуються. Посилене утворення GSSG викликає вивільнення Zn, швидкість якого лінійно залежить від концентрації GSSG (Zalewska et al., 2014).

Перші дослідження окислювально-відновних реакцій у двостулкових *Mytilus galloprovincialis* були проведені за впливу низької концентрації Cu^{2+} , в результаті чого метал накопичується в лізосомах травної залози у зв'язаному вигляді в формі частково окиснених Cu-МТ та комплексів із гранулами ліпофусцину. Це дозволило припустити авторам, що мідь викликає окисний стрес у мідій (Canesi, 2015), так як і в ссавців, оскільки експериментальні умови викликали також накопичення різних продуктів перекисного окиснення ліпідів і зниження вмісту глутатіону (GSH) (Canesi, 2015; Viarengo et al., 2007). Гіпотетично, МТ можуть брати участь в антиоксидантному захисті зв'язуючи

редокс-активні метали (Cu), що дозволить уникнути їхньої участі у взаємодіях окисного стресу, таких як Фентон-реакції (Suzuki et al., 1986), так і безпосередньому знешкодженні радикалів тіоловими групами (Canesi, 2015).

Крім того, МТ можуть опосередковано брати участь у антиоксидантному захисті. Наприклад Cu-МТ в окисних умовах може передавати купрум до ензиму супероксиддисмутази (Cu/Zn СОД) та, таким чином активувати ензим Cu/Zn- СОД, який індукується клітинним окисним стресом для детоксикації в клітинах шляхом каталізу дисмутації супероксид радикалів (O_2^-) у перекис водню (H_2O_2) і молекулярний кисень (O_2) за допомогою Cu і Zn як каталізаторів (Liu et al., 2000).

Відтак, МТ є унікальними поліфункціональними низькомолекулярними тіолами, для яких встановлено участь у детоксикації та гомеостазі металів у двостулкових молюсків. Разом з тим, доказова база їх участі у антиоксидантному захисті та пов'язаних з цим змін у клітинному гомеостазі металів за впливу пошкоджуючих чинників середовища у водних тварин загалом та, зокрема, у двостулкових молюсків майже не сформована.

1.2. Біохімічні реакції водних організмів на вплив новітніх ксенобіотиків

Водне середовище є кінцевим реципієнтом більшості токсичних речовин, що безпосередньо або опосередковано продукуються антропогенною активністю. Пестициди є однією з найбільш масових та небезпечних складових забруднення водойм (Milano & Chèvre, 2019). Хімічне забруднення середовища пестицидами зростає відповідно до поширення їх використання в сільському господарстві. Серед інших, новітніх забруднювачів дедалі більше уваги приділяється фармацевтичним препаратам, які потрапляють у воду із стічними водами внаслідок їх споживання населенням, а водоочисні системи не спроможні до їх ефективного виведення (Datel & Hrabankova, 2020). Поведінка цих забруднювачів у водоймах може бути визнана як слабо прогнозована, причому вони діють у малих (мікро- та наномолярних) концентраціях. Вплив

фармацевтичних препаратів на навколишнє середовище, особливо на водні організми, може носити переважно хронічний характер. Залежно від тривалості впливу, концентрації та поєднання з іншими супутніми чинниками, ці новітні забруднювачі середовища можуть викликати в організмі як адекватну реакцію детоксикації, так і стрес-реакцію (Столяр та ін., 2016). Проблема оцінки реальної загрози ксенобіотиків водного середовища ускладнюється тим, що вони діють не поодинокі, а в сукупності та на тлі екстремальних змін температурного режиму, що пов'язане з глобальними змінами клімату. Відтак, актуальним є пошук чутливих біомаркерів стресу та специфічних ознак токсичності цих ксенобіотиків для водних тварин, які би дозволяли оцінювати вплив новітніх ксенобіотиків на водних організмів у екологічно реалістичних концентраціях та поєднаннях.

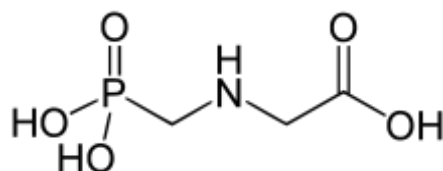


Рис.1.2.1 Хімічна формула гліфосату.

Найбільш комерційно відомим у світі серед пестицидів є неселективний гербіцид широкої дії Раундап, діючою речовиною якого є гліфосат (2-[(фосфометил)аміно]оцтова кислота) (Рис. 1.2.1.) (Mertens, 2018). Він створеного фірмою Monsanto, використовується у понад 130 країнах на понад 100 культурах. Механізм дії гліфосату полягає у пригніченні ензиму 5-енолпірувіл-шикімат-3-фосфат-синтази (ЕПШФС), що каталізує передостанній етап на шляху шикімату. Інгібування призводить до зменшення біосинтезу трьох незамінних амінокислот: тирозину, фенілаланіну та триптофану, а отже пригнічення біосинтезу протеїну. ЕПШФС - ензим, присутній у всіх рослинах, як трав'янистих, так і деревних, у грибах, водоростях та деяких мікроорганізмах, таких як *Aricomplexa*, на які також може діяти гліфосат (Matozzo et al., 2020).

Після застосування Раундапу сільським, лісовим чи садовим господарством, він потрапляє у ґрунти, де може розкладатися або частково

вимиватися до наземних та підземних вод (Matozzo et al., 2019). Оскільки період напіврозпаду гліфосату коливається в широкому діапазоні від 1,7 до 142 днів, то це призводить до його накопичення у водоймах (Annett et al., 2014). Як результат, концентрація цієї сполуки у водному середовищі може сягати високих значень, зокрема у водоймах США максимальний рівень 700 мкг/л, у лиманах узбережжя Німеччини його рівень становив від 28 до 1690 нг/л, а на заході Тихого океану – від 13,6 до 1377 мкг/л (Carles et al., 2019; Matozzo et al., 2019). Як результат, потрапляння та накопичення цього гербіциду у водоймах, може супроводжуватись токсичним впливом на нецільові організми (зокрема гідробіоти).

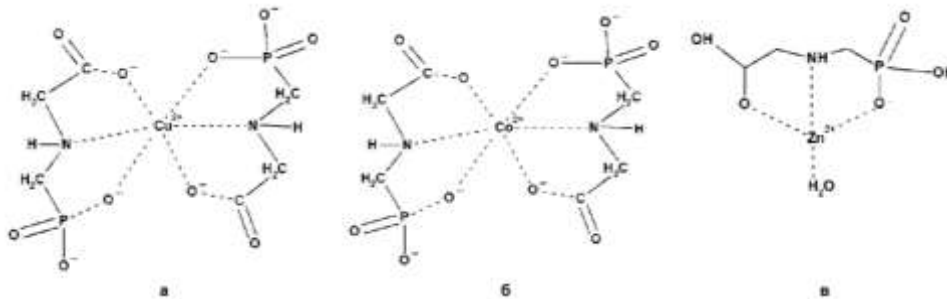


Рис. 1.2.2. Будова комплексів ліганту гліфосату з йонами металів: а) Cu^{2+} , б) Co^{2+} , в) Zn^{2+} (Аблятіпова та ін., 2018).

Крім того, відомо, що гліфосат – похідна сполука від амінокислоти гліцину і в розчинах може існувати як цвіттер-іон. Дана властивість дає змогу припустити різноманітне поведження молекули гліфосату в ролі ліганту. Даний ліганд характеризується здатністю утворювати комплекси з 3d-металами (Рис 1.2.2) (Аблятіпова та ін., 2018).

Гліфосат містить три функціональні групи (амінну, карбоксильну і фосфатну) і, залежно від рН реакційного середовища, ступеня депротонування, може координувати йон металу тридентатно через нітроген амінної групи, оксиген карбоксильної та фосфатної груп або тетрадентатно, якщо координація по фосфатній групі відбувається через два атоми оксисену (Аблятіпова та ін., 2018). Таким чином, як сильний хелатуючий агент гліфосат викликає гіперакумуляцію йонів таких металів як Co, Fe, Cu, Zn у ґрунтах, та живих організмах, тим самим порушуючи багато метало-залежних біохімічних

процесів, зокрема тих, що забезпечують стійкість до патогенів (Аблятіпова та ін., 2018; Mertens, 2018). Тобто, подібно до інших синтетичних лігандів, наприклад, таких як NTA та EDTA, гліфосат може потенційно впливати на токсичність, біодоступність та біоаккумуляцію йонів важких металів при безпосередньому застосуванні у водних екосистемах (Mertens, 2018).

Хелатуючу функцію гліфосату для мінеральних речовин спостерігали, ще до того, як був відкритий гербіцидний ефект гліфосату. Так у комерційних продуктах гліфосат часто використовується у формі солі з ізопропіламіном (ІРА) як катіоном, але ІРА також є хелатором, наприклад, заліза, і, таким чином, може збільшити хелатуючий потенціал гліфосату (Sonier & Weger, 2010).

Неясно чи здатний гліфосат з його хелатуючими властивостями впливати на біодоступність металів у ґрунтах і, таким чином, опосередковано сприяти вищій токсичності або обмеженню поживних речовин для ґрунтових організмів та рослин. Проте дослідження з дощовими хробаками свідчать про те, що токсичність купруму в ґрунті була зменшена в присутності гліфосату (Zhou et al., 2013). У водних екосистемах, де одночасно можуть траплятися і гліфосат, і d-метали, гербіцид може впливати на їх токсичність та біодоступність, зокрема для Cd, Cr, Cu, Pb, Ni, Se і Zn (Tsui et al., 2005). Суміші гліфосату та миш'яку (As) виявили синергічну токсичність до нематоди *Caenorhabditis elegans* (Wang et al., 2017).

Проте, саме хелаторна властивість гліфосату може знижувати його гербіцидну дію, шляхом зв'язування полівалентними катіонами в жорсткій воді, що обумовлено утворенням нерозчинних металевих комплексів гліфосату і, тим самим, зниженням його біодоступності. Тим не менш, експеримент, який провели Tsui Martin із співавторами (Tsui & Chu, 2008) показав, що додавання гліфосату не зменшувало гостру токсичність Hg і Se при дії на організм *Ceriodaphnia dubia*. Хелатування Hg з використанням EDTA також не впливало на токсичність Hg для дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Отже, подібно до EDTA, гліфосат також не може знизити токсичність Hg.

Сучасні дослідження демонструють, що гліфосат (як активний компонент або комерційний препарат) впливає на різні біологічні параметри у нецільових водних організмів, таких як риба, амфібії, ракоподібні та молюски (Matozzo et al., 2019). Поряд з цим, до складу комерційних препаратів гербіцидів на основі гліфосату (зокрема і Раундапу) переважно входять допоміжні компоненти для підвищення їх ефективності, переважно, це поверхнево активні речовини (далі ПАР), які також можуть мати токсичний вплив на нецільові організми або посилювати таку дію основного компонента (Baier et al., 2016).

Так у дослідженні Bringolf та ін. (2007), де вивчали окремий вплив гербіциду Раундапу та його компонентів: солі гліфосату та ПАР MON 0818 на прісноводного молюска *Lampsilis siliquoidea*, доведено, що найбільш токсичну дію мала ПАР, і, ймовірно, вона зумовлювала більшу токсичність Раундапу для молюсків. Однак результати цього дослідження також демонструють, що сіль гліфосату, яка є активним компонентом гербіциду, поокремо також проявляє токсичний ефект для прісноводних молюсків.

Порівняльне дослідження в експериментальних умовах *in vitro* щодо впливу гліфосату (як активного компоненту пестициду) та Раундапу експрес (комерційна форма) було проведено на гемоцитах молюска *Haliotis tuberculata*. Дане дослідження також продемонструвало, що комерційний препарат може бути більш шкідливим, ніж активний інгредієнт для гемоцитів, ймовірно, через наявність ад'ювантів, таких як ПАР, що використовуються для збільшення ефективності даного гербіциду (Mottier et al., 2020).

Забруднюючі речовини, потрапляючи до організмів водних тварин зазнають біотрансформації, даний механізм забезпечує зменшення токсичного впливу ксенобіотиків та полегшує їх виведення. Травна залоза молюсків відома як орган-мішень для впливу забруднювачів, оскільки вона здатна накопичувати ксенобіотики і відіграє важливу роль у їх метаболізмі. Вона також бере участь у імунному захисті, детоксикації та гомеостатичній регуляції, і тому вплив забруднювачів може призвести до зміни їх біохімічних маркерів (Cappello et al., 2013; dos Santos & Martinez, 2014).

Однією із найперших реакцій клітини на стресові чинники є активація електрон-транспортних систем мікосом (ендоплазматичного ретикулуму) та мітохондрій, яка супроводжується збільшенням споживання кисню. Внаслідок посилення окисних реакцій утворюється велика кількість АФК. Вони виникають в разі прямого пошкодження клітинних мембран та стінок. У відповідь зростає активність системи антиоксидативного захисту (Lavryshyn et al., 2016). У низці досліджень (dos Santos & Martinez, 2014; Faria et al., 2021; Pérez et al., 2011; Tresnakova et al., 2021; Uren Webster & Santos, 2015) доведено, що гліфосат та гербіциди на його основі викликають окисний стрес в організмах хребетних та безхребетних тварин, що супроводжується генеруванням активних форм кисню (АФК). Це потенційно може призвести до пошкодження ліпідів, ДНК, білків та модуляції клітинної антиоксидантної системи (dos Santos & Martinez, 2014).

Так у *Caenorhabditis elegans* після гостротоксичного впливу гліфосат-вмісного гербіциду Touchdown[®] (Burchfield et al., 2019) спостерігалось збільшення генерування перекису водню (H_2O_2). Коли у дослідженні Samanta та ін. (2014) високі концентрації пестициду були випробувані на двох видах костистих риб, активність глутатіон-S-трансферази знизилася до 70–80%, тоді як активність каталази та рівень продуктів перекисного окиснення ліпідів зросли відповідно до 150% та 130% порівняно з контролем. У дослідженні Iumato та ін. (2013) гліфосат концентрацією 3 мг/л не викликав зміни активності каталази, проте пригнічував СОД. Антиоксидантні ензими мають складу систему регулювання, і деякі з них можуть бути інактивовані надлишком окремих видів окисників. Зокрема перекис водню може пригнічувати активність СОД. Тому можна припустити, що відсутність збільшення активності САТ, що спостерігається при дії гліфосату на *L. fortunei*, могло б призвести до накопичення перекису водню з наступними зниженням активності СОД. У сукупності ці результати свідчать про те, що гліфосат за дії високих концентрацій може, викликати окислювальний стрес різного ступеня важкості.

Відтак, аналіз результатів досліджень впливу Раундапу та його основного компоненту гліфосату свідчить, що вказані полюенти становлять реальну загрозу при потраплянні у водні екосистеми. При цьому загроза їх потрапляння у водойми зростає із прогресуючим застосуванням ефективних гербіцидів у сільському господарстві. Токсичність гліфосату та його комерційного препарату Раундапу досліджують традиційно шляхом встановлення гостро токсичних концентрацій. Досліджень екотоксичності вказаних забруднювачів у екологічно реальних умовах недостатньо для формування остаточних висновків про реальну дію гліфосатвмісних сумішей на водні організми. Аналіз біологічної дії гліфосату, який гіпотетично може проявляти екотоксичність, на прикладі модельних експериментів свідчить, що результат залежний від застосовуваних композитів речовин, концентрацій, а також виду організмів. Тому доцільним підходом для дослідження у випадку гліфосатвмісних препаратів є порівняння його впливу окремо та в сумішах із поширеними водними забруднювачами.

Протягом останніх років увагу багатьох дослідників у всьому світі привертає проблема збільшення неконтрольованої присутності залишків фармацевтичних препаратів та їх метаболітів у навколишньому середовищі, які потрапляють у нього через пряме скидання промислових та побутових стічних вод (Carvalho et al., 2015) та не належну очистку стічних вод, адже понад 80% світових стічних вод викидається в навколишнє середовище без належного очищення (UNESCO, 2017).

Фармацевтичні препарати виготовляються з метою впливу на функціонування організму людини, але у зв'язку із подібністю молекулярних механізмів у різних видів живих організмів лікарські засоби можуть чинити дію і на нецільові організми (Ebele et al., 2017). Тому дослідження міграції лікарських засобів у навколишньому середовищі і з'ясування впливу їх та їх метаболітів на живі організми є актуальним напрямом досліджень. За результатами моніторингу вмісту органічних забруднювачів у світовому водному басейні серед груп фармацевтичних препаратів найчастіше

ідентифікували речовини з наступних груп: гормони, антибіотики, анальгетики, психотропні препарати, серцево-судинні регулятори та протиракові лікарські засоби (OECD, 2019).

Серед груп анальгетиків одним з найпоширеніших лікарських засобів, який виявлено у 76% досліджень водного басейну світу є диклофенак (Мао et al., 2019). Диклофенак – нестероїдний протизапальний препарат. Його концентрація в підземних водах та річках світу становить у межах від нг/л до г/л, а в поверхневих водах України 3,56 мкг/л (Chen et al., 2016). Оскільки нестероїдні протизапальні препарати є небіодеградуєчими та ліпофільними, то вони можуть викликати низку серйозних екологічних проблем, пов'язаних із впливом на водних організмів та біоаккумуляцією в харчових ланцюгах (López-Serna et al., 2013; Мао et al., 2019; Schulze et al., 2010). Враховуючи потенційну загрозу диклофенаку для наземних і водних організмів, європейське законодавство включило диклофенак до пріоритетного переліку спостереження Директиви про стандарти якості навколишнього середовища (2008/105/EC) (Carvalho et al., 2015).

Аналіз джерел літератури показав, що більшість досліджень впливу диклофенаку на водних організмів була спрямована на оцінку гостротоксичної дії. У дослідженнях Liu та ін. (2017) показано, що після впливу диклофенаку у концентрації 50 мкг/л у *Daphnia magna* спостерігали порушення репродуктивної функції. Окрім цього, диклофенак в процесі метаболізму продукує АФК, які здатні індукувати окислювальний стрес (Gómez-Oliván et al., 2014), спричиняючи перекисне окиснення ліпідів, окисне ушкодження протеїнів, зміни в експресії генів, пошкодження ДНК та інактивацію ензимів, це може відбуватися в більшій мірі, коли антиоксидантний захист перевантажений (Diniz et al., 2015). Так у *Perna perna* (Fontes et al., 2018) спостерігали інгібування основного конюгуючого ензиму у молюсків – глутатіон-S-трансферази, який також проявляє антиоксидантну активність в системі глутатіону. Дослідження Fontes та ін. (2018) та Schmidt та ін. (2014) показали зниження активності ензимів антиоксидантної системи мідій, які

піддавалися впливу диклофенаку у концентраціях 1 мкг/л і 1000 мкг/л. Збільшення вмісту малонового діальдегіду (Fontes et al., 2018) використовували як ознаку перекисного окиснення ліпідів, в тканинах зябер, підданих концентрації 200 нг/л продовж 48-годинного впливу. Зростання рівня окисних ушкоджень ліпідів та протеїнів у двостулкових молюсків, які зазнали впливу диклофенаку, було продемонстровано в кількох дослідженнях (Gonzalez-Rey & Vebiano, 2011; Schmidt et al., 2014). Разом з тим, цей препарат практично не досліджено за субхронічного впливу на двостулкових молюсків, зокрема за ознаками окисного стресу за участю клітинних тіолів.

З групи препаратів серцево-судинних регуляторів у медичній практиці широко застосовується антиангінальний та антигіпертензивний засіб ніфедипін, який входить до Типового списку основних лікарських засобів Всесвітньої організації охорони здоров'я (WHO, 2017). Ніфедипін є блокатором (антагоністом) кальцієвих каналів, який використовується для лікування гіпертонії та хронічної стенокардії. В організмі людини інтенсивно метаболізується до неактивних метаболітів, приблизно 80 % дози ніфедипіну виводиться із сечею у незміненому вигляді ніфедипіну та частково його метаболітів. Незважаючи на часткову мікробну деградацію та здатність до фотокаталітичного розпаду у навколишньому середовищі, ніфедипін і продукти його розпаду (нітросо-, нітро-, азокси- та N,N'-діоксидні похідні) є поширеними забруднювачами в стічних та поверхневих водах (Hayase et al., 1995). Так, концентрація ніфедипіну в окремих водоймах становить від 12,7 нг/л до 89 нг/л. (Al-Odaini et al., 2011). У літературі повідомляється, що вплив ніфедипіну на водні організми, зокрема двостулкових молюсків та земноводних, викликає фрагментацію ДНК та продукує окисний стрес, який проявляється підвищенням АФК, накопиченням продуктів перекисного окиснення ліпідів та окисненого глутатіону (Falfushynska et al., 2019). Поряд з цим, його вплив на метаболізм металів есенціальних металів, зокрема конкурентні взаємодії кальцій/цинк у двостулкових молюсків не вивчалися, хоча саме гомеостаз металів є його клітинною мішенню.

Ще однією групою лікарських засобів, якій необхідно приділити увагу через їх широке використання в медицині та їх потенційний вплив на живі організми шляхом дії на нейроендокринну систему та метаболізм металів є психотропні препарати (Escudero et al., 2021; Ford & Herrera, 2019; Reichert et al., 2019).

Одним з часто використовуваних препаратів цієї групи є хлорпромазин – нейрорептик групи похідних фенотіазіну, який проявляє виражену антипсихотичну, седативну та протиблювотну дію. Він використовується для лікування психічних розладів у всьому світі. Його первинна антипсихотична активність обумовлена блокуванням дофамінових (D2) рецепторів у мезолімбічному шляху мозку (Alkimi et al., 2020). Потрапивши у водне середовище хлорпромазин може залишатися стабільним протягом 4 тижнів (Jiménez et al., 2016). Як наслідок його було виявлено в різних водних компартментах у концентраціях від 1 до 364 нг/л (Alkimi et al., 2020).

У літературі повідомляється, що хлорпромазин викликає токсикологічний ефект у нецільових організмів, таких як макробезхребетні, макроліти, та риби, (Alkimi et al., 2020). Зокрема, у лабораторних дослідженнях (Li et al., 2008) визначено напівлетальну концентрацію хлорпромазину для прісноводних золотих рибок (*Carassius auratus*) яка через 24, 48 та 96 год становила 1,11, 0,43 та 0,32 мг/л відповідно.

Параметри окисного стресу, такі як КАТ і СОД у дослідженні Li та ін. (2008) для *Carassius auratus*, зазнавали значного впливу хлорпромазину під час хронічного впливу, при цьому спостерігалися зміни активності КАТ, які відображали значну індукцію окисного стресу, також повідомили про індукцію окисного стресу через значну зміну активності КАТ у водному організмі *D. Magna* (Oliveira et al., 2015). Дослідження Atama та ін. (2020) демонструють зростання показника ТБК-АП, результатом чого стало порушення мембранозалежних біологічних процесів, викликаних утворенням АФК за впливу хлорпромазину на *S. garipepinus*. У цьому ж дослідженні спостерігалась активація глутатіонпероксидази, що дозволяє детоксикувати підвищений рівень

H_2O_2 , що утворився в результаті пригнічення активності каталази.

Відтак, незважаючи на те, що вміст фармацевтичних препаратів у водних екосистемах низький, вони можуть спричиняти суттєві зміни у живих організмах, оскільки призначені викликати біологічні ефекти при надзвичайно низьких концентраціях (OECD, 2019). При цьому дія описаних препаратів пов'язана із забезпеченням балансу есенціальних металів, проте такий аспект їх впливу у водних тварин не вивчався.

Забруднювачі в природних системах рідко зустрічаються окремо, зазвичай у вигляді складних сумішей (Annett et al., 2014; Atama et al., 2020; Burchfield et al., 2019; Dos Santos & Martinez, 2014; Ge et al., 2020; Matozzo et al., 2019). Одночасна присутність різних сполук зумовлює токсичні ефекти, відмінні від тих, які пов'язані з окремими речовинами, оскільки взаємодія між ними може змінювати ступінь їх впливу на організм (Matozzo et al., 2019; Trombini et al., 2020).

Основними токсикологічними взаємодіями є:

- синергізм (коли ефект суміші більший, ніж сумарний ефект окремих впливів кожного компонента суміші);
- антагонізм (коли комбінований ефект різних хімічних речовин менший, ніж сума ефектів кожної хімічної речовини);
- потенціювання (коли хімічна речовина, яка не має токсичної дії окремо, посилює дію іншої хімічної речовини);
- інгібування (коли компонент, який не має токсичної дії сам по собі, зменшує видимий ефект іншої хімічної речовини);
- маскування (коли компоненти проявляють протилежні або функціонально конкуруючі ефекти на одну й ту саму систему і зменшують вплив один одного, або один переважає дію іншого) (Trombini et al., 2020).

У природніх умовах вплив суміші забруднювачів поєднується з підвищенням температури води внаслідок глобального потепління. Крім того, термічні та хімічні стресові фактори можуть потенційно взаємодіяти та змінювати здатність організмів створювати адекватні захисні реакції на стрес і

підтримувати гомеостаз. Високі температури можуть безпосередньо збільшити біодоступність та токсичність органічних молекул (Vu et al., 2016; Столяр та ін., 2016). Крім того, висока температура у водних організмів викликає захисні реакції на стрес, прискорює метаболізм і виснажує запаси енергії, що може побічно вплинути на здатність організмів створювати ефективні захисні реакції проти хімічних речовин і запобігти пошкодженню клітин (Vu et al., 2016; Trombini et al., 2020). Підвищена температура може бути особливо шкідливою для екзотермічних видів, оскільки вона впливає на більшість їх поведінкових та метаболічних процесів. Як наслідок, термічний стрес може посилити або замаскувати вплив токсичних стресових факторів на біоту, ускладнюючи прогнозування їх сукупного впливу на різних рівнях біологічної організації – від клітини до цілого організму (Trombini et al., 2020).

Отже, суміші можуть мати високу токсичність та непрогнозований вплив на організм молюсків, навіть якщо їх компоненти присутні в дуже низьких концентраціях. Оцінка індивідуальних ефектів окремих речовин, може призвести до недооцінки їх ризику для водного середовища.

Підсумок до розділу

Відтак, інформація, що стосується впливу пошкоджуючих чинників середовища на водні організми, зокрема гербіциду Раундапу та окремих фармацевтичних препаратів, обмежена здебільшого використанням гостро токсичних концентрацій в дослідних експозиціях. Дослідження низьких екологічно реальних концентрацій чинників довкілля на водних тварин потребує з'ясування меж реакції специфічних біохімічних систем детоксикації ксенобіотиків та їх особливостей залежно від природи чинника, окрім того необхідно дослідити вплив сумішей забруднювачів, щоб виділити ризик, який представляють різні речовини, що одночасно трапляються у навколишньому середовищі. Металотіонеїни як поліфункціональні внутрішньоклітинні тіюли є предметом дослідження переважно за впливу на організм токсичних металів, позаяк їх вплив як редокс-регуляторів залишається поза увагою дослідників двостулкових молюсків.

РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Відбір експериментальних груп тварин

З природних водойм для дослідження відбирали особин двостулкових молюсків родини *Unionidae*, виду перлівниці клиноподібної *U. tumidus* (Philipson, 1788), діаметр мушлі яких становив близько 8,5 см, а маса 60 – 70 г. Для відбору екземплярів використовували місцевість, яку вважали як референтну за ознаками хімічного складу води та стану біохімічних та морфологічних показників молюсків (Gnatyshyna et al., 2020b).

В лабораторних умовах проведено три серії досліджень:

I. Дослідження дії суміші ксенобіотиків пестициду Раундапу (Rn), фармацевтичних препаратів групи не стероїдних протизапальних засобів – диклофенаку (Dc) та антигіпертензивних засобів – блокатора кальцієвих каналів ніфедипіну (Nf) на двостулкових молюсків *U. tumidus* при двох температурних режимах.

II. Дослідження дії пестициду Раундапу (Rn) при двох температурних режимах та в суміші з фармацевтичним препаратом антипсихотропої групи хлорпромазину (Cpz) на двостулкових молюсків *U. tumidus* при двох температурних режимах.

III. Дослідження впливу Раундапу, цинку, Zn-хелатору ТПЕНу окремо, а також у комбінації цинку з Раундапом та цинку з ТПЕНом з використанням експериментальної моделі *ex vivo*.

Крім того, було здійснено підготовчий експеримент по уточненню умов елюції МТ з травної залози молюсків.

Для I-ї, II-ї та III-ї серій досліджень молюски відбирали у вересні 2018 та 2019 р.р. відповідно з умовно чистих ділянок річки Жванчик, притока Дністра (Gnatyshyna et al., 2020b) (для I-ї та II-ї серії – 48°49'18.1" пн. ш. 26°23'25.2" сх. д., с. Кочубеїв, Чемеровецький район, Хмельницька область; для III-ї серії – 48°49'37.7" пн. ш. 26°23'30.0" сх. д., с. Кочубеїв, Чемеровецький район, Хмельницька область). Для підбору коректних умов хроматографії МТ

використовували *U. tumidus* із резервуару Касперівської ГЕС (р. Серет) після 21 доби депурації молюсків у лабораторних басейнах.

Тварин відбирали траловим методом на глибині до 1 м. З місць відбору в лабораторію їх транспортувати в аерованій воді. Молюсків попередньо адаптували до лабораторних умов протягом семи днів у резервуарах об'ємом 80 л, наповнених аерованою, дехлорованою та пом'якшеною водопровідною водою (температура – 18 ± 1 °C, рН $7,3 \pm 0,2$, концентрація CaHCO_3 – $86,8 \pm 1,0$ мг/л, концентрація розчиненого кисню – $8,67 \pm 0,51$ мг/л, концентрація $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$, NO_2^- нижче 0,1 мг/л). Зміну води проводили щодобово, для попередження токсичної дії продуктів життєдіяльності організмів. Годівлю тварин проводили двічі на тиждень по 500 мг сухим кормом Tropical SuperVit Basic, що містить бета-1,3/1,6-глюкан.

Експозиція молюсків тривала протягом 14 днів, зміну води, поновлення концентрації речовин та годівлю тварин здійснювали кожні дві доби. Під час експозиційного періоду смертності тварин не спостерігали.

Після інкубації молюсків умертвляли та відбирали для аналізу тканину травної залози. Дослідження з використанням мікроскопу проводили в день досліду. Тканину для інших аналізів зберігали у морозильній камері при температурі -40°C . Всі показники досліджували у тканині травної залози. Тканину травної залози використовували завдяки її важливій ролі у метаболізмі, а також у акумуляції ксенобіотиків (Faggio et al., 2018; Kostić et al., 2017).

Тканину гомогенізували з використанням електричного гомогенізатора Поттера з тефлоновим пестиком. Для попередження протеолізу при одержанні гомогенатів використовували інгібітор протеаз фенілметилсульфонілфторид (0,1 мМ, "Sigma-Aldrich"). Усі маніпуляції з відбору і обробки зразків тканин проводили на холоді.

У підготовчому експерименті досліджували оптимальний склад елюента для гель-розподільної хроматографії термостабільних протеїнів травної залози. Застосовували чотири склади елюентів на основі 10 мМ трис-НСІ буфера, рН

8,0: без добавок (С); елюент, що містив 10 мМ 2-меркаптоетанолу та 5 мМ азиду натрію (відповідає 0,03%) (ME+N); елюент, що містив 5 мМ азиду натрію (N); та елюент, що містив 10 мМ 2-меркаптоетанолу (ME).

У першій експериментальній серії було досліджено дію суміші гліфосат-вмісного пестициду Раундапу та фармацевтичних препаратів диклофенаку та ніфедипіну при двох температурних режимах. Для цього, молюски, після адаптації, розподіляли рівномірно на групи по 10 особин у резервуари наповнені водою об'ємом по 20 л (підтримуючи вище вказані умови) та додавали наступні речовини: диклофенак (Dc, у вигляді препарату Диклофенак-Дарниця; 600 нг/л або 2 нмоль/л), ніфедипін (Nf, у вигляді препарату Ніфедипін-Дарниця; 700 нг/л, або 2 нмоль/л), фосфорорганічний пестицид гліфосат (Rn, у вигляді засобу Раундап МАКС, Монсанто, США; 33,8 мкг/л, що відповідає 13,4 мкг/л або ~80 нмоль/л гліфосату) окремо при 18 °С (позитивні контролю) та спільно у відповідних концентраціях при 18 °С (Mіx) та 25 °С (MіxT) (температуру підвищували поступово протягом 24 год), а одну групу піддавали впливу лише акваріумної води та вважали контрольною (С). Вибір концентрації гліфосату базувався на екологічно реальних концентраціях цього гербіциду. Наприклад, згідно з екологічними стандартами якості Бразилії, максимально допустиме значення вмісту гліфосату для води класу I становить 65 мкг/л (El Naj et al., 2019). Екологічно реалістичні концентрації цього пестициду в водоймах Європи відповідають десяткам-сотням мкг/л (Carles et al., 2019).

У другій експериментальній дослідній серії було досліджено дію низької концентрації пестициду Раундапу (Rn) при двох температурних режимах та в суміші з фармацевтичним препаратом антипсихотропої групи Хлорпромазином (Cpz) на двостулкові молюски *U. tumidus*. Для цього, молюски, після періоду адаптації, рівномірно розподіляли на п'ять дослідних груп по 10 особин в акваріуми об'ємом 20 л наповнених водою (фізико хімічні показники води підтримувалися у вищевказаних межах) та додавали наступні речовини: фосфорорганічний пестицид Раундапу (Rn, у вигляді засобу Раундап МАКС,

Монсанто; 16,9 мкг/л, що відповідає 6,1 мкг/л або ~40 нмоль/л гліфосату) при температурах 18 °С (позитивний контроль) та при 25°С (RnT) (температуру підвищували поступово протягом 24 год), хлорпромазин (Cpз, у вигляді препарату Аміназин; 18,0 мкг/л, або 56 нмоль/л) (позитивний контроль) та суміш цих речовин відповідних концентрацій при 18 °С (RnCpз), а одну групу піддавали впливу лише акваріумної води та вважали контрольною (С). Експозиція тривала протягом 14 днів, зміну води та поновлення концентрації речовин здійснювати кожні дві доби.

У третій дослідній серії досліджували вплив Раундапу, цинку, Zn-хелатору ТПЕНу окремо, а також у комбінації цинку з Раундапом та цинку з ТПЕНом з використанням експериментальної моделі *ex vivo*. Умови інкубації *ex vivo* підбиралися за рекомендаціями як описано El Naj та ін. (2019), але були скореговані щодо температурного режиму та часу інкубації (Khoma et al., 2020b). Зокрема, у попередньому дослідженні *ex vivo* нами було показано, що тривала інкубація зразків у дослідному середовищі за кімнатної температури призводить до втрати біологічної активності та не відповідає умовам зберігання протеїнів. Крім того, на підставі попереднього дослідження було обгрунтовано коректну концентрацію Раундапу, яка є сумісною з еквівалентними концентраціями інших чинників (йонів цинку та ТПЕНу) та апробована у експериментах на культурі клітин (Yang et al., 2015). Зразки травної залози (окремо для кожного аналізу) піддавали впливу відповідної речовини у розчині Рінгера для молюсків (в г/л, 8 NaCl, 0,2 KCl, 1,4 Na₂HPO₄ і 0,272 KH₂PO₄ (pH 7,4)), кожної у концентрації 3 мкМ: Раундап (Rn, формула Roundup MAX, Монсанто, США, розрахований як 3 мкМ гліфосату з урахуванням того, що 1 л Раундапу містить 450 г (2,66 М) гліфосату), ZnCl₂ (Zn), Zn-хелатор ТПЕН (Tr, N,N,N',N'-тетракіс(2-піридилметил)етилендіамін) та їх комбінації ZnT або ZnRn. Інкубація тривала протягом 17 год (2 год при ~ 20°С та 15 год при ~ 2-4°С). Для кожної дослідної групи кількість зразків становить 6-8, що забезпечує статистично обгрунтовані результати. Після завершення інкубації готували гомогенати та піддавали їх біохімічному аналізу, а частину тканини масою 30

мг використовували для визначення стабільності лізосомальних мембран. Зразки, поміщені в розчин Рінгера, використовували як контроль (С).

Світлопоглинання вимірювали на спектрофотометрі UV/Vis ULAB 102UV. Для досліджень використовувались реактиви за ступенем чистоти Reagent (реактивної чистоти) та вище, отримані від компаній Sigma-Aldrich (США) або Синбіас (Україна).

2.2. Виділення та аналіз металотіонеїнів

2.2.1. Виділення металотіонеїнів як термостабільних протеїнів

Виділення металотіонеїнів (МТ) проводили методом гель-проникної хроматографії, принцип якого полягає у розділенні молекул речовин за розмірами (молекулярними масами) за рахунок їх різної здатності проникнення в пори гелеподібного матеріалу (нерухомої фази), поміщеного у хроматографічну колонку. 10% гомогенат тканини в 10 мМ трис-НСl буфері, рН 8,0 із додаванням 10 мМ 2-меркаптоетанолу («Sigma- Aldrich») для попередження окиснення SH-груп (Coyle et al., 2001; Roesijadi & Fowler, 1991) та 0,1 мМ інгібітора протеаз фенілметилсульфонілфториду (ФМСФ) («Sigma-Aldrich»), готували з об'єднаних однакових наважок тканини травної залози з шести тварин групи та центрифугували 45 хв при 16000 g та 4°C. Одержану надосадову рідину інкубували 5 хв при 85°C та повторно центрифугували в попередніх умовах. Отриманий супернатант, містить розчинні термостабільні сполуки.

Гель-хроматографія. Хроматографічну колонку розміром 50×1,5 см з охолоджуючим кожухом заповнювали нерухомою фазою – Sephadex-G50 («Sigma-Aldrich»), як елюент використовували 10 мМ трис-НСl буфер, рН 8,0, що містив 10 мМ 2-меркаптоетанолу, без додавання динатрієвої солі етилендіамінтетраоцтової кислоти (ЕДТА), щоб запобігти втраті металів, зв'язаних з протеїнами. Хроматографування проводили зі швидкістю проходження елюента 0,33 мл/хв, отримували при цьому 20 фракцій об'ємом по 5 мл. Оптичну густину досліджуваних зразків вимірювали на спектрофотометрі

ULAB 102 при довжинах хвилі 280 та 254 нм (D_{280} та D_{254}). Калібрування хроматографічної колонки проводили з використанням протеїнів відомої молекулярної маси: альбуміну (67 кДа), хімотрипсину (25 кДа), цитохрому С (12,3 кДа), інсуліну (5,8 кДа) (використані маркери фірми «Sigma-Aldrich»). МТ визначали як низькомолекулярні термостабільні протеїни із найбільшим показником співвідношення D_{280}/D_{254} (Roesijadi & Fowler, 1991). Після об'єднання двох МТ-вмісних фракцій (10 мл) реєстрували УФ спектр зразка, та визначали концентрацію металів.

2.2.2. Визначення за вмістом тіолів

Визначення загального вмісту МТ проводили за вмістом SH-груп у за методом Viarengo та ін. (1999). Принцип якого ґрунтується на взаємодії SH-груп з 5,5'-дитіо-біс-2-нітробензойною кислотою (ДТНБ) з утворенням 5-тіо-2-нітробензойної кислоти. Для цього готували 30 % гомогенат тканини травної залози в 20 мМ трис-сахароза буфері, рН 8,6. З додаванням суміші інгібіторів протеаз 0,5 мМ ФМСФ та 0,006 мМ лейпептину. Одержану суміш центрифугували протягом 45 хв при 12000 g 4°C. Та проводили екстракцію МТ з отриманого супернатанту в системі етанол-хлороформ. Концентрацію тіолів металотіонеїну (-SH), розраховували за допомогою молярного коефіцієнта екстинкції 5-тіо-2-нітробензоату ($\epsilon=14150 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), а концентрацію МТ обраховували, виходячи зі співвідношення: 20 моль GSH = 1 моль МТ та виражали в нмоль $\cdot \text{г}^{-1}$ вологої маси тканини.

Визначення концентрації металеваних МТ проводили за вмістом металів (цинку, купруму, та кадмію або тільки цинку), які зв'язуються з SH-групами МТ у метал-тіолатні кластери у стехіометричних співвідношеннях. Концентрацію обчислювали використовуючи модифіковане рівняння Гамільтона (основане на стехіометричних співвідношеннях зв'язування цих металів): $C(\text{MT-Me}) = M(\text{MT})[v(\text{Zn})/7+v(\text{Cu})/12]+v(\text{Cd})/7]$ та виражали в мкг/г маси вологої тканини, де v – кількість металу в металотіонеїнах, мкмоль/г тканини; $M(\text{MT})$ - молярна маса МТ (7000 мкг/мкмоль), 7 і 12 – кількість йонів цинку/кадмію (II) і купруму (I) відповідно, що можуть зв'язуються молекулою

МТ при повному насиченні (Nielson & Winge, 1985).

2.2.3. Визначення вмісту металів у металотіонеїнах та тканині

Концентрацію цинку вимірювали в тканині травної залози (100 мг) і в об'єднаному елюаті, що містить металотіонеїн, отриманому за допомогою хроматографії (об'ємом 10 мл), метод ґрунтується на спектрофотометричному вимірюванні концентрації продукту комплексоутворення 2-(5-бром)-2-піридилазо)-5-[N-пропіл-N-(3-сульфопропіл)аміно] фенолу динатрієвої солі дигідрату (5-Br-PAPS) з Zn(II) (Karaman & Menek, 2012; Wang et al., 2018). Щоб передбачити можливе розкладання 5-Br-PAPS у кислих розчинах (Karaman & Menek, 2012), рН дослідного зразка становило в діапазоні 5–11. Отримані проби сушили при 105°C протягом 24 год, розчиняли в нітратній кислоті, а потім упарювали до отримання золи. Після чого золу розчиняли в 1 % розчині трихлороцтової кислоти (ТХК) (0,5 мл), та додали 36 нМ 5-Br-PAPS (кінцева концентрація) у 200 мМ бікарбонатному буфері (рН 8,0) до кінцевого об'єму 2,5 мл. Суміш інкубували при 20 °С протягом 30 хв. Концентрацію металу оцінювали за оптичною густиною комплексу метал-5-Br-PAPS при 550 нм. Концентрацію цинку визначали за калібрувальною кривою. Концентрацію металу в тканині та МТ виражали як $\text{мкг} \cdot \text{г}^{-1}$ тканини.

Вміст купруму, кадмію та цинку у елюаті, отриманому в результаті хроматографії термостабільних протеїнів молюсків та тканині травної залози, вимірювали після спалювання зразків у перегнаній нітратній кислоті в співвідношенні 1:5 (маса:об'єм) та вимірювали на атомно-абсорбційному спектрофотометрі С-115, і виражали в $\text{мкг} \cdot \text{г}^{-1}$ тканини.

2.2.4. Електрофорез металотіонеїнів в поліактиламідному гелі.

Проводили електрофорез термостабільної фракції супернатанту у поліакриламідному гелі (ПААГ) згідно протоколу (Haider et al., 2012). Розчин термостабільних протеїнів отримували з 33% гомогенату тканини в 0,01 М буфері Tris-HCl, рН 8,0, що містив 10 мМ 2-меркаптоетанолу («Sigma-Aldrich») для запобігання окиснення SH-груп та інгібітора протеаз ФМСФ (0,1 мМ) («Sigma-Aldrich») (Roesijadi & Fowler, 1991).

Гомогенат готували об'єднуючи однакові наважки зразків тканини від усіх тварин досліджуваної групи, та здійснювали центрифугування впродовж 45 хв при 10 000 об/хв. Отриманий надосад інкубували протягом 5 хв при температурі 85°C та центрифугували повторно у вище зазначених умовах. Для дослідження використовували термостабільний супернатант з сумішшю, що містила 100 мМ Трис-НСl (рН 6,8), 4% (об./об.) 2-меркаптоетанолу, 1% (мас./об.) SDS, 0,02% (мас./об.) Coomassie Brilliant Blue і 24% (мас./об.) гліцерину (1:1, об:об).

Електрофорез проводили використовуючи пластин з ПААГ з додаванням натрій додецилсульфату (SDS), при силі струму 20 А та напрузі 100 В. Фіксування та фарбування пластин ПААГ здійснювали за наступним протоколом:

1. Фіксували у розчині (40% етанол, 10% оцтова кислота, 50% H₂O) 1 год.;
2. Промивали у воді 30 хв.;
3. Сенсibiliзували у 0,02% розчині тіосульфату 1 хв.;
4. Промивали у воді 3 рази по 20 сек.;
5. Інкубували протягом 20 хв у 0,1% розчині нітрату срібла, що містив 0,02% формальдегіду;
6. Промивали у воді 3 рази по 20 сек.;
7. Інкубували у 3% карбонату до появи жовтого забарвлення;
8. Промивали гель у воді протягом 20 сек.;
9. Зупиняли фарбування в 5% оцтовій кислоті на 5 хв (Mortz et al., 2001).

Обробку електрофорограм здійснювали за допомогою програмного забезпечення GelAnalyzer 19.1.

2.3. Визначення вмісту глутатіону

Загальну концентрацію глутатіону (GSH t: відновлений + окислений, GSH і GSSG, відповідно) кількісно визначали за допомогою методу, який ґрунтується на спектрофотометричному визначенні продукту взаємодії ДТНБ з тіловою групою, з використанням глутаніонредуктази, яка за допомогою НАДФН відновлює окиснену форму глутатіону (Griffith, 1980). 10% сульфосаліцилову

кислоту для отримання безбілкового екстракту додавали у пропорції 1:3 до 20% (мас/об) гомогенату тканини у 0,1 М калій-фосфатному буфері рН 7,4, з додаванням 100 мМ КСІ та 1 мМ ЕДТА, а також 0,1 мМ ФМСФ; одержану суміш центрифугували (3 000 g, 4 °С, 5 хв). Аліквоту супернатанту (200 мкл) додавали до 2,3 мл 0,4 М буферу Трис-НСІ буфер рН 8,9, що містив 200 мкМ β -НАДФН і 1 мМ ДТНБ. Потім зразки перемішували та нагрівали до 30 °С на водяній бані протягом 5 хв. Для ініціювання ферментативної реакції додавали фермент глутатіонредуктазу (38 мкл при 50 одиницях/мл), та реєстрували швидкість утворення 5-тіонітробензойної кислоти спектрофотометрично при 412 нм кожні 30 с протягом 2 хв. Концентрацію GSH визначали за калібрувальною кривою та виражали в нмоль·г⁻¹ вологої тканини.

Щоб виміряти рівень GSSG, депротейнізований зразок (600 мкл) інкубували з 2-вінілпіридином (2-VP) перед аналізом у кінцевій концентрації 2-VP 2 % протягом 1 год. Концентрацію відновленого глутатіону (GSH) обчислювали шляхом віднімання концентрації GSSG від концентрації GSH т. Концентрацію GSSG визначали за калібрувальною кривою та виражали в нмоль·г⁻¹ вологої тканини. Окисно-відновний (редокс) індекс глутатіону (RI GSH) обчислювали як відношення концентрацій GSH та GSSG.

2.4. Оцінка стану системи антиоксидантного захисту

До антиоксидантних показників відносили загальну антиоксидантну активність, ензими супреоксиддисмутази (СОД) та каталази (КАТ), які визначали у розчинній фазі гомогенату, отриманій у результаті його центрифугування протягом 10 хв. при 6 000 g.

2.4.1. Супероксиддисмутазна активність

Активність супероксиддисмутази (СОД) [КФ 1.15.1.1] вимірювали за зниженням швидкості відновлення нітротетразолію синього (НТЗС) у присутності 6,3 мкМ рибофлавіну відновленого, 3 мМ метіоніну та 30 мкМ ЕДТА (Fried, 1975). Для аналізу відбирали 0,5 мл 10% гомогенату в 50 мМ К-Р буфері рН 7,4. Після цього центрифугували 6000 об/хв 10 хв. Для аналізу використовували супернатант. Рибофлавін додавали останім, пробірки

струшували і опромінювали контроль (містив усі компоненти, що й дослідна проба, окрім НТЗС), стандарт (містив усі компоненти, що й дослідна проба, окрім супетнатанту) та дослідні проби флуоресцентною лампою (400 люкс, 15 В) 20 хв у боксах, вкритих алюмінієвою фольгою. Світлопоглинання міряли при 560 нм проти холостої проби, яка містила всі компоненти окрім центрифугату і НТЗС та не була опромінена. СОД-ну активність розраховували за формулою: $A = (D_{\text{стандарту}} - (D_{\text{дослід}} - D_{\text{контроль}})) \times d / C_{\text{протеїну}}$, де $D_{\text{стандарту}}$ – світлопоглинання стандартної проби, $D_{\text{дослід}}$ – світлопоглинання дослідної проби, $D_{\text{контроль}}$ – світлопоглинання контрольної проби, d – розведення біологічного матеріалу, $C_{\text{протеїну}}$ – концентрація протеїну в дослідному супернатанті. Активність ензиму виражали в умовних одиницях (у.о.·мг⁻¹ протеїну). За у.о. приймали активність ензиму, яка здатна викликати зниження оптичної густини в процесі відновлення нітротетразолію синього в дослідній пробі на 50 % в розрахунку на 1 мг розчинних протеїнів тканини.

2.4.2. Активність каталази

Активність каталази (КАТ) [КФ 1.11.1.6] визначали у розчинній фазі гомогенату за методом, який ґрунтується на зменшенні оптичної густини при 240 нм при розкладі H₂O₂ за впливу КАТ (Аebi, 1974). Досліджувана суміш містила 15 мМ H₂O₂, 50 мкг протеїну у 50 мМ К-фосфатному буфері, рН 7,0 в загальному об'ємі 3,0 мл. Реакцію ініціювали додаванням супернатанту і вимірювали поглинання при 240 нм з 60-секундним інтервалом. Каталазну активність обчислювали з використанням мілімолярного коефіцієнта світлопоглинання H₂O₂ ($\epsilon=0,04 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) і виражали в мкмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ протеїну.

2.4.3. Загальна антиоксидантна активність

Загальну антиоксидантну АВТС-генеровану ємність у тканинах визначають за методом Re та ін. (1999). АВТС^{•+} радикали попередньо генерують персульфатом калію з 2,2-азино-ді-[3-етилбензтіазоліну сульфонату] (АВТС), для чого до 1 мл 4,9 мМ розчину персульфату калію додають 1 мл 14 мМ розчину АВТС та інкубують 16 годин у темряві. До 1,9 мл розчину АВТС^{•+}

додають 0,1 мл 10% гомогенату тканини, та вимірюють світлопоглинання при 732 нм проти дистильованої води через 1 та 6 хвилин після цього. Початкова оптична густина розчину АВТС^{•+}-катион радикалів становить близько 0,7, який використовували за контроль. Результати обчислюють або за різницею оптичних густин розчину АВТС^{•+} та дослідної проби та виражають у відсотках (%) інгібування АВТС^{•+}-катион радикалів: $\% = (D_{\text{АВТС}^*} - D_{\text{дослід}}) / D_{\text{АВТС}^*} \times 100\%$, де $D_{\text{АВТС}^*}$ – оптична густина розчину АВТС^{•+} катион радикалів; $D_{\text{дослід}}$ – оптична густина суміші розчину АВТС^{•+} катион радикалів та дослідного зразка через 6 хв, або з використанням молярного коефіцієнта екстинції АВТС^{•+} ($15000 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) та виражали в мкмоль АВТС^{•+} · г⁻¹ тканини.

2.4.4. Утворенні продуктів окисного ураження ліпідів та протеїнів

Стан окисного ушкодження ліпідів та протеїнів оцінювали у спільній пробі гомогенату тканини. Для визначення брали 0,5 мл 10 % гомогенату в 50 мМ К–фосфатному буфері, рН 7,4. та додавали 1 мл 20% сульфосаліцилової кислоти (SSA), після чого реакційну суміш відцентрифугували (15 хв, 4000). Надосад використовували для визначення продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), а осад – окисних модифікацій протеїнів (ОМП).

Для характеристики ПОЛ вимірювали утворення ТБК-активних продуктів (ТБК-АП) в реакції з 2–тіобарбітуровою кислотою (ТБК) для чого 1,5 мл надосаду переносили в пробірки, додавали по 1,5 мл 0,7 мМ розчину ТБК у 0,1 М НСІ і поміщали проби на 20 хв в киплячу водяну баню. В якості контролю використовували проби, що містили замість надосадової речовини 50 мМ К–Р буферний розчин (рН 7,4). Утворення ТБК–АП обчислювали за інтенсивністю поглинання забарвленого у рожевий колір комплексу при 532 нм за молярним коефіцієнтом екстинції комплексу ($\epsilon = 1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) і виражали у мкмоль · г⁻¹ тканини (Ohkawa et al., 1979).

Окисні модифікації протеїнів (ОМП) визначали за їх здатністю утворювати 2,4-динітрофенілгідрозони при інкубації проб в присутності 0,1М 2,4-динітрофенілгідрозину (ДНФГ) в 2М НСІ (Reznick & Packer, 1994). До одержаного з 0,5 мл 10% гомогенату – осаду додавали по 1 мл 0,1М 2,4-

динітрофенілгідразину (ДНФГ) в 2М НСІ, попередньо профільтрованого, а в контрольні – по 1 мл 2М НСІ. Проби інкубували 1 год при 37⁰С, а далі центрифували 10 хв при 3000 об/хв. Одержаний осад промивали тричі 5% ТХО (по 3 мл), кожний раз старано ресуспендуючи осад скляною паличкою. До одержаного осаду добавляли 5 мл 8М розчину сечовини, витримували 15 – 20 хв у киплячій водяній бані до повного розчинення. В разі наявності каламуті, реакційну суміш центрифугували в попередньому режимі і використовували надосад. Оптичну густину утворених карбонілів реєстрували при 370 нм проти контролю. На основі молярного коефіцієнту екстинції ($2,1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) обраховували вміст фенілгідразонів при 370 нм. Вміст карбонілів виражали в мкмоль·г⁻¹ тканини.

2.5. Визначення показників токсичності

2.5.1. Характеристика стабільності лізосомальних мембран

Стабільність лізосомальних мембран клітин травної залози оцінювали за здатністю утримування лізосомами живих клітин катіонного барвника нейтрального червоного (НЧ) як описано El Naj та ін. (2019), 30 мг тканини травної залози інкубували протягом 1 год з розчином НЧ (0,04%, рН 7,3–7,4) для захоплення барвника клітинами, центрифугували при 270 g протягом 10 хв при 4⁰С і промивали для видалення незв'язаного барвника декілька разів розчином Рінгера. Тоді барвник екстрагували з інтактних клітин розчином оцтової кислоти (0,5%) та етанолу (50%). Вимірювали світлопоглинання при 550 нм проти розчину для екстракції (контроль). Результати виражають як величину світлопоглинання у розрахунку на г тканини.

2.5.2. Активність катепсину D

Катепсин D [КФ 3.4.23.5] – це одна з лізосомальних протеаз (катепсинів). Його вихід з лізосом свідчить про пошкодження лізосомальних мембран. Принцип методу оснований на спектрофотометричному визначенні кислоторозчинних продуктів ферментативного гідролізу гемоглобіну (Dingle et al., 1971). Наважку травної залози масою 250 мг подрібнюють та гомогенізують

у 0,5 мл 0,25М розчині сахарози. Після цього гомогенат розділяли для визначення вільної та загальної активності катепсину D.

Для визначення вільної (позалізосомної) активності катепсину D: відбирали 0,15 мл гомогенату додавали 0,15 мл насиченого розчину гемоглобіну одержану суміш перемішували та інкубували при 37°C протягом 30 хв, після чого додавали 0,6 мл 10%-го розчину трихлороцтової кислоти та 3,1 мл дистильованої води. Центрифугували 6000 об/хв 10 хв та вимірювали оптичну густину при 280 нм проти контролю. Для визначення загальної активності катепсину D: відбирали 0,15 мл гомогенату додавали 0,1 мл розчину тритону X-100, одержану суміш перемішували та інкубували при 37°C 10 хв, після чого додавали насичений розчин гемоглобіну 0,15 мл перемішували та знову інкубували при 37°C протягом 30 хв. До одержаної суміші додавали 0,6 мл 10% розчину трихлороцтової кислоти та 3 мл дистильованої води. Центрифугували 6000 об/хв, 10 хв і вимірювали оптичну густину при 280 нм проти відповідного контролю. Активність катепсину D виражали в $\text{нмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \text{мг}^{-1}$ протеїну.

2.5.3. Активність каспази-3

Для визначення активності каспази-3 [КФ 3.4.22] готували гомогенат тканини печінки у співвідношенні 1:3 v/v із сумішшю, яка містила 4% Тритон X-100, 5 мМ ЕДТА, 5 мМ дитіотреїтолу, 5 мМ MgCl_2 та 350 мкг/мл фенілметилсульфоніл флуориду. Інкубаційну суміш витримували протягом 10 хв на льоді. Центрифугували протягом 5 хв, 12 000 об/хв. До аліквоти супернатанту, що містила 100 мкг білка додавали 50 мкл буферу та 10 мкл 2 мМ розчину синтетичного тетрапептиду ацетил-Асп-Глу-Вал-Асп п-нітроаніліду та інкубували протягом 2 год. при 37 °C. Інтенсивність світлопоглинання, яка прямо пропорційна концентрації продукту гідролізу ацетил-Асп-Глу-Вал-Асп п-нітроаніліду каспазою 3 – п-нітроаніліну, визначавали при 405 нм. Активність каспази-3 обраховували з використанням мілімолярного коефіцієнту екстинції ($10,5 \text{ ммоль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) та виражали в $\text{пмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \text{мг}^{-1}$ протеїну або в $\text{нмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \text{г}^{-1}$ тканини (Du et al., 1997).

2.6. Вміст протеїну

Вміст протеїнів для перерахунку активності ензимів у тканині визначали у розчинній фазі гомогенату за методом Lowry та ін. (1951), який ґрунтується на здатності мідних похідних протеїна відновлюватись реактивом Фоліна з утворенням забарвлених продуктів реакції.

В чисту пробірку вносили 0,01 мл досліджуваного розчину. Доводили об'єм проби до 1 мл дистильованою водою. До проби додавали 4 мл лужного розчину купрум сульфату (реактив Б), який виготовляли безпосередньо перед визначенням, для чого змішували 50 мл 2% розчину карбонату натрію в 0,1 н натрій гідроксиду і 1 мл 0,5% розчину купрум сульфату в 1% розчині натрію – калію тартрату. Розчин перемішували та інкубували при кімнатній температурі на 10 хв. Потім додавали, перемішуючи, 0,4 мл 0,1 М реактиву Фоліна. Через 30 хв вимірювали оптичну густину при довжині хвилі 750 нм. Вміст протеїну в пробі визначали за калібрувальною кривою, побудованою на бичачому альбуміні і виражали в мг протеїну.

2.7. Статистичні методи аналізу результатів дослідження

Результати досліджень були виражені як середнє арифметичне \pm SD. Для всіх ознак розмір вибірки становив вісім осіб за виключенням аналізу металів у складі МТ, який здійснювали для двох повторностей у об'єднаних наважках тканини з п'яти екземплярів групи. Кожну наважку аналізували чотири рази. Для оцінки нормальності використовували тест Шапіро-Вілка. Дані аналізували за допомогою параметричного t-критерію Стьюдента, значущого при $p < 0,05$. Взаємозв'язок між біохімічними показниками оцінювали за допомогою кореляційного аналізу (коефіцієнт кореляції Пірсона r за вірогідності значення $p < 0,05$). Аналіз головних компонентів (РСА) був проведений для оцінки співвідношення між вимірними параметрами з використанням методу обертання Varimax з нормалізацією Кайзера. Канонічний дискримінантний аналіз був використаний для розрізнення експонованих груп за сумою ознак. Для розрахунків було використано програмне забезпечення IBM SPSS Statistics

версії 24 для Windows. Кореляція була значущою на рівні $p < 0,05$ ($\alpha > 0,304$) і $p < 0,01$ ($\alpha > 0,393$) (2-хвостий), $N=64$.

Інтегральний індекс біомаркерів (IBR), розроблений Beliaeff і Burgeot (2002) був розрахований для біомаркерів. Для розрахунку даних використовували індекси СОД, ТБК-АП, ОМП, GSH, GSSG, MTSH, NRR, Cas-3, CtDL, CtDe, та Zn/Cu з (I експериментальної серії), або СОД, КАТ, ТБК-АП, ОМП, NRR, MT-SH, Znt, GSH, GSSG, ABTS, Zn-MT, RI GSH (2 експериментальна серія). Стандартизація даних була досягнута розрахунком X_i : $X_i = (M_i - M_t) / SD_i$. Для розрахунку A_i обчислення даних проводилося з припущенням, що зміни значення що відповідають реакціям на стрес або токсичність: значення стандартизованого маркера (X_i) у контрольній групі було скориговано на нульовий. Значення IBR для кожної групи розраховували як $\{[(A_1 \times A_2)/2] + [(A_2 \times A_3)/2] + \dots + [(A_n \times A_1)/2]\}$. Оскільки значення IBR залежить від кількості маркерів, назване значення IBR було надано як IBR/n , де n – кількість врахованих показників, згідно з рекомендацією Broeg і Lehtonen (2006).

За результатами показників системи антиоксидантного захисту обчислювали інтегральний показник антиоксидантно-прооксидантного балансу (АПБ) як відношення сум показників стану антиоксидантного (А) і прооксидантного (П) статусу після уніфікації даних: $АПБ = \Sigma A / \Sigma П$ (Столяр та ін., 2016). Кожний показник визначали за формулою: $(M_d - M_k) / M_k$, де M_d і M_k – середньоарифметичні значення показників відповідно дослідної і контрольної серій. До “А” відносили такі показники, як активність СОД, КАТ, загальну антиоксидантну активність, вміст GSH та MTSH; до “П” – вміст GSSG, ТБК-АП та ОМП.

РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Умови хроматографічного виділення металотіонеїнів з гомогенату травної залози двостулкового моллюска

3.1.1. Умови елюювання металотіонеїнів методом гель-розподільної хроматографії

Проблема виділення та кількісного визначення форм МТ у біологічних зразках методом гель-розподільної хроматографії пов'язана з окисненням цих протеїнів в аеробних умовах, яке супроводжується вивільненням металу з тіолатних кластерів (Isani & Carpenè, 2014). При дослідженні для забезпечення відновних умов, властивих для клітинного середовища, використовують 2-меркаптоетанол, що запобігає окисненню МТ під час їх виділення (Nielson & Winge, 1985). Згідно методики виділення МТ, для збереження металованої форми МТ, у систему не додається ЕДТА, яка вступає в реакцію з катіонами металів та утворює солі етилендіамінтетраацетати (Roesijadi & Fowler, 1991). Разом з тим, застосування методу гель-розподільної хроматографії передбачає використання консервантів для довготривалого зберігання гелів, зокрема азиду натрію, для захисту від мікроорганізмів (Deppert & Lukašin, 2000). Відтак, незважаючи на те, що методика виділення МТ з термостабільного екстракту методом гель-розподільної хроматографії розроблена у деталях (Roesijadi & Fowler, 1991; Coyle et al., 2001), виконання нашого експерименту потребувало уточнення її умов щодо складу елюенту стосовно МТ моллюска перлівниці.

Методом гель-розподільної хроматографії з термостабільного супернатанту гомогенату травної залози у контрольній групі моллюсків 1-ї дослідної серії виділили фракцію, яка містила протеїни з молекулярною масою близько 8 кДа. Речовини даної фракції були визначені як такі, що містять МТ, ґрунтуючись на їх спектральних характеристиках (наявність піку при 245 нм, властивого для металтіолатних кластерів), термостабільності (денатурація не відбувається при 85-90° С протягом 5-10 хв) та малій молекулярній масі (Рис. 3.1.1.1.A) (Roesijadi & Fowler, 1991). Елюцію здійснювали різними елюентами згідно методики.

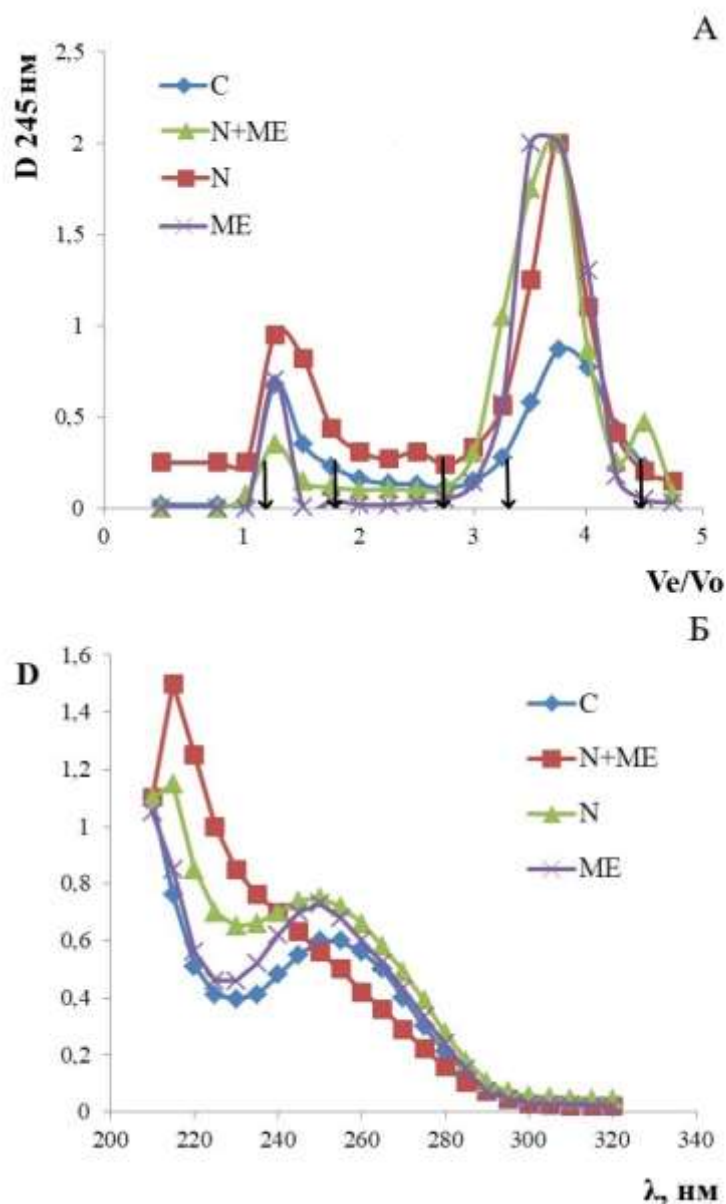


Рис. 3.1.1.1. Хроматографічні характеристики термостабільних супернатантів з травної залози молюска *U. tumidus* при використанні різних елюентів: профілі елюцій на Сефадексі G-50 (А) та УФ-спектри низькомолекулярних фракцій (Б).

Примітка. Тут стрілки позначають V_e/V_0 маркерів: 25,8 кДа, 17,0 кДа, 12,3 кДа, 8,4 кДа, 3,4 кДа мають параметри елюції 1,1; 1,8; 2,75; 3,3; 4,5 V_e/V_0 відповідно. Дослідні зразки: С – елюент 10 мМ трис-НСІ буфер, рН 8,0; N+ME – елюент 10 мМ трис-НСІ буфер, рН 8,0, який містив 10 мМ 2-меркаптоетанолом та 5мМ азиду натрію; N – елюент 10 мМ трис-НСІ буфер, рН 8,0, який містив 5мМ азиду натрію; ME – елюент 10 мМ трис-НСІ буфер, рН 8,0, який містив 10 мМ 2-меркаптоетанолу.

На хроматограмах (Рис. 3.1.1.1.А) термостабільних супернатантів експериментальних груп С, N, та ME не спостерігали інших додаткових піків, характерних для низькомолекулярних речовин, що демонструє відсутність умов для олігомеризації чи руйнування МТ. Однак у групі N+ME виявлено додатковий пік низькомолекулярних протеїнів (~4 кДа), що свідчить про частковий гідроліз МТ, ймовірно, до окремих доменів (Nam & Kim, 2017).

Гідроліз МТ до однодоменних фрагментів спостерігається за умов *in vivo* та при порушенні протоколу виділення (Sutherland et al., 2012). Крім того, однодоменні металотіонеїни також зафіксовані як продукт посттрансляційної модифікації у деяких безхребетних (Calatayud et al., 2021). Присутність двох реакційно активних реагентів, а особливо азиду, може сприяти проходженню такого часткового гідролізу МТ на домени (Sutherland et al., 2012). Ми не знайшли інформації щодо гідролітичної здатності азиду, але він має властивість утворювати солі металів, а відтак, на нашу, думку, може спричинити утворення апотіонеїну з відщепленням йонів металу від МТ у присутності меркаптоетанолу, а така форма МТ, може легше розпадатися на два домени.

Співвідношення оптичних густин при 254 нм та 280 нм (D_{254}/D_{280}) низькомолекулярних фракцій були у межах 2,7-3,2 у всіх зразках. Однак спектри оптичної густини в ультрафіолетовій спектральній області (УФ-спектри) цих фракцій мали відмінності (Рис. 3.1.1.1. Б). Більше того, для МТ-вмісної фракції зразка N+ME, у спектрі не виявлено типового піку, властивого для металотіолатних доменів, а для МТ-вмісної фракції зразка N цей пік виявлявся менш виражений у порівнянні з контролем та фракцією зразка ME. Крім того, в МТ-вмісній фракції контрольного зразка максимум такого піку зміщується в середню ділянку УФ-випромінювання від характерного положення. Отже, дія азиду на МТ виявлялась за спектральними характеристиками втрати метал-тіолатних кластерів. Відтак, згідно з хроматографічними властивостями, елюент, який містив 10 мМ 2-меркаптоетанол, був найбільш підходящим для елюції металовмісних МТ. Оскільки, 0,02 - 0,03% розчин азиду натрію зазвичай використовують для довготривалого зберігання та багаторазового використання

гелю Сефадексу, відповідно, наше дослідження продемонструвало, що необхідною умовою для виділення МТ методом гель-розподільної хроматографії є ретельна промивка гелю перед проведенням дослідження з метою видалення азиду натрію.

3.1.2 Вплив компонентів елюенту на склад металів у металотіонеїн-вмісній фракції

Як показало визначення складу металів у елюаті, у складі фракції МТ термостабільного супертантанту з гомогенату травної залози молюсків, виділеній з використанням чотирьох елюентів, Zn був основним металом при елюції кожним з елюентів. Проте, у зразку N його відсотковий вміст у співвідношенні із Cu та Cd був найвищим (Табл. 3.1.2.1., Рис. 3.1.2.1.). При наявності 2-меркаптоетанолу в елюенті рівень Zn та Cu в МТ був найменшим у порівнянні з трьома іншими складами фракції. Співвідношення вмісту Cu і Cd в МТ було різним для 4 груп через коливання концентрації Cu, тоді як рівень Cd був стабільним.

Таблиця 3.1.2.1. Склад металів у МТ травної залози *U. tumidus* залежно від складу елюента елюента, $\text{мкг} \times \text{г}^{-1}$ вологої маси тканини, $M \pm SD$, $n=3$

Метал	Склад елюенту			
	С	N+ME	N	ME
Zn	42,4±2,8 ^a	20,9±2,8 ^b	86,3±3,7 ^c	35,7±1,9 ^d
Cu	0,75±0,12 ^a	0,21±0,05 ^b	0,21±0,04 ^b	0,11±0,03 ^c
Cd	0,71±0,12 ^a	0,71±0,14 ^a	0,84±0,12 ^a	0,69±0,11 ^a

Примітка. Дослідні зразки: С – елюент 10 мМ трис-НСІ буфер, рН 8,0; N+ME – елюент 10 мМ трис-НСІ буфер, рН 8,0, який містив 10 мМ 2-меркаптоетанолом та 5мМ азиду натрію; N – елюент 10 мМ трис-НСІ буфер, рН 8,0, який містив 5мМ азиду натрію; ME – елюент 10 мМ трис-НСІ буфер, рН 8,0, який містив 10 мМ 2-меркаптоетанолу. Різні буквенні індекси (a, b, c, d) відповідають значенням, які статистично-вірогідно відрізняються, $P < 0,05$.

Цю мінливість можна пояснити впливом 2-меркаптоетанолу, який забезпечує відновлений стан тіолів та, відповідно, структуру кластерів. При відсутності 2-меркаптоетанолу слід очікувати надлишку Zn та Cu у складі МТ, зв'язаних неспецифічно (так званий гіперметальований стан) (Sutherland et al., 2012; Wilhelmsen et al., 2002). З іншого боку, зв'язування Cd, як найбільш спорідненого до МТ йону із його типових лігандів, не залежало від умов елюції.

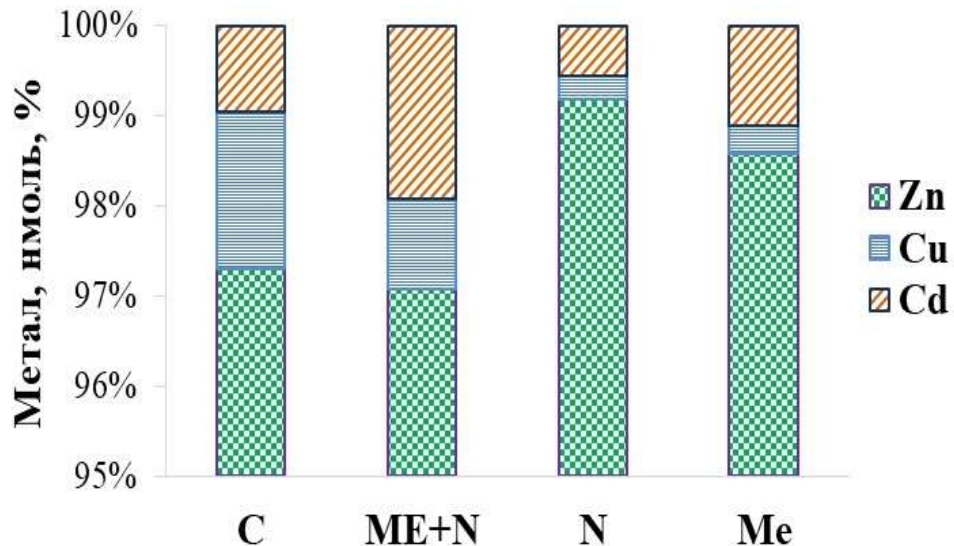


Рис. 3.1.2.1. Склад металів у металотіонеїнах травної залози *U. tumidus* за різних умов елюції, кількість Zn:Cu:Cd (%).

Примітка. Дослідні зразки: С – елюент 10 мМ трис-НСІ буфер, рН 8,0; N+ME – елюент 10 мМ трис-НСІ буфер, рН 8,0, який містив 10 мМ 2-меркаптоетанолом та 5мМ азиду натрію; N – елюент 10 мМ трис-НСІ буфер, рН 8,0, який містив 5мМ азиду натрію; ME – елюент 10 мМ трис-НСІ буфер, рН 8,0, який містив 10 мМ 2-меркаптоетанолу.

Відтак, аналіз умов хроматографічного виділення МТ, які забезпечують ознаки дводоменної структури та домінування цинку у складі металів, дозволив рекомендувати ретельну очистку гелю від азиду, що застосовується для його консервування, при виділенні МТ дотримуватися таких методичних вимог: супернатанти для виділення МТ зберігати при -40°C , додавати до супернатантів меркаптоетанол, який запобігає окисненню тіолових груп та

забезпечити розведення зразка тканини не більше як у співвідношенні 1:5 (20% гомогенат) (Coyle et al., 2001).

Підсумки до підрозділу

Експериментальний підбір оптимального складу елюента для виділення МТ методом гель-розподільної хроматографії, з метою збереження метал-кластерної структури МТ продемонстрував що лише елюент 10 мМ трис-НСІ буфер, рН 8,0, який містив 10 мМ 2-меркаптоетанолу забезпечує характерні специфічні хроматографічні ознаки МТ та збереження цинку у зв'язаній МТ формі. Окрім того, у нашому дослідженні доведено необхідність ретельно відмивати гель від протимікробного азиду натрію.

Представлені у підрозділі 3.1. результати опубліковано у статті (Khoma, 2019).

3.2. Функціональні характеристики металотіонеїнів *U. tumidus* за впливу на організм ксенобіотиків при різних температурних режимах у субхронічній експозиції

3.2.1. Реакція металотіонеїнів за впливу на організм диклофенаку, ніфедипіну та Раундапу поокремо та у суміші за двох температурних режимів

При дослідженні особливостей реакції МТ за впливу на організм лікарських препаратів диклофенаку та ніфедипіну, а також 80 нМ гербіциду Раундапу було припущено, що обрані чинники можуть впливати на металдепонувальну функцію МТ безпосередньо чи опосередковано, та визначати металдепонувальні, хроматографічні та відновні характеристики МТ (Peroza et al., 2013). Результати дослідження впливу забруднювачів на МТ травної залози двостулкового молюска показали, що при всіх експериментальних умовах, профіль елюції термостабільного супернатанту не мав принципових змін: при всіх умовах спостерігалось виділення двох фракцій – високомолекулярної (M_r близько 60 кДа), яка є результатом неповного видалення високомолекулярних протеїнів при пробопідготовці дослідних

зразків, та низькомолекулярної – МТ-вмісної, відповідно до таких її характеристик як термостабільність, Мг 7-8 кДа та високе співвідношенням оптичних густин D_{254}/D_{280} (2,2 проти 1,2 у високомолекулярної фракції), яке вказує на відсутність залишків ароматичних амінокислотних та присутність металтіолатних кластерів у складі протеїнів (Kägi & Schäffer, 1988).

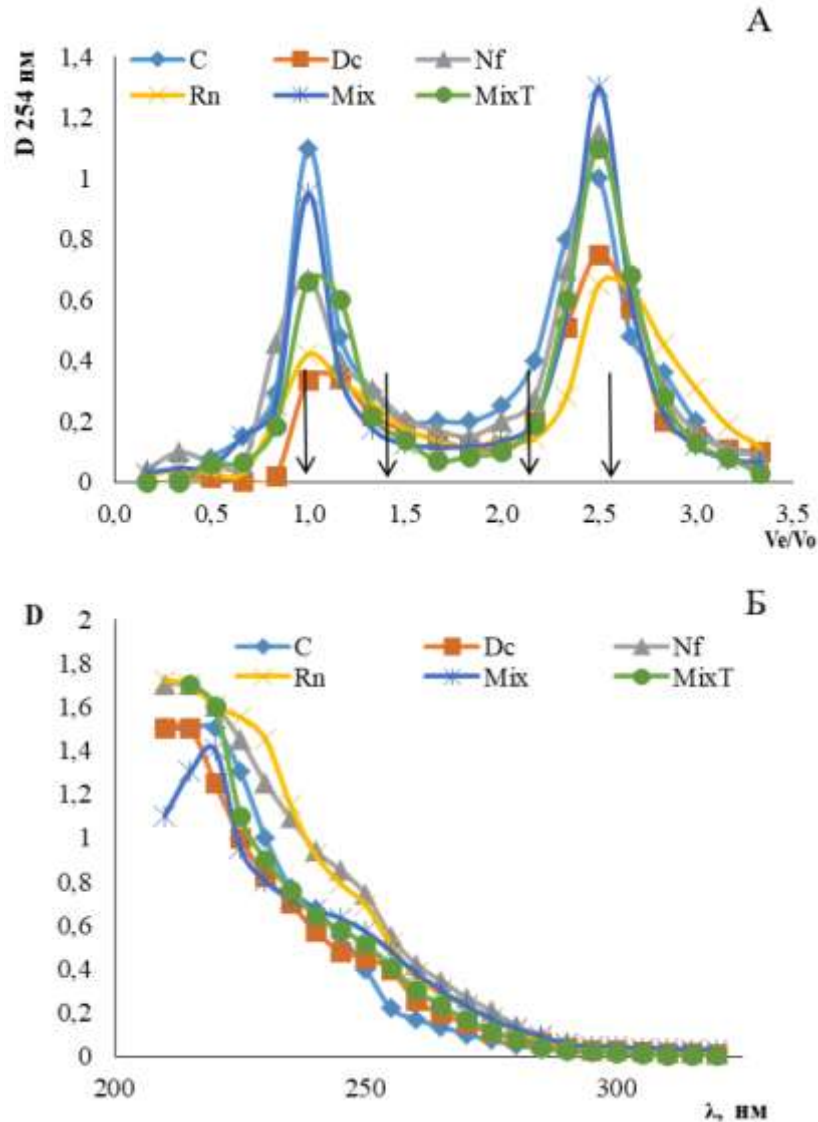


Рис. 3.2.1.1. Хроматографічні ознаки термостабільних супернатантів з травної залози молюска *U. tumidus* при дії на організм диклофенаку (Dc), ніфедипіну (Nf), 80 нМ Раундапу (Rn), їх суміші при температурах 18°C (Mix) та 25°C (MixT): профілі елюцій на Сефадексі G-50 (А) та УФ-спектри низькомолекулярних фракцій (Б).

Примітка. Тут стрілки позначають V_e/V_0 маркерів: 67,0 кДа, 25,0 кДа, 12,0 кДа, 5.8 кДа мають параметри елюції 1,0; 1,3; 2,2; 2,55 V_e/V_0 відповідно.

Вплив 80 нМ Раундапу та суміші ксенобіотиків при температурі 25°C викликали слабо виражені ознаки наявності проміжної фракції, яка може бути продуктом димеризації МТ під дією оксидантів (Рис. 3.2.1.1.А).

Аналіз УФ-спектрів МТ (Рис. 3.2.1.1.Б) виявив відмінності між групами, які пов'язані зі зміщенням максимуму поглинання в області 240-250 нм. У більшості дослідних груп, за виключенням групи, що зазнала дії диклофенаку, спостерігали зростання оптичної густини у дальньому ультрафіолеті. Хоча в гетерометалічних МТ складно виділити конкретний внесок окремо кожного металу, однак дослідження гомометалічних металотіонеїнів демонструє, що для Zn-тіолатних кластерів властиве плече з максимумом менше 240 нм, а наявність Cu-тіолатних кластерів проявляється як смуга поглинання вище 250 нм в сторону видимого світла (Scheller et al., 2018; Wilhelmsen et al., 2002). Тому, зміщення, яке спостерігали, може бути пов'язане зі зміною перерозподілу металів у складі метал-тіолатних кластерів МТ та змінах у металдепонувальній здатності тіолів цих кластерів (можливе утворення зшивок (-S-S-) (Wilhelmsen et al., 2002). Відтак, наступним завданням дослідження стало дослідити вміст та розподіл металів у тканині травної залози молюска.

МТ беруть участь у гомеостазі купруму та цинку, а також детоксикації кадмію в живому організмі. Зміни концентрації в тканині цих металів та їх гомеостазу є ознакою не лише наявності таких металів у експериментальному середовищі, але й відображають можливості організму до акумуляції їх з водного середовища та достатньої кількості молекулярних мішеней для зв'язування та транспортування всередину клітин (Calvo et al., 2017). Тому, не зважаючи на те, що серед експозиційних чинників були відсутні йони металів, ми дослідили концентрації цинку, купруму та кадмію у тканині та в складі МТ.

Результати дослідження показали, що акумулятивна здатність тканини до цинку зростає при дії на організм диклофенаку, а за впливу суміші при 25°C – зменшується (Рис. 3.2.1.2.А). При цьому концентрація цинку у МТ зростає в порівнянні з контролем за впливу диклофенаку та комплексної дії ксенобіотиків з підвищенням температури, а при дії Раундапу різко зменшується.

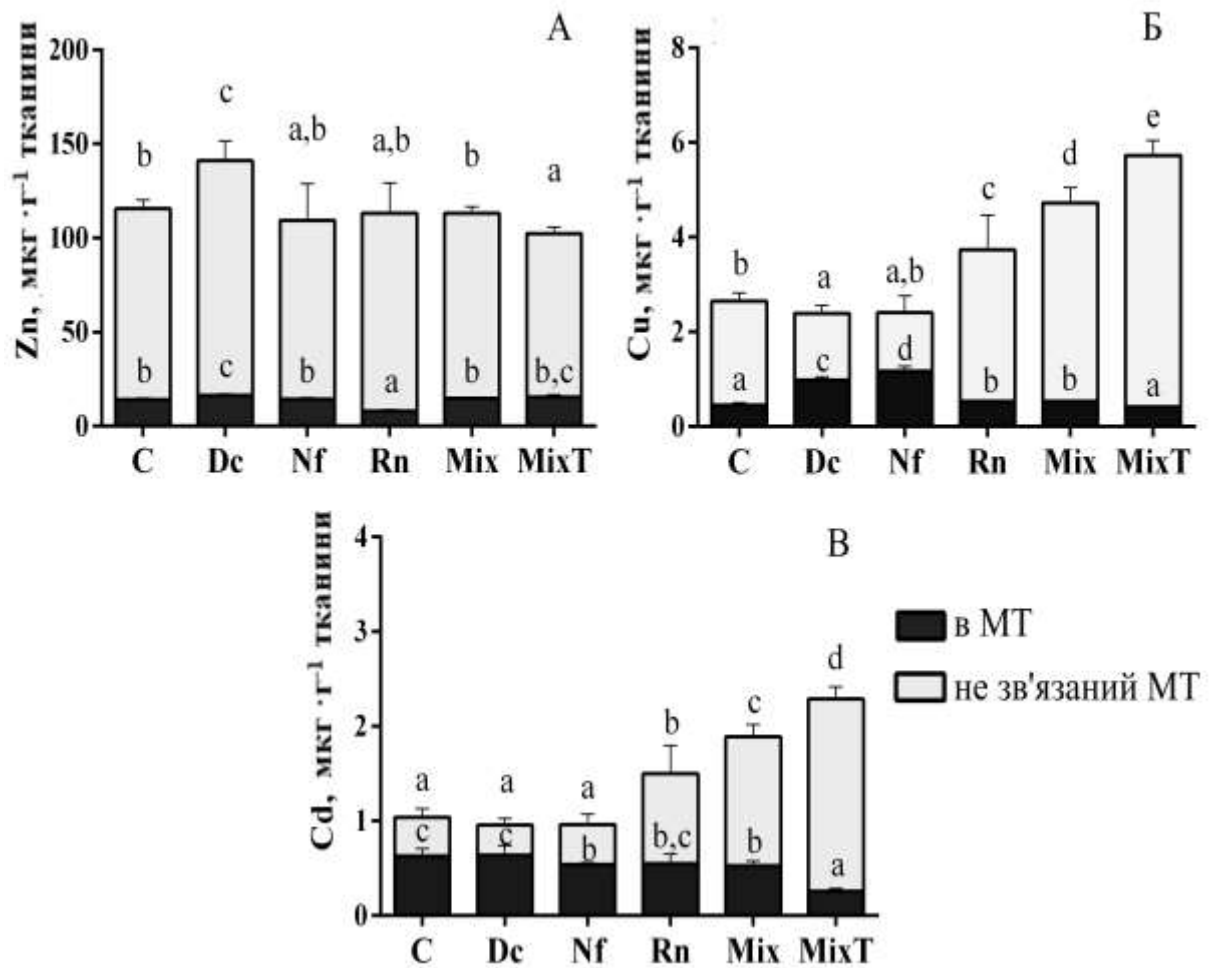


Рис. 3.2.1.2. Вміст цинку (А), купруму (Б), кадмію (В), та їх розподіл за участю МТ у тканині травної залози двостулкового молюска *U. tumidus*, мкг·г⁻¹ тканини при дії на організм диклофенаку (Dc), ніфедипіну (Nf), 80 нМ Раундапу (Rn), їх суміші при температурах 18°C (Mix) та 25°C (MixT), $M \pm SD$.

Примітка. Загальний вміст металу відповідає загальній висоті стовпчика, верхній буквенний індекс та SD відповідає загальному стовпчику, $n = 6$; метал у складі металотіонеїнів – нижня частина стовпчика, нижній буквенний індекс та SD позначено на нижній частині ($n = 3$). Тут і далі різні буквенні індекси (a, b, c, d, f) відповідають значенням, які статистично вірогідно відрізняються, $P < 0,05$.

Відтак, вміст цинку у складі МТ становить 12-13 % від загального вмісту у тканині в контрольній групі, за дії диклофенаку, ніфедипіну та суміші при

температурі 18°C, а за комплексного впливу ксенобіотиків при температурі 25°C вміст зростає до 15%, тоді як за дії 80 нМ Раундапу складає лише 6% від загального вмісту цього металу у тканині.

Для купруму спостерігаються значно помітніші відмінності (Рис. 3.2.1.2.Б). У всіх експозиціях, що містять 80нМ Раундапу, загальний вміст купруму у тканині травної залози зростає, а при спільному впливі факторів навіть вдвічі. Але вміст купруму у МТ в цих експозиціях не змінюється, а збільшується лише при дії диклофенаку та ніфедипіну. Відповідно відсоткова частка купруму в складі МТ у контрольній групі становить 16,5 % від загального вмісту у тканині, а за впливу ніфедипіну, диклофенаку, 80 нМ Раундапу та сумішей при двох температурах 49,3, 40,5, 13,3, 11,0 та 7,7% відповідно.

Аналогічні зміни спостерігаються для вмісту та розподілу кадмію (Рис. 3.2.1.2.В). При цьому, отримані результати підтверджують визначальну роль МТ у зв'язуванні цього металу у клітинах: на вміст кадмію у складі МТ припадає у контрольній групі 66,0% від загального вмісту цього металу в тканині травної залози, а при дії диклофенаку, ніфедипіну, 80 нМ Раундапу та сумішей при двох температурах припадає 72,0, 58,3, 36,6, 27,3 та 11,3% відповідно.

Отже, для купруму, який характеризується редокс-активністю та може спричиняти генерацію АФК у клітинах, та кадмію, який є високотоксичним металом, можливість акумуляції цих металів у відносно нетоксичній формі у складі МТ різко зменшується при дії Раундапу та Раундап-вмісних сумішей, особливо при поєднанні з тепловим фактором.

Співвідношення вмісту металів Zn:Cu вважають одним із діагностичних показників патологій, у тому числі і у людини (Arini et al., 2014; Bao et al., 2016) (Рис. 3.2.1.3). У нашому експерименті на частку Cu від вмісту цинку у контролі та за впливу фармацевтичних препаратів припадало від 1,72 до 2,29%, причому дія диклофенаку збільшувала співвідношення Zn:Cu порівняно з контролем. Здатність диклофенаку впливати на акумуляцію металів у клітинах відзначається у літературі (Refat et al., 2013). Проте, хоча і для диклофенаку, і для Раундапу повідомляється про властивість до адгезії металів, на рівні

тканини травної залози та МТ перлівниці вона проявляється протилежним чином: диклофенак призводить до збільшення вмісту цинку та зменшення вмісту купруму у тканині та МТ, а Раундап має протилежну дію. Вплив сумішей мав ефект аналогічний до впливу Раундапу: частка купруму зростала до 3,61% та до 5,65% від вмісту цинку, тобто відбулося значне (удвічі) зменшення співвідношення Zn:Cu у тканині. Такі зміни відображають кардинальні порушення метаболізму металів, окисно-відновного стану у клітинах та можуть бути пов'язані з впливом на транспортні системи металів. З іншого боку, за впливу сумішей у співвідношенні металів проявилась домінуюча дія Раундапу, посилена тепловим впливом, що може бути діагностичною ознакою токсичності Раундапу та призводити до порушення координації метаболічних процесів.

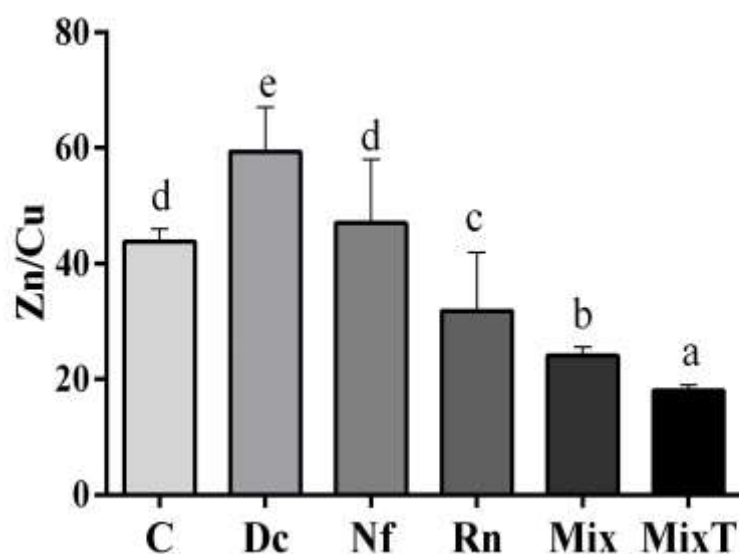


Рис. 3.2.1.3. Співвідношення вмісту Zn та Cu у тканині травної залози двостулкового молюска *U. tumidus* при дії на організм диклофенаку (Dc), ніфедипіну (Nf), 80 нМ Раундапу (Rn), їх суміші при температурах 18°C (Mix) та 25°C (MixT), $M \pm SD$.

Визначення вмісту загального протеїну МТ за кількістю SH-груп, виявило його збільшення в усіх експозиціях, зокрема у Раундап-вмісних експозиціях найбільше (на 26-58%) (Рис. 3.2.1.4.А). Обчислення концентрації металовмісної форми МТ у тканині показало (Рис. 3.2.1.4. Б), що вона зменшується на 43,2 %

порівняно з контролем при дії 80 нМ Раундапу. При цьому відбувається зміна не лише вмісту металованої форми МТ, але й часток металів у їх складі. Найвищий вміст купруму у складі МТ спостерігається при впливі 80 нМ Раундапу, а при комбінованому впливі ксенобіотиків та теплового чинника частка кадмію та купруму у МТ мінімальна, подібно до впливу диклофенаку (Рис. 3.2.1.4. В).

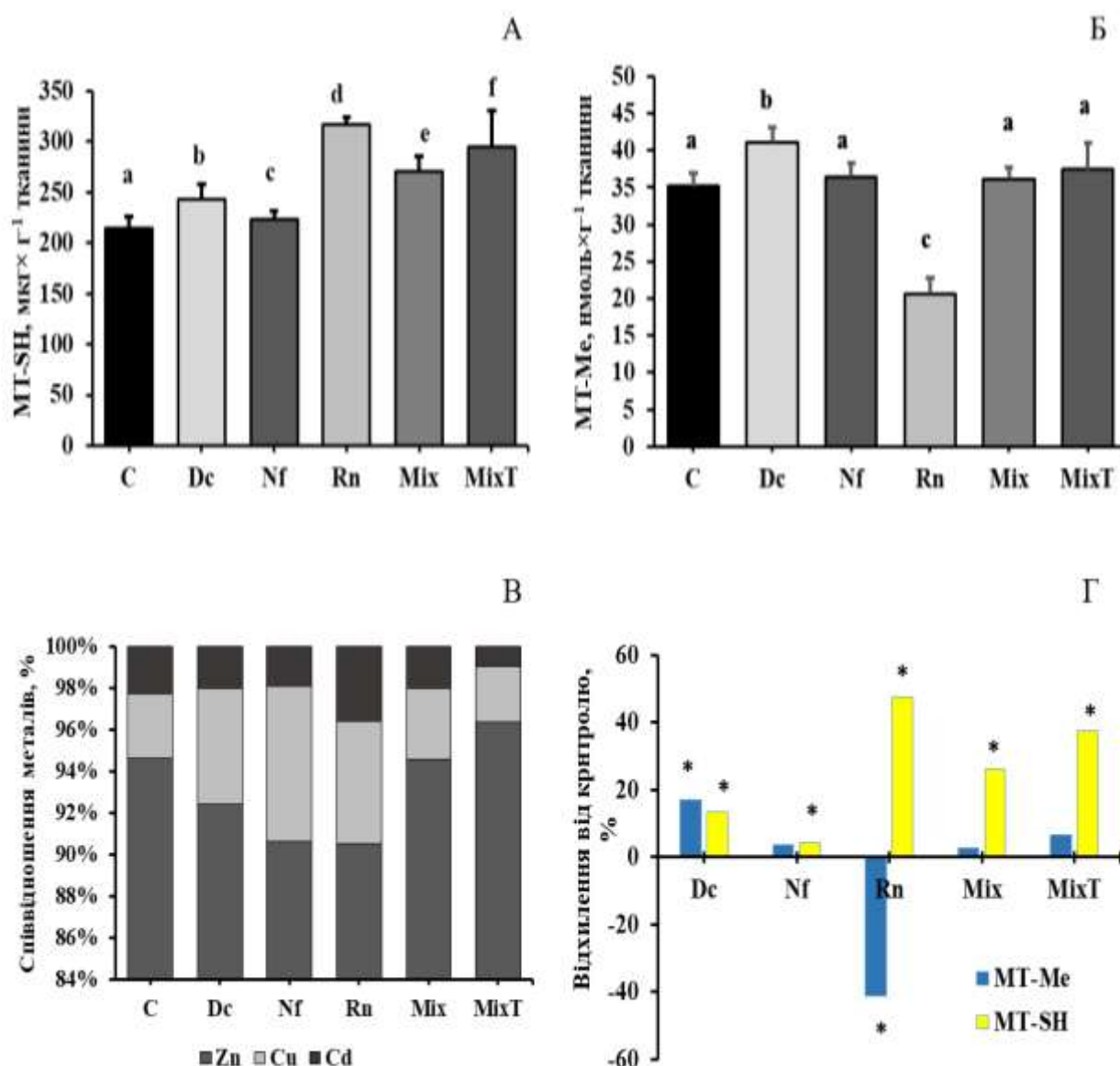


Рис. 3.2.1.4. Концентрація загального вмісту МТ (MT-SH) (А) їх металованої форми (MT-Me) (Б), співвідношення у ній металів (В) та зміни вмісту МТ (загальної та металованої форм) при дії на організм диклофенаку (Dc), ніфедипіну (Nf), 80 нМ Раундапу (Rn), їх суміші при температурах 18°C (Mix) та 25°C (MixT), $M \pm SD$.

Примітка. На рис. 3.2.1.4.Г * - вірогідні відмінності порівняно з контролем, $P < 0,05$.

Відтак, навіть при відсутності помітних змін у хроматографічних характеристиках МТ, їх здатність зв'язувати йони металів та брати участь у їх клітинному гомеостазі істотно змінюється, особливо за впливу Раундапу окремо та у поєднанні. Лише Раундап серед всіх експериментальних впливів виявляє здатність зменшувати вміст металюваного МТ, проте саме його присутність визначає зростання частки неметалюваного МТ (апо-форми) за комбінованого впливу ксенобіотиків.

Отже, аналіз концентрації та розподілу металів у тканині травної залози двостулкового моллюска *U. tumitus* при дії на організм диклофенаку, ніфедипіну, 80 нМ Раундапу, їх суміші при температурах 18°C та 25°C продемонстрував, що усі чинники, а особливо Раундап та суміш при тепловій дії можуть різко змінювати гомеостаз металів у тканині, їх розподіл між лабільною формою та молекулярними мішенями, і, тим самим, визначати функціональну здатність ензимів, які залежать від регуляторного впливу купруму та цинку, або містять їх у активних центрах, а також обмежувати захист клітин від дії токсичного металу кадмію.

3.2.2. Реакція металотіонеїнів за впливу на організм хлорпромазину та Раундапу поокремо та у суміші

Встановлення впливу 80 нМ Раундапу на метал-депонувальну функцію МТ потребувало більш системного вивчення цього феномену. Тому ми провели дослідження впливу удвічі меншої його концентрації, 40 нМ, поокремо та у поєднанні з тепловим впливом на препаратом хлорпромазином, відомим дією на мембранні метал-транспортні системи. У результаті гель-розподільної хроматографії термостабільного супернатанту гомогенату тканини травної залози (Рис. 3.2.2.1.А) були виділені низькомолекулярні фракції протеїнів, які за типовими характеристиками УФ-спектру, зокрема порівняно високим показником співвідношення D_{254}/D_{280} (Рис. 3.2.2.1.Б), молекулярною масою

близько 8 кДа та критерієм термостабільності були ідентифіковані як МТ-вмісні (Roesijadi & Fowler, 1991).

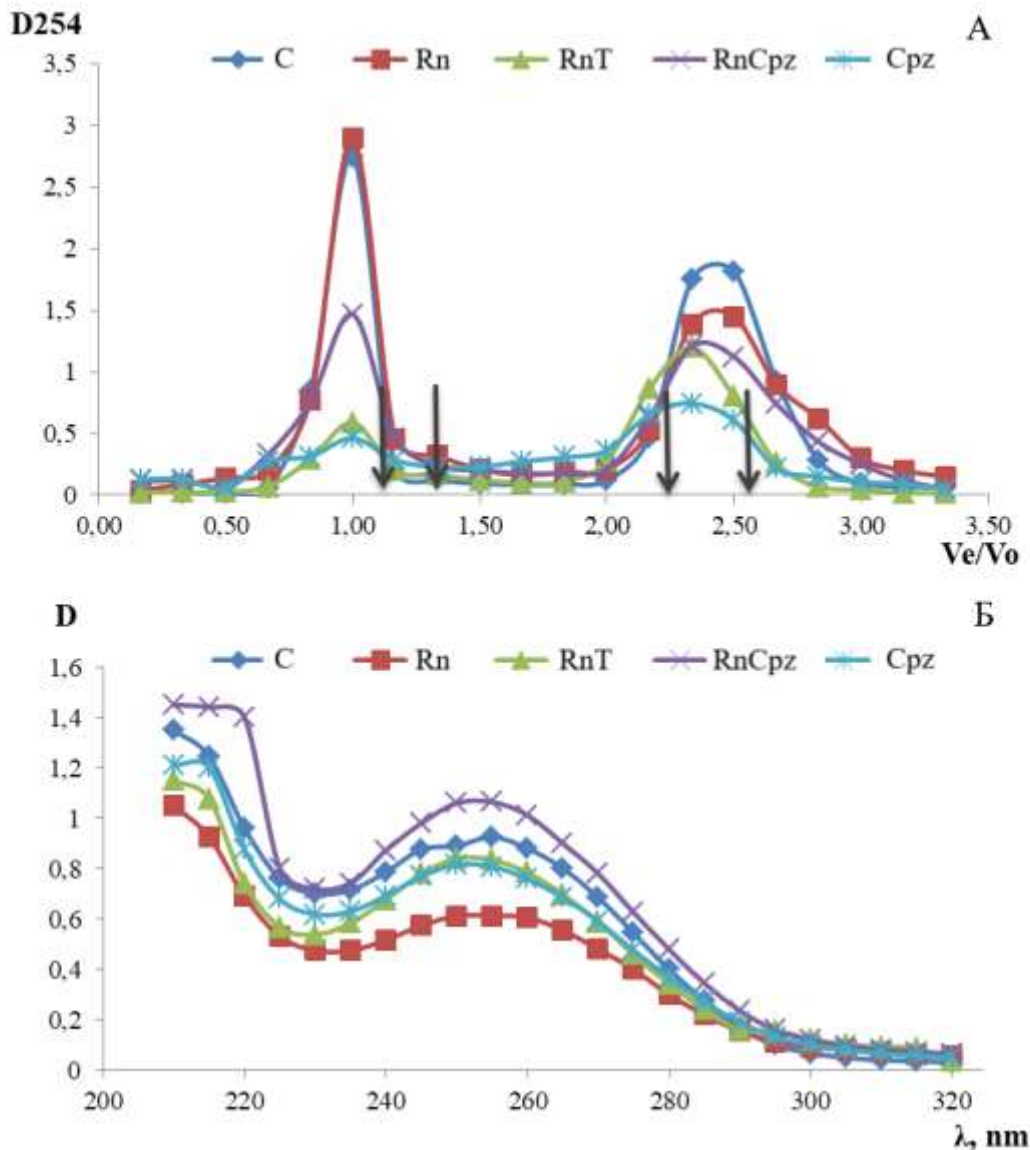


Рис. 3.2.2.1. Хроматографічні ознаки термостабільних супернатантів з травної залози молюска *U. tumidus* при дії на організм 40 нМ Раундапу при температурах 18°C (Rn) та 25°C (RnT), суміші 40нМ Раундапу з хлорпромазином (RnCpz) та хлорпромазину поокремо (Cpz): профілі елюцій на Сефадексі G-50 (А) та УФ-спектри низькомолекулярних фракцій (Б).

Примітка.. Тут стрілки позначають V_e/V_0 маркерів: 67,0 кДа, 25,0 кДа, 12,3 кДа, 5.8 кДа мають параметри елюції 1,0; 1,3; 2,2; 2,55 V_e/V_0 відповідно.

Як видно з рис. 3.2.2.1.А, у жодній з груп у цій експериментальній серії не спостерігали посилену гетерогенність фракцій, тобто не відзначали утворення

димерів металотіонеїнів, або руйнування їх до окремих доменів, що можливо за дії на організм екстремальних факторів (Romero-Isart & Vasák, 2002).

Отже, ми не виявили утворення різних форм МТ за молекулярною масою, які могли бути продуктом експресії різних генів або результатом посттрансляційної модифікації протеїнів шляхом гідролізу, або часткового окиснення дводоменної структури.

Як показано у дослідженнях, виконаних у НДЛ порівняльної біохімії та молекулярної біології, вплив різних факторів зовнішнього середовища призводить до непропорційних змін загального вмісту металотіонеїнів та їх металовмісної форми. Ці зміни можуть проявлятися як збільшення вмісту апометалотіонеїнів, так і збільшення рівня суперметалюваної форми (Столяр та інш., 2016; Gnatyshyna et al., 2019; Gnatyshyna, et al., 2020b). Порівняння цих показників МТ за різними кількісними критеріями було застосоване і у нашому дослідженні.

Результати показали, що концентрація загального протеїну МТ-SH збільшувалася в експериментальних групах, підданих впливу 40 нМ Раундапу, особливо при підвищеній температурі (на 57,7 %) (Рис. 3.2.2.2.А). Вплив хлорпромазину поокремо не викликав зміни концентрації цього протеїну, тоді як у суміші з Раундапом рівень МТSH збільшувався на 33,6 % порівняно з контрольною групою.

Рівень цинку у МТ, а отже, і рівень металовмісних МТ зріс у всіх дослідних групах, найбільше за впливу Раундапу при 25°C та хлорпромазину (Рис. 3.2.2.2. Б, Г). Порівнюючи визначену концентрацію загального МТ та концентрацію металовмісного МТ, приймаючи наближено, що єдиним металом у його складі є цинк, отримали результати, які демонструють, що на металювану форму МТ припадає 17,8-34,8 % від загального вмісту цього протеїну, а саме 20,5%, 20,4%, 19,8%, 17,8% та 34,8% відповідно у контролі, Rn-, RnT-, RnCrz- та Crz-групах.

Відтак, рівні металюваного металотіонеїну були приблизно однаковими (близько 20%) у контрольній групі та в усіх групах, які зазнали впливу 40 нМ

Раундапу, тому більша частина протеїну була в формі апометалотіонеїну, що сприяло його залученню до антиоксидантного захисту за рахунок незв'язаних тіолових груп. Рівень металованого МТ є значно вищим лише у молюсків, які піддавалися дії хлорпромазину (Рис. 3.2.2.2.Б.).

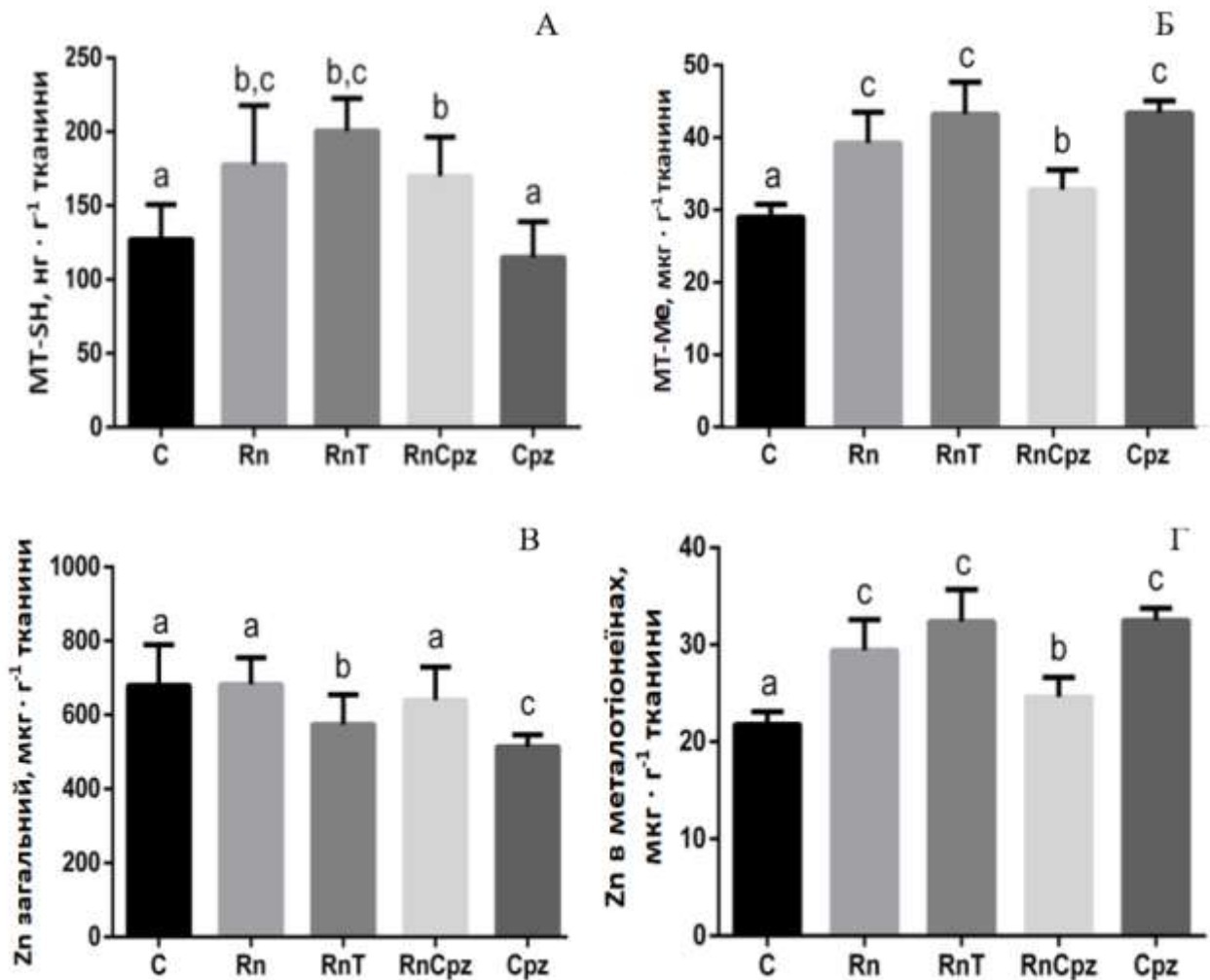


Рис. 3.2.2.2. Характеристики метаболізму цинку за участю МТ у тканині травної залози двостулкового молюска *U. tumidus* при дії на організм 40 нМ Раундапу при температурах 18°C (Rn) та 25°C (RnT), суміші 40 нМ Раундапу з хлорпромазином (RnCpz) та хлорпромазину поокремо (Cpz), $M \pm SD$, $n=8$.

Вимірювання вмісту цинку в тканині виявило іншу залежність (Рис. 3.2.2.2.В). Під впливом Раундапу та його комбінації з хлорпромазином змін порівняно з контрольною групою не спостерігали, тоді як під впливом Раундапу при 25°C та хлорпромазину поокремо вміст цинку в тканині

вірогідно зменшився (Рис. 3.2.2.2.В). Так, відсоткова частка цинку зв'язаного з МТ від загального вмісту цього металу в тканині, була найменша у контрольній групі та становила 3,12%, при впливі хлорпромазину вона зросла до 6,32%. Таким чином, хоча участь металотіонеїну в розподілі цинку в тканинах, здається малою, проте експозиційні чинники посилювали депонуючу роль МТ щодо цинку.

Важливо, що при застосованій досить низькій концентрації Раундап окремо не впливав на функції МТ, зокрема на їх роль як резервуару цинку в клітинах, тоді як його ефект посилювався при комбінованому впливі, особливо при збільшенні температури, що проявлялося обмеженням накопичення цинку в тканині, ймовірно через його адгезію з Раундапом у водному середовищі або на рівні всмоктування. Такий ефект був вище описаний для індивідуальної дії Раундапу удвічі більшої концентрації. Отже, температурний фактор посилює вплив навіть такої низької концентрації Раундапу.

Підсумки до підрозділу

Відтак, дослідження вмісту МТ та балансу його металованої форми стосовно загального вмісту МТ та вмісту цинку у тканині виявило залежні від природи чинника зміни цих показників. Зокрема, за дії на організм 40 нМ Раундапу було встановлено зменшення акумулювальної функції травної залози молюска щодо цинку лише у поєднанні з тепловим чинником, тоді як удвічі вища концентрація Раундапу зменшувала майже удвічі вміст металованої форми МТ. Препарати диклофенак та хлорпромазин призвів до підвищення акумуляції цинку в МТ. Вітак, кожний досліджений чинник впливав на концентрацію МТ, його метал-депонувальну функцію та вміст недепонованого металу у тканині, причому ефекти Раундапу та фармацевтичних препаратів були, здебільшого, протилежними. У комплексних експозиціях ефект Раундапу був домінуючим. Підвищення температури виявилось критичним фактором, що впливає на акумуляцію металу у складі МТ та його розподіл у клітині. Тому наступним завданням

стало оцінити ефективність антиоксидантного захисту у тканині молюска та ймовірність участі МТ у його забезпеченні.

Представлені у підрозділі 3.2. результати опубліковано у статтях (Khoma et al., 2020a, 2020c, 2021, 2022a)

3.3. Особливості стану системи антиоксидантного захисту та прояви окисного ураження молюска *U. tumidus* за впливу на організм ксенобіотиків при різних температурних режимах

3.3.1. Вплив диклофенаку, ніфедипіну та Раундапу поокремо та у суміші за двох температурних режимів на параметри системи антиоксидантного захисту та прояви окисного стресу

Забруднювачі навколишнього середовища часто проявляють прооксидантні властивості, які полягають у активації утворення АФК у тканинах організму та окисних uszkodженнях біомолекул. До прооксидантів, які генерують АФК, належать йони металів зі змінною валентністю (манган, ферум, купрум), радикал хлору, органічні речовини, зокрема феноли (Столяр та ін., 2016). З іншого боку, активація системи антиоксидантного захисту може бути результатом неспецифічного прояву відповіді на стрес, який викликаний фізичними чинниками, зокрема такими як аномальний температурний режим чи ендогенними метаболічними аномаліями (Lushchak et al., 2009; Warner, 2012). Низькомолекулярні тіоли, МТ та глутатіон, виявляють антиоксидантний потенціал та, водночас, високу чутливі до вплив прооксидантів на рівні вже існуючих форм та індукції синтезу (Krežel & Maret, 2017).

Дослідження функціонування МТ у створених експериментальних схемах вимагає оцінки успішності змін їх антиоксидантного потенціалу, який зростає в результаті дисбалансу загального вмісту та вмісту метальованої форми.

Першою лінією захисту від окисного стресу є низькомолекулярний тіол – трипептид глутатіон, що функціонує як протектор для більшості полютантів та, водночас, забезпечує транспорт йонів цинку між МТ та іншими клітинними мішенями (Krežel & Maret, 2017).

Як показало визначення концентрацій окисненої та відновленої форм цього тіолу та редокс-рівня глутатіону, ця складова антиоксидантного захисту активувалась за експериментальних умов. Загальний вміст глутатіону у тканині збільшувався за впливу всіх Раундап-вмісних чинників, окрім диклофенаку та ніфедипіну (Рис. 3.3.1.1.A).

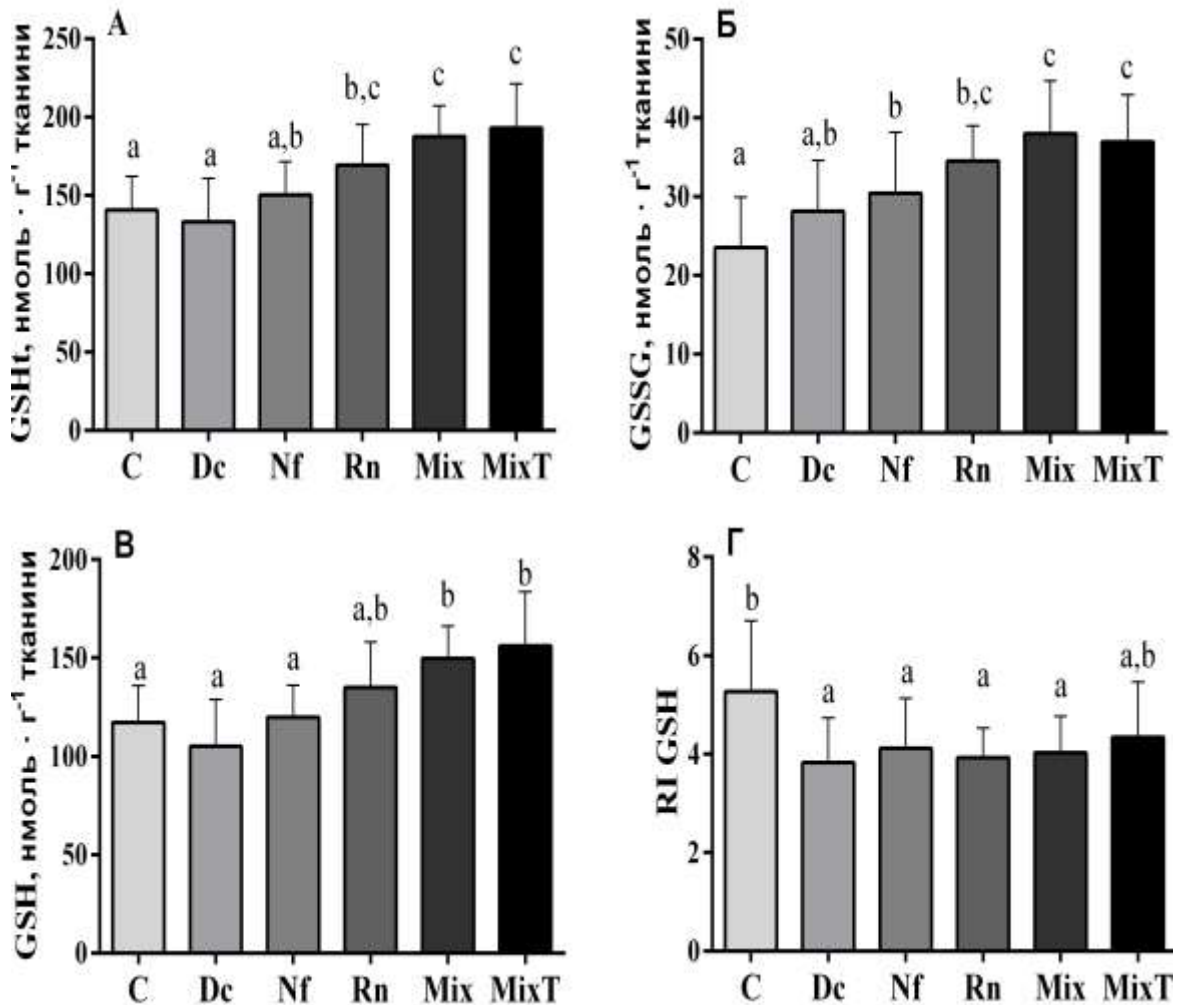


Рис. 3.3.1.1. Концентрація глутатіону (А-загального (GSHt); Б-окисненого (GSSG), В-відновленого (GSH)) та редокс-індекс глутатіону (RI GSH) (Г) у травній залозі молюска *U. tumidus* за впливу організм диклофенаку (Dc), ніфедипіну (Nf), 80 нМ Раундапу (Rn), їх суміші при температурах 18°C (Mix) та 25°C (MixT), $M \pm SD$, $n=8$.

Істотні зміни відбулися за дії суміші забрудників (рівень зріс на 33,3 та 36,9 % за температурних режимів 18°C та 25°C відповідно). Концентрація відновленого глутатіону зростала вірогідно при дії суміші забруднювачів при двох температурах (Рис. 3.3.1.1.B). Разом з тим, концентрація окисненої

форми глутатіону збільшувалася при дії всіх чинників, окрім диклофенаку, найбільше при комбінованих впливах (Рис. 3.3.1.1.Б). В результаті спостерігали зменшення редокс-індексу глутатіону порівняно з контролем (максимально на 26%) у всіх групах за виключення комбінованого впливу ксенобіотиків і температурного чинника (Рис. 3.3.1.1.Г). Така мобілізація системи глутатіону за впливу Раундапу та сумішей може бути індукована зростанням рівня АФК у тканині (Lushchak et al., 2009).

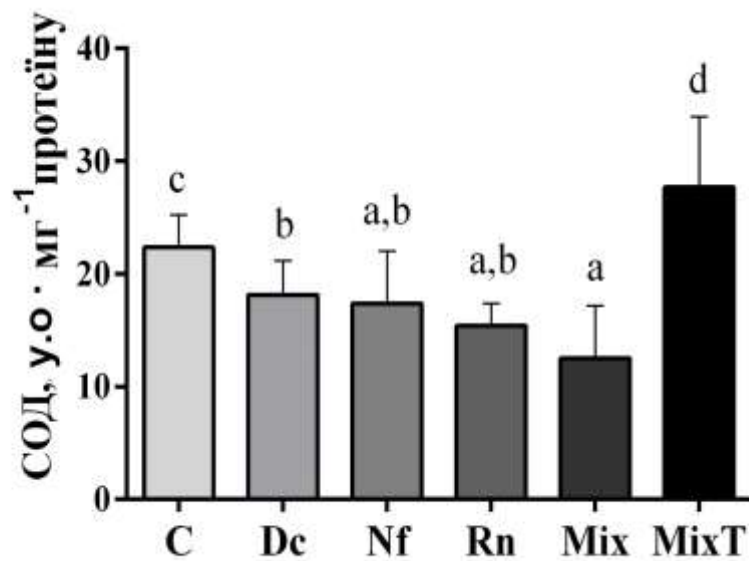


Рис. 3.3.1.2. Супероксиддисмутазна активність у травній залозі молюска *U. tumidus* за впливу організм диклофенаку (Dc), ніфедипіну (Nf), 80 нМ Раундапу (Rn), їх суміші при температурах 18°C (Mix) та 25°C (MixT), $M \pm SD$, $n=8$.

Однією з первинних АФК є супероксиданіон, а його знешкодження забезпечують ензими супероксиддисмутази. Як показують результати нашого дослідження, диклофенак, ніфедипін, 80 нМ Раундапу та суміш забруднювачів при температурі 18°C пригнічують активність СОД (Рис. 3.3.1.2.).

Відтак, Раундап та його суміші найпомітніше пригнічувалися СОД (за 18° С) та найбільше активували функціонування клітинного низькомолекулярного тіолу глутатіону, що одночасно призводило до його окиснення.

Щоби об'єктивно проаналізувати стан системи антиоксидантного захисту, потрібно з'ясувати баланс між антиоксидантами та прооксидантними проявами. Зокрема, результати визначення рівня продукту перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) (Рис. 3.3.1.3. А) продемонстрували, що всі досліджені ксенобіотики викликають збільшення утворення кінцевого продукту ПОЛ – малонового діальдегіду, визначеного як ТБК-АП. Проте найбільше зростання на 42,5 % порівняно з контролем спостерігали за впливу 80 нМ Раундапу.

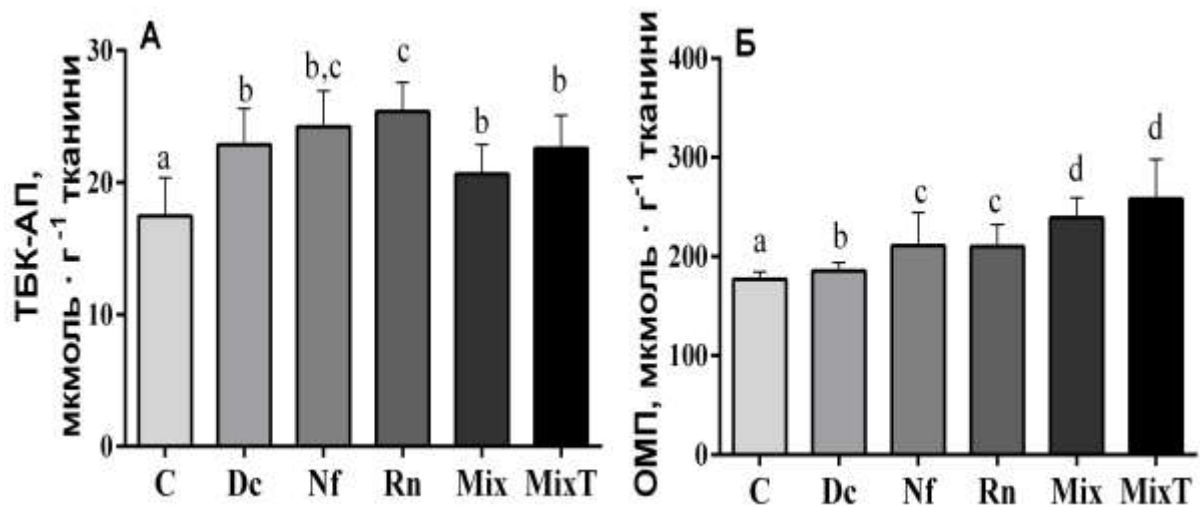


Рис. 3.3.1.3. Утворення ТБК-АП (А) та карбонілів протеїнів (Б) у травній залозі молюска *U. tumidus* за впливу організм диклофенаку (Dc), ніфедипіну (Nf), 80 нМ Раундапу (Rn), їх суміші при температурах 18°C (Mix) та 25°C (MixT), $M \pm SD$, $n=8$.

Ще одним показником окисного ураження є вміст окисних модифікацій протеїнів (ОМП) (Рис. 3.3.1.3. Б), який у травній залозі молюска вірогідно зростає за дії всіх експериментальних чинників, та найбільше виражено при комплексній дії ксенобіотиків при двох температурах. Отже, в умовах дослідної експозиції в організмах молюсків спостерігалася індукція окисного стресу, який проявлявся пригніченням активності ензиму антиоксидантного захисту та накопиченням продуктів окиснення ліпідів, протеїнів та збалансованою активацією системи глутатіону.

З метою порівняльної характеристики ступеня ураження залежно від природи фактору ми застосували обчислення інтегрального показника окисного

стресу (Рис 3.3.1.4. А). При цьому, ми включили у перелік показників і концентрація МТSH, як реакційно здатних тіолів. Отримані результати свідчить, що найбільший внесок у реакцію системи антиоксидантного захисту внесли МТ та окисненим глутатіоном, оскільки зміни їх вмісту сягали 50% і більше порівняно з контролем в окремих групах. Визначальним фактором, який викликав найбільш помітні зміни показників, є комплексна дія ксенобіотиків та температури 25°C.

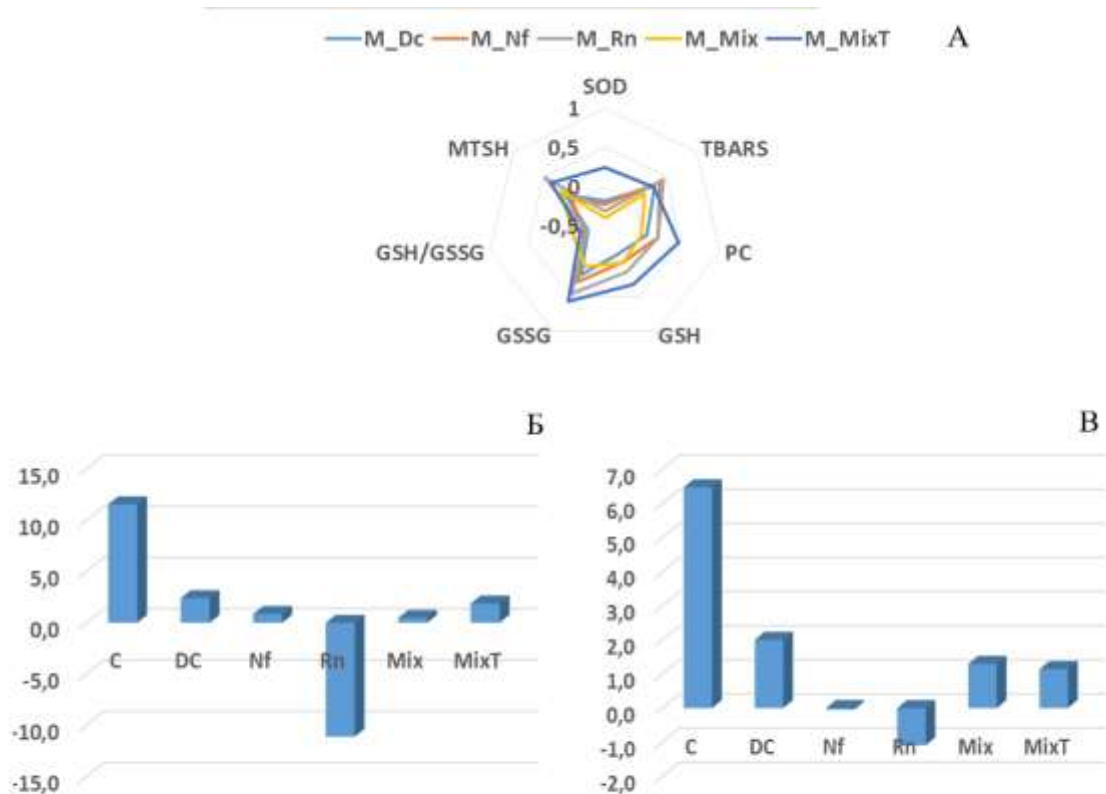


Рис. 3.3.1.4. Інтегральні характеристики антиоксидантно-прооксидантного статусу (% відхилення від контролю кожного врахованого показника) (А), та Інтегральний індекс антиоксидантного стану (Б, В), розрахований як $\{[(A1 \times A2)/2] + [(A2 \times A3)/2] + \dots + [(An \times A1)/2]\}$, де значення кожного показника (A_i) було розраховано як $A_i = (M_i - M_t) / SD$ з врахуванням показнику МТSH (Б) та без нього (В). Антиоксиданти: СОД, GSH, МТSH; прооксиданти: GSSG, ТБК-АП, ОМП.

Обчислення інтегрального індексу антиоксидантного стану за принципом, запропонованим Broeg та Lehtonen (2006) шляхом сумачії всіх показників анти-

та прооксидантного проявів із врахуванням статистичних відхилень від середнього значення дозволило виокремити ефект 80 нМ Раундапу як найбільш контрастний порівняно з контролем. Причому порівняння цих індексів залежно від врахування МТШН (Рис 3.3.1.4. Б, В) виявляє його значний внесок у визначення антиоксидантно-прооксидантних властивостей.

Відтак, найменшим прооксидантний вплив серед досліджених експериментальних схем виявлено для диклофенаку, найбільші, проте збалансовані, зміни – за дії суміші при тепловому навантаженні, а внесок МТШН як складової антиоксидантно-прооксидантного балансу відіграв вирішальну роль у відповіді системи АОЗ на вплив Раундапу.

3.3.2. Вплив хлорпромазину та Раундапу поокремо та у суміші на параметри системи антиоксидантного захисту та прояви окисного ураження.

Дослідження показали, що активність супероксиддисмутази була малочутливою до застосованих чинників (Рис. 3.3.2.1.А) Тільки при впливі 40 нМ Раундапу вона зростала вірогідно на 16,1 %. Активність каталази також зазнавала вірогідних змін (зменшення на 30,8%) лише при дії хлорпромазину, а в усіх інших групах відповідала контрольним значенням (Рис. 3.3.2.1.Б).

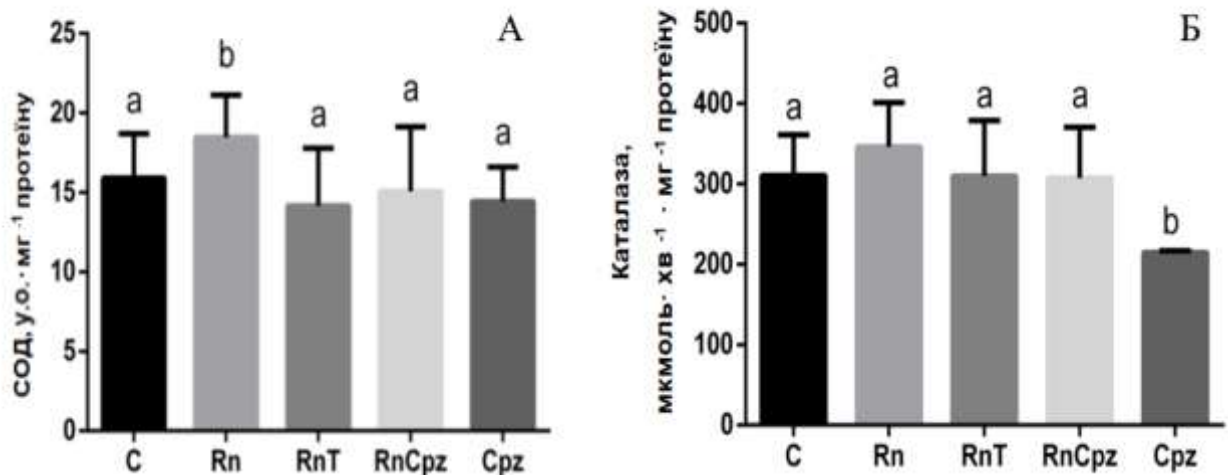


Рис.3.3.2.1. Супероксиддисмутазна активність (А) та каталазна активність (Б) у травній залозі молюсків *U. tumidus* за впливу на організм 40

нМ Раундапу окремо (Rn), у поєднанні з підвищеною температурою (RnT), хлорпромазином (RnCpz) та хлорпромазину окремо (Cpz), $M \pm SD$, $n=8$.

Реакція глутатіону виявилася чутливішою до впливу 40 нМ Раундапу при вищій температурі, хлорпромазину та комбінації чинників. Так, рівень GSH збільшився при комбінованому впливі чинників та окремо хлорпромазину на 32,9-75,0% (найбільшою мірою при поєднаному впливі 40 нМ Раундапу та хлорпромазину), тоді як вплив 40 нМ Раундапу окремо не викликав вірогідних змін порівняно з контролем (Рис. 3.3.2.2.А).

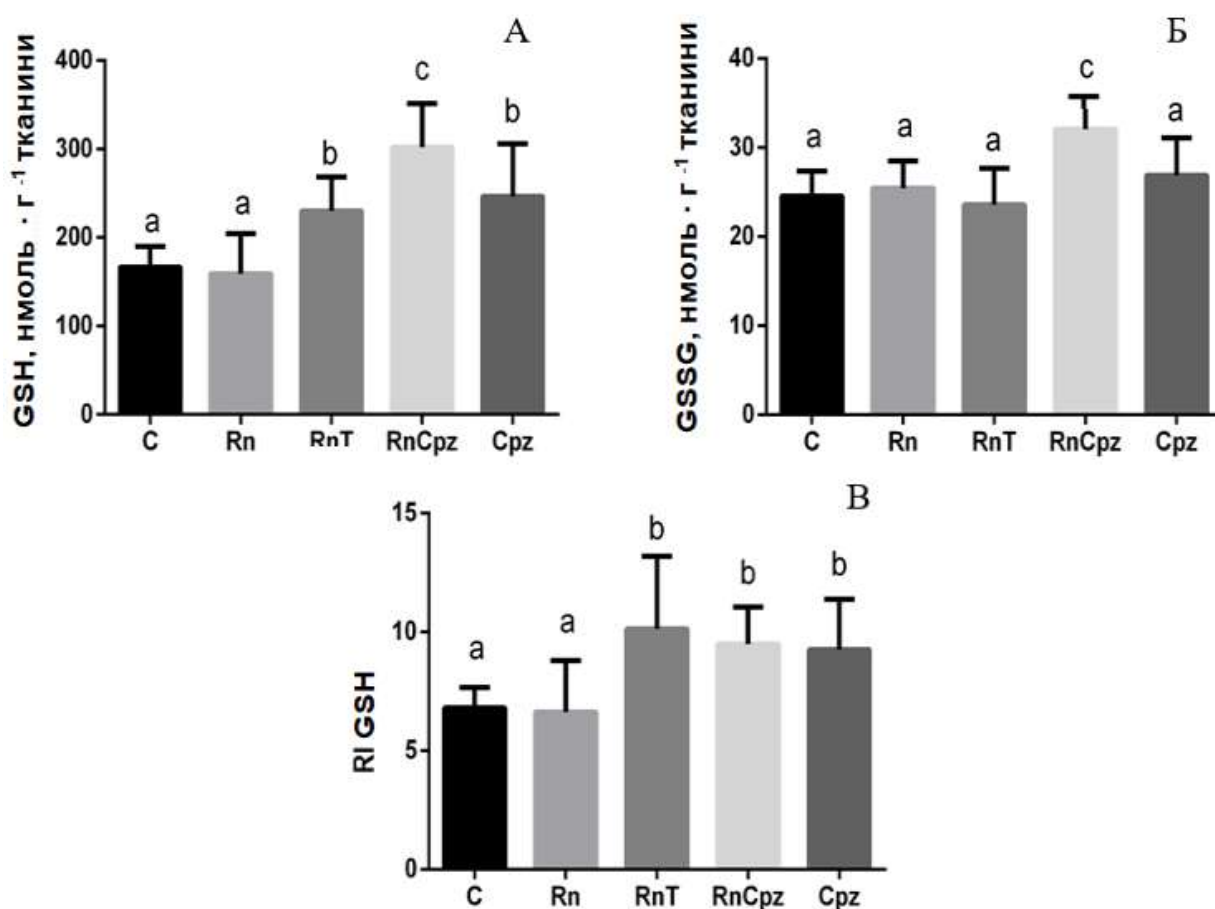


Рис. 3.3.2.2. Концентрація глутатіону (А-відновленого (GSH); Б-окисненого (GSSG)) та редокс індекс глутатіону (RI GSH) (В) у травній залозі молюска *U. tumidus* за впливу на організм 40 нМ Раундапу окремо (Rn), у поєднанні з підвищеною температурою (RnT), хлорпромазином (RnCpz) та хлорпромазину окремо (Cpz), $M \pm SD$, $n=8$.

Концентрація GSSG також підвищилися (на 30,7%) під час комбінованого впливу 40 нМ Раундапу та хлорпромазину, проте в інших групах вона не зазнала змін (Рис. 3.3.2.2.Б). Відповідно, редокс-індекс глутатіону збільшувався на 36,0-48,8% у всіх групах, крім групи, яку піддавалася впливу лише 40 нМ Раундау, де даний показник не відрізнявся від значення контрольної групи (Рис. 3.3.2.2.В).

Вимірювання загальної антиоксидантної активності показало (Рис. 3.3.2.3.), що її посилення відбувається у всіх експериментальних групах, особливо під впливом хлорпромазину (на 51,3%) і найменше зростання порівняно з контролем цієї активності викликав Раундап (на 23,4 %).

Оцінка рівня утворення продуктів перекисного окиснення ліпідів у травній залозі молюска показало, що у кожній з експериментальних груп він вірогідно підвищується, проте ці зміни не мають значного діапазону (7,0-16,3% порівняно з контрольною групою) (Рис. 3.3.2.4.А).

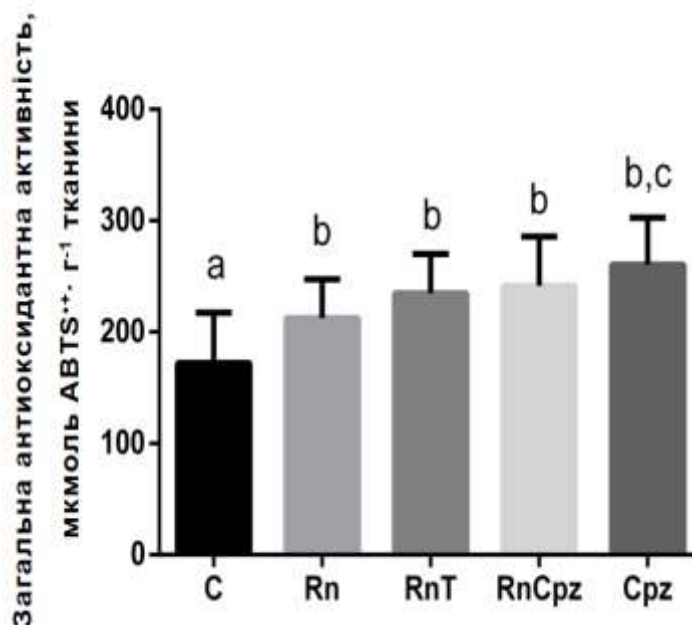


Рис. 3.3.2.3. Загальна антиоксидантна активність у травній залозі молюска *U. tumidus* за впливу на організм 40 нМ Раундапу окремо (Rn), у поєднанні з підвищеною температурою (RnT), хлорпромазином (RnCpz) та хлорпромазину окремо (Cpz), $M \pm SD$, $n=8$.

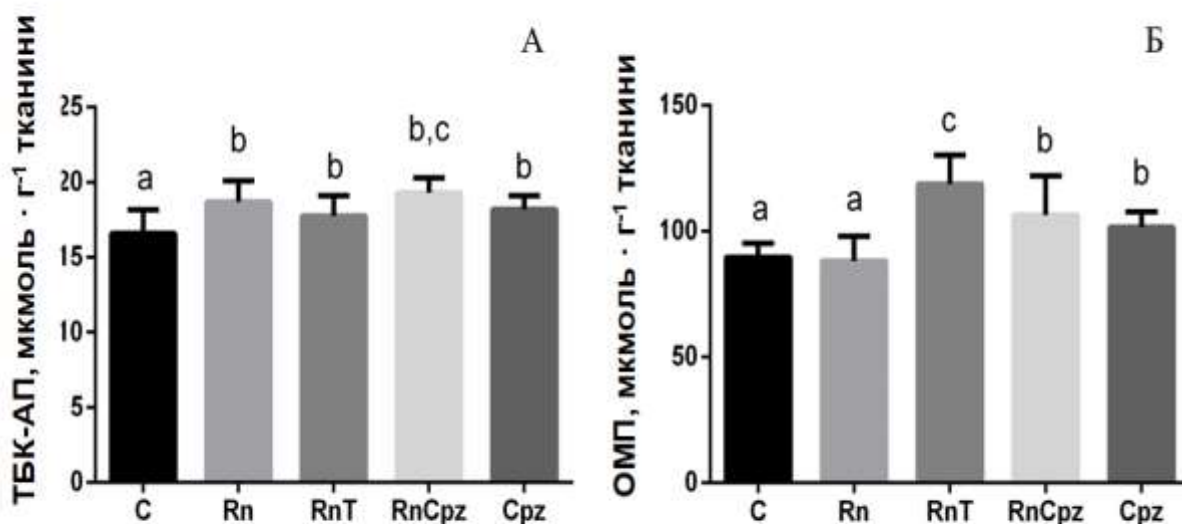


Рис. 3.3.2.4. Показники утворення продуктів окисного ураження ліпідів (А) та протеїнів (Б) у травній залозі молюсків за впливу на організм 40 нМ Раундапу окремо (Rn), у поєднанні з підвищеною температурою (RnT), хлорпромазином (RnCpz) та хлорпромазину окремо (Cpz), $M \pm SD$, $n=8$.

Таблиця 3.3.2.1.

Коефіцієнт кореляції Пірсона r для досліджених показників *перлівниці*, $f=38$; *, кореляція вірогідна ($p < 0,05$) при $r > 0,36$; **, ($p < 0,01$) при $r > 0,42$

Показники	GSSG	ТБК-АП	PI GSH	ОМБ	ABTS	СОД
КАТ	-0,060	-0,110	-0,146	-0,005	-0,152	0,481**
GSH	0,475**	0,230	0,780**	0,387*	0,379*	-0,425**
ТБК-АП			0,078	0,054	0,202	0,091
PI GSH				0,546**	0,423**	-0,369*
ОМБ					0,249	-0,211
ABTS						-0,071

Зміни концентрації окисних модифікацій протеїнів були більше виражені, вони проявлялися при комплексних впливах та дії хлорпромазину (на 13,2-32,5% порівняно з контрольною групою), а відсутні лише за дії 40 нМ Раундапу (Рис. 3.3.2.4.Б).

Ці результати кількісно демонструють, що глутатіон виявився головним антиоксидантом, який був задіяний у забезпеченні антистресорного потенціалу організму молюска за впливу хлорпромазину, комбінації чинників, тоді як дія 40 нМ Раундапу не позначалась помітно на антиоксидантно-проксидантному стані тканини молюска.

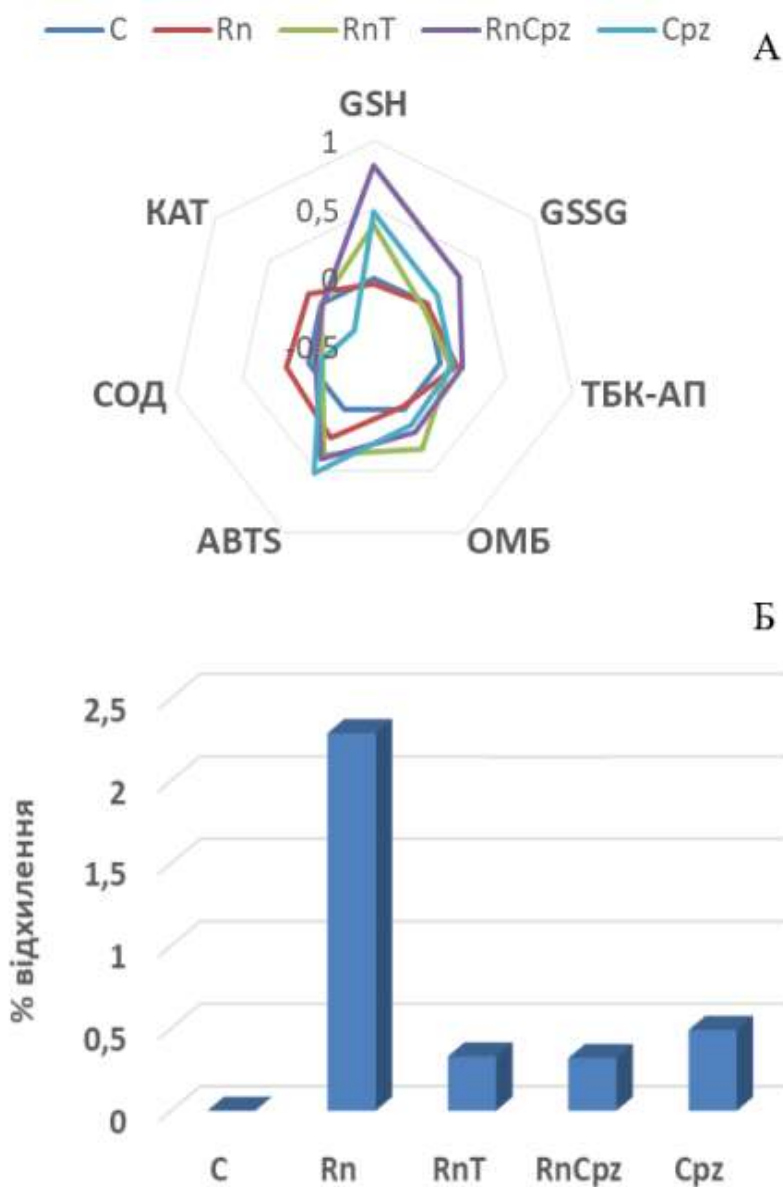


Рис. 3.3.2.5. Відхилення від контролю індивідуальних показників (А) та сумарні співвідношення антиоксидантно-проксидантного балансу (АПБ) (Б) у травній залозі молюсків за впливу на організм 40 нМ Раундапу окремо (Rn), у поєднанні з підвищеною температурою (RnT), хлорпромазином (RnCpz) та хлорпромазину окремо (Cpz)

Отже, за дії 80 нМ Раундапу антиоксидантний захист неефективний і пов'язаний з пригніченням активності ензимів, а за концентрації 40 нМ, виявляється посилення антиоксидантного захисту, яке визначається збільшеним вмістом MTSN, а загальна антиоксидантна активність корелює не з активністю СОД, а з вмістом складників системи глутатіону (Табл. 3.3.2.1). Ці спостереження узгоджуються з даними інших авторів (Matozzo et al., 2019; Pérez et al., 2011), які свідчать про пригнічення антиоксидантного захисту у морських молюсків за впливу гостротоксичних експозицій для Раундапу та гліфосату.

Отже, саме низькомолекулярні клітинні тіоли проявляють найбільший антиоксидантний потенціал за субхронічної дії досліджених ксенобіотиків у екологічно реальних концентраціях.

Розрахунок АПБ (Рис. 3.3.2.5.А, Б) також показує, що глутатіон та загальний антиоксидантний потенціал найбільш чутливо реагують на дію чинників. При цьому, сумарна позитивна захисна реакція найбільше виражена за дії 40 нМ Раундапу. При поєднанні факторів (у присутності хлорпромазину і підвищеної температури) активація антиоксидантного захисту була менше виражена, хоча глутатіон та антиоксидантний потенціал все ж мали підвищені значення.

Підсумки до підрозділу

Відтак, всі досліджені нами ксенобіотики проявляли проксидантний ефект, виражений як зростання рівня утворення продуктів перекисного окиснення ліпідів та окисних модифікацій протеїнів (за виключенням дії 40 нМ Раундапу). За дії на організм Раундапу спостерігається концентраційна залежність змін показників антиоксидантного стану: 40 нМ при 18° С активує супероксиддисмутазну активність, тоді як 80 нМ пригнічує її та викликає збільшення вмісту окисних модифікацій протеїнів. Збільшення вмісту відновленого глутатіону за впливу Раундапу лише у випадку дії 80 нМ супроводжується збільшенням вмісту окисненого глутатіону. За впливу 40 нМ

Раундапу при температурі 25° С активується система глутатіону, а супероксиддисмутазна та каталазна активності не змінюються порівняно з контролем.

Дія на організм молюска препаратів диклофенаку, ніфедипіну та їх суміші з 80 нМ Раундапом (при 18° С) пригнічують супероксиддисмутазну активність, хлорпромазин – каталазну активність. Доведено, що вплив на організм хлорпромазину та його суміші з 40 нМ Раундапу викликає збільшення вмісту відновленого глутатіону та його редокс індекс. Диклофенак, ніфедипін та їх суміш з 80 нМ Раундапу (при 18° С) викликають зменшення редокс індексу глутатіону, а суміш при 25° С не впливає на нього. Обчислення інтегральних показників свідчить, що серед досліджених показників низькомолекулярні тіоли, глутатіон та MTSN є головними клітинними антиоксидантами, які визначають зміни балансу у системі за впливу на організм Раундапу та фармацевтичних препаратів поокремо та у сумішах.

Представлені у підрозділі 3.3. результати опубліковано у статтях (Khoma et al., 2020a, 2020c, 2021, 2022a)

3.4. Оцінка токсичності середовища за субхронічного впливу на організм молюска ксенобіотиків при різних температурних режимах

3.4.1. Вплив диклофенаку, ніфедипіну та Раундапу поокремо та у суміші за двох температурних режимів на показники токсичності

Найбільш вагомою ознакою цитотоксичності ксенобіотиків є зменшення стабільності лізосомальних мембран. Ми застосували версію спектрофотометричного визначення цього показника у травній залозі. Слід відзначити, що у більшості досліджень впливу фармацевтичних препаратів та гліфосату використовують оптичний метод визначення у гемоцитах і результати аналізу у двох різних тканинах можуть не співпадати (Vebiano et al., 2017; Matozzo et al., 2019; Khoma et al., 2020b, 2021). Для оцінки ураження травної залози ми обрали визначення саме у цій тканині.

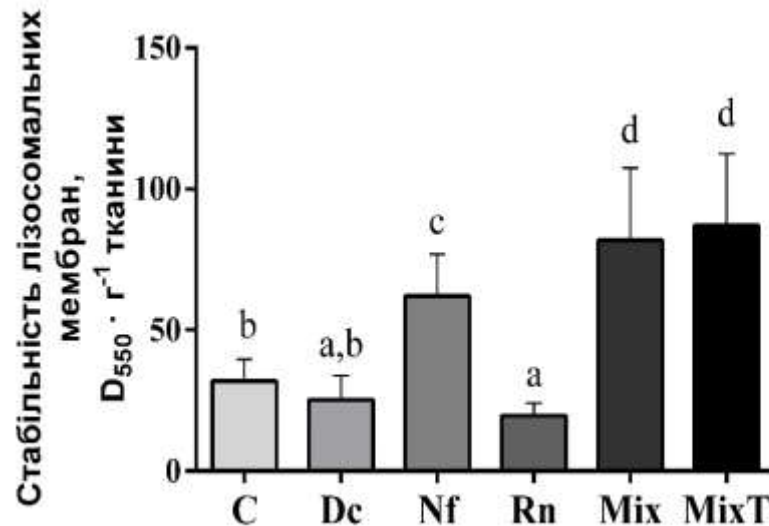


Рис. 3.4.1.1. Стабільність лізосомальних мембран у травній залозі молюска *U. tumidus* за впливу на організм диклофенаку (Dc), ніфедипіну (Nf), 80 нМ Раундапу (Rn), суміші цих речовин за температури 18°C (Mix) та за 25°C (MixT), визначена за здатністю лізосом утримувати барвник нейтральний червоний, $M \pm m$, SD, $n=8$

Результати показали (Рис. 3.4.1.1), що раундап суттєво пригнічує здатність лізосом утримувати барвник (у 1,6 разів). Проте ніфедипін та суміш ксенобіотиків за двох температурних режимів стабілізують ці мембрани 1,9–2,7 разів. Диклофенак у досліджуваних умовах не викликає змін стабільності лізосом порівняно з контролем. Отже для концентрації 80 нМ Раундапу доведено його цитотоксичність. Стабілізуючий ефект ніфедипіну не спостерігався на прикладі водних організмів, проте він відомий у вищих тварин. Загалом це явище незвичайне в екотоксикології; навпаки, дестабілізація мембран часто виявляється як чутлива ознака втрати життєздатності гемоцитів у двостулкових молюсків у польових і лабораторних експозиціях (Vebiano et al., 2017; El Haj et al., 2019; Gnatyshyna et al., 2020b). Проте деякі факти підтверджують дані, отримані в нашому дослідженні. Ніфедипін та інші вивчені блокатори кальцієвих каналів демонструють антипероксидний вплив на ліпіди (Мак et al., 1992). Відповідно, це сприяє стабілізації мембрани. Крім того, зміни гомеостазу Ca^{2+} можуть підвищити

стабільність лізосомних структур. Повідомлялося також, що вивільнення лізосомального ферменту шляхом екзоцитозу в поліморфно-ядерних лейкоцитах кроликів пригнічується високими концентраціями (0,2–1 мМ) ніфедипіну (Elferink, 1982). Аналогічно, стабілізація мембрани була показана на моделі серця із стимульованої ішемією після реперфузії перфузатом, що містить ніфедипін (Okamoto and Lefter, 1983).

Відомо, що ураження клітинних структур може ініціювати механізми апоптичного загибелі. Зокрема, таким сигналом слугує посилення окисного ураження протеїнів та аномалії ядра (Rios et al., 2018). Проте отримані нами результати щодо активності ключового виконавчого ензиму апоптозу каспази-3 показали, що вона збільшується за впливу ніфедипіну та суміші у обох температурних режимах, особливо за підвищеної температури (у 2,1 рази), тоді як інші препарати не змінюють її порівняно з контролем (Рис. 3.4.1.2). Особливий ефект ніфедипіну та сумішей на каспазну-3 активність узгоджуються з повідомленнями про подекуди складні та суперечливі ефекти блокаторів кальцієвих каналів на клітинний апоптоз та їх здатність пригнічувати ріст пухлини (Anand et al., 2019).

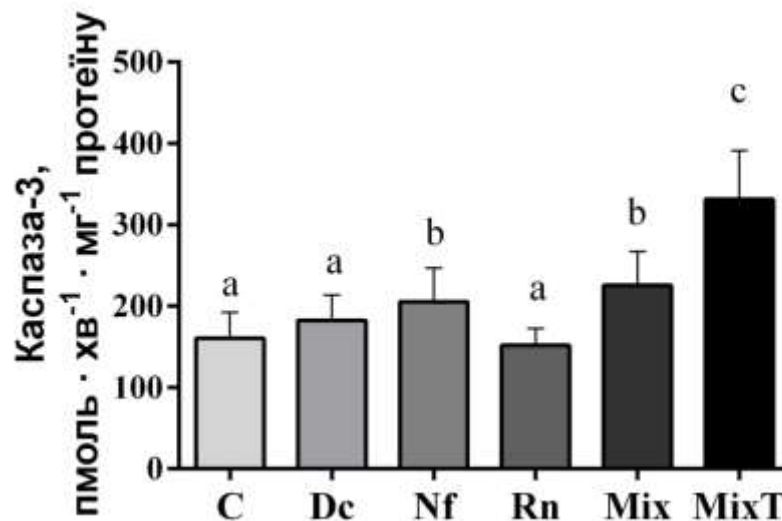


Рис. 3.4.1.2. Активність каспази-3 у травній залозі молюска *U.tumidus* за впливу на на організм диклофенаку (Dc), ніфедипіну (Nf), 80 нМ Раундапу (Rn), суміші цих речовин за температури 18°C (Mix) та за 25°C (MixT), $M \pm SD$, $n=8$.

Катепсин D належить до лізосомальних аспартат-протеаз, він залучений до процесу протеолізу, що відбувається у цих органелах. Однак чіткої інформації про субстратну специфічність катепсинів немає, проте є відомості про поліфункціональний характер цього ензиму та його залучення у процеси апоптозу та аутофагії (Conus et al., 2008; Dingle et al., 1971). Наше дослідження продемонструвало зростання лізосомальної активності катепсину D лише за впливу диклофенаку та спільної дії суміші та нагрівання (Рис. 3.4.1.3), тоді як при дії ніфедипіну та 80 нМ Раундапу спостерігали її інгібування, що свідчить про важливу роль лізосом у перетворенні та/або локалізації цих ксенобіотиків у клітинах.

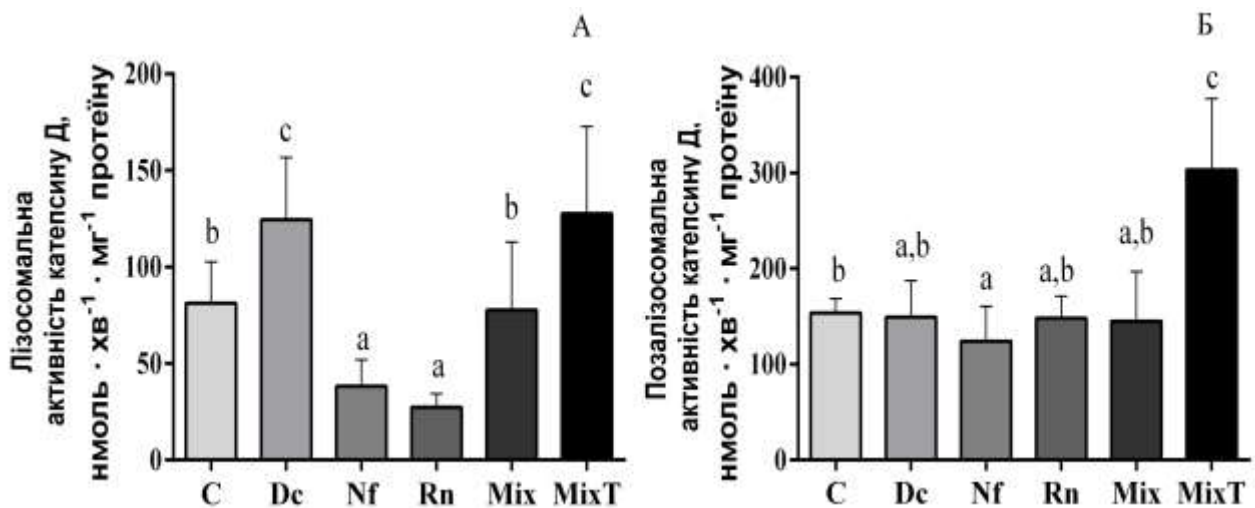


Рис. 3.4.1.3. Активність катепсину D: лізосомального (А) та позалізосомального (Б) у травній залозі молюска *U.tumidus* за впливу на організм диклофенаку (Dc), ніфедипіну (Nf), 80 нМ Раундапу (Rn), суміші цих речовин за температури 18°C (Mix) та за 25°C (MixT), $M \pm SD$, $n=8$.

З іншого боку, активність позалізосомального катепсину D, яка проявлялася в результаті виходу з лізосом цього ензиму, лише при спільній дії ксенобіотиків підвищеної температури зростала удвічі порівняно з контролем. Отже, саме комбінація впливів експериментальних факторів активувала системи гідролізу клітинних структур у цитоплазмі, залучаючи як каспазний, так і катепсиновий шляхи. У той же час при нормальному температурному режимі такого ефекту не спостерігали. Відтак, рівень активності лізосомального катепсину D та його вилучення з лізосом можна розглядати як

важливий маркер теплового впливу, який комбінується з забрудниками довкілля у реальному довкіллі.

Кислі гідролази лізосом можуть розкласти більшість екзо- та ендогенних макромолекул, що доставляються шляхом ендоцитозу, фагоцитозу та аутофагії (Appelqvist et al., 2013). Пошкодження лізосомальних мембран, зокрема шляхом генерації цитотоксичних АФК, призводить до виходу у цитоплазму гідролаз та руйнування вмісту клітини (Gutierrez et al., 2016). Важливо, що серед лізосомальних протеаз катепсин Д найменш вимогливий до рН: в умовах *in vitro* він проявляє активність при рН 4,5-5,0, проте це один з небагатьох катепсинів, який навіть за нейтрального значення рН може проявляти активність у позаклітинному просторі. Відтак, в результаті виходу катепсину Д з мітохондрій у цитоплазму він не інактивується, а залучається до процесів клітинного апоптозу. Крім того, є дані про те, що вивільний ензим зумовлює некротичні зміни та метаморфічні перетворення, наприклад у амфібій.

Відтак, не дивлячись на низькі концентрації ксенобіотиків та, в цілому, м'які умови експериментального дослідження, ми отримали результати високої та специфічної чутливості організму молюска *U. tumidus* до дії розповсюджених ксенобіотиків водного походження, при окремі та при комплексні дії на організм, особливо при температурі 25 °С. Раундап очікувано викликав дестабілізацію лізосомальних мембран та пригнічення активності лізосомального катепсину Д, тоді як у сумішах домінували специфічні ефекти фармацевтичних препаратів та активувались процеси апоптозу.

3.4.2. Вплив хлорпромазину та Раундапу поокремо та у суміші на показники токсичності

Оскільки за впливу 80 нМ Раундапу проявлявся цитотоксичний ефект, важливо було виявити нижні межі цитотоксичності. Результати оцінки лізосомальної стабільності тканини травної залози за впливу 40 нМ Раундапу показали (Рис. 4.3.2.1), що її зменшення спостерігається лише за підвищеної

температури (на 8,2%). З іншого боку, хлорпромазин посилює стабільність лізосомальної мембрани, хоча і не так масштабно, як ніфедипін (на 11,9%).

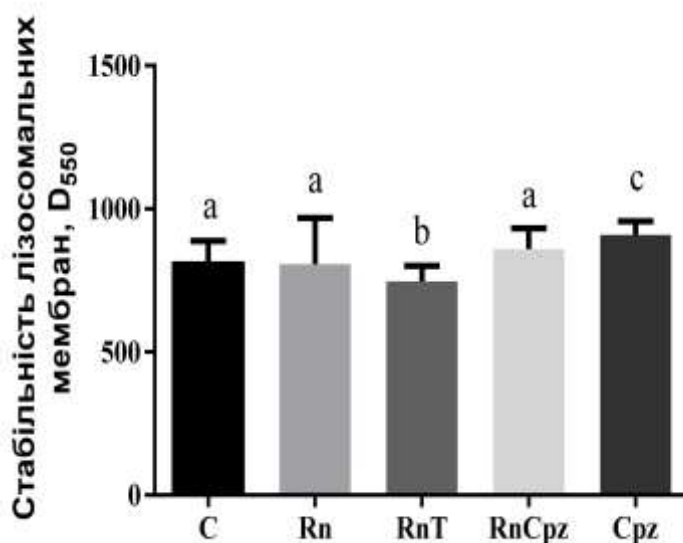


Рис. 3.4.2.1. Стабільність лізосомальних мембран у травній залозі молюска *U. tumidus* за впливу на організм 40 нМ Раундапу окремо (Rn), у поєднанні з підвищеною температурою (RnT), хлорпромазином (RnCpz) та хлорпромазину окремо (Cpz), $M \pm SD$, $n=8$.

Дія Раундапу при 18° C та його суміші з хлорпромазином не викликали змін стабільності мембрани порівняно з контролем.

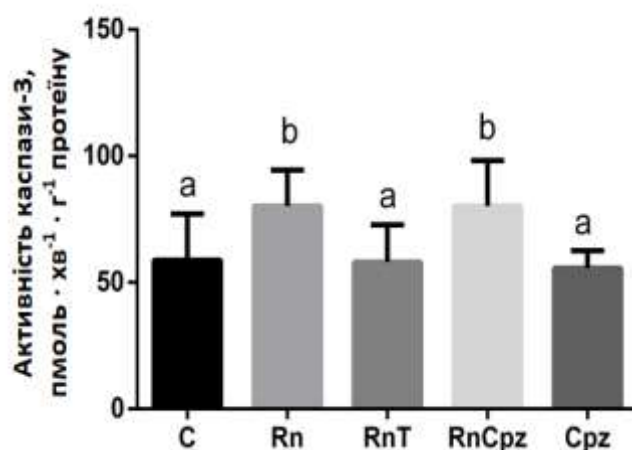


Рис. 3.4.2.2. Активність ензиму апоптозу каспази-3 у травній залозі молюска *U. tumidus* за впливу на організм 40 нМ Раундапу окремо (Rn), у поєднанні з підвищеною температурою (RnT), хлорпромазином (RnCpz) та хлорпромазину окремо (Cpz), $M \pm SD$, $n=8$.

Апоптоз у молюсків характеризується надзвичайно високою ефективністю його механізмів у тканині травної залози завдяки можливості змінювати рівень експресії генів каспаз у широкому діапазоні: від їх екстремально високої активності до інгібування (Rios et al., 2018). Визначення активності каспази-3 показало, що Раундап та його суміш з хлорпромазином посилюють активність цього ензиму (Рис. 3.4.2.2). Важливо, що саме у цих експозиціях вміст цинку в металотіонеїнах зростає, тобто зменшується вміст лабільного цинку, що може сприяти активації ензиму. Ймовірно, активація апоптозу може бути складовою адаптивного механізму, що ініціюється за впливу низької концентрації ксенобіотиків на організм. Зокрема, вплив 40 нМ Раундапу є єдиною експозицією у нашому дослідженні субхронічного впливу, коли не відбувалося посилення окисної деструкції протеїнів, що свідчить про успішні механізми вилучення ушкоджених клітин.

Підсумки до підрозділу

Доведено, що Раундап (80 нМ та 40 нМ при 25° С) викликає цитотоксичний ефект, що проявляється як дестабілізація лізосомальних мембран у травній залозі, та (80 нМ) пригнічує активність лізосомального катепсину Д. Фармацевтичні препарати ніфедипін та хлорпромазин, що асоціюються з гомеостазом кальцію, посилюють стабілізацію лізосомальних мембран за впливу поокремо та у сумішах (ніфедипін). Вплив 40 нМ Раундапу, ніфедипіну та його сумішей активують каспазу-3. При дії суміші ніфедипіну, диклофенаку, 80 нМ Раундапу при 25° С відзначено ознаки посилення апоптозу/аутофагії як одночасне збільшення активностей каспази-3 та естралізосомальної форми катепсину Д.

Відтак, доведено цитотоксичність Раундапу, що посилюється у залежності від зростання концентрації та теплового режиму. Для фармацевтичних препаратів ніфедипіну та хлорпромазину, що впливають на гомеостаз кальцію, підтверджено ефекти, встановлені на моделях вищих тварин, що надає ваги перспективі використання двостулкового молюска для оцінки екотоксичності

фармацевтичних препаратів – регуляторів метаболізму металів. Важливо, що вплив ніфедипіну на ензими апоптозу є домінуючим і у сумішах, на відміну від Раундапу, для якого такі ефекти не виражені. Особливий вплив суміші ксенобіотиків та підвищеної температури – поєднана активація каспази-3 та вихід катепсину Д з лізосом – визначає верхню межу резистентності клітинного метаболізму за комплексного впливу пошкоджуючих чинників довкілля у нашому експерименті.

Представлені у підрозділі 3.4. результати опубліковано у статтях (Khoma et al., 2020a, 2020c, 2021, 2022a).

3.5. Вплив хелаторів металів на цинк-депонувальні властивості та систему антиоксидантного захисту у травній залозі *U. tumidus* у експерименті *ex vivo*

3.5.1. Хроматографічна поведінка металотіонеїнів та їх металдепонувальна функція

Вище отримані результати у субхронічних експозиціях встановили вплив Раундапу на розподіл цинку у тканині травної залози як домінуючий прояв його біологічної активності у нашому дослідженні. Проте вони не прояснили, чи пестицид Раундап безпосередньо діє на МТ як адгезивний конкурент металів чи опосередковано через прооксидантний вплив. Тому нами проведено третю експериментальну серію із застосуванням моделі *ex vivo*, для визначення прямої дії Раундапу на металдепонувальні властивості МТ та порівняння з впливом відомого модельного хелатора цинку ТПЕНу (Yang et al. 2015).

Нами було проведене хроматографічне дослідження термостабільних протеїнів у експериментальних групах. За допомогою гель-розподільної хроматографії у термостабільній фракції гомогенату тканини травної залози були ідентифіковані протеїни, що містять МТ, (Рис. 3.5.1.1) як ті, що характеризуються молекулярною масою близько 7 кДа, термостабільністю та характерним УФ-спектром (з піком поглинання при 254 нм, який свідчить про наявність метал-тіолатних кластерів та відсутністю специфічного піку при 280

нм, що характерний для типових протеїнів, у складі молекул яких відсутні залишки ароматичних амінокислот) та високим співвідношенням значень оптичної густини при D254 та D280.

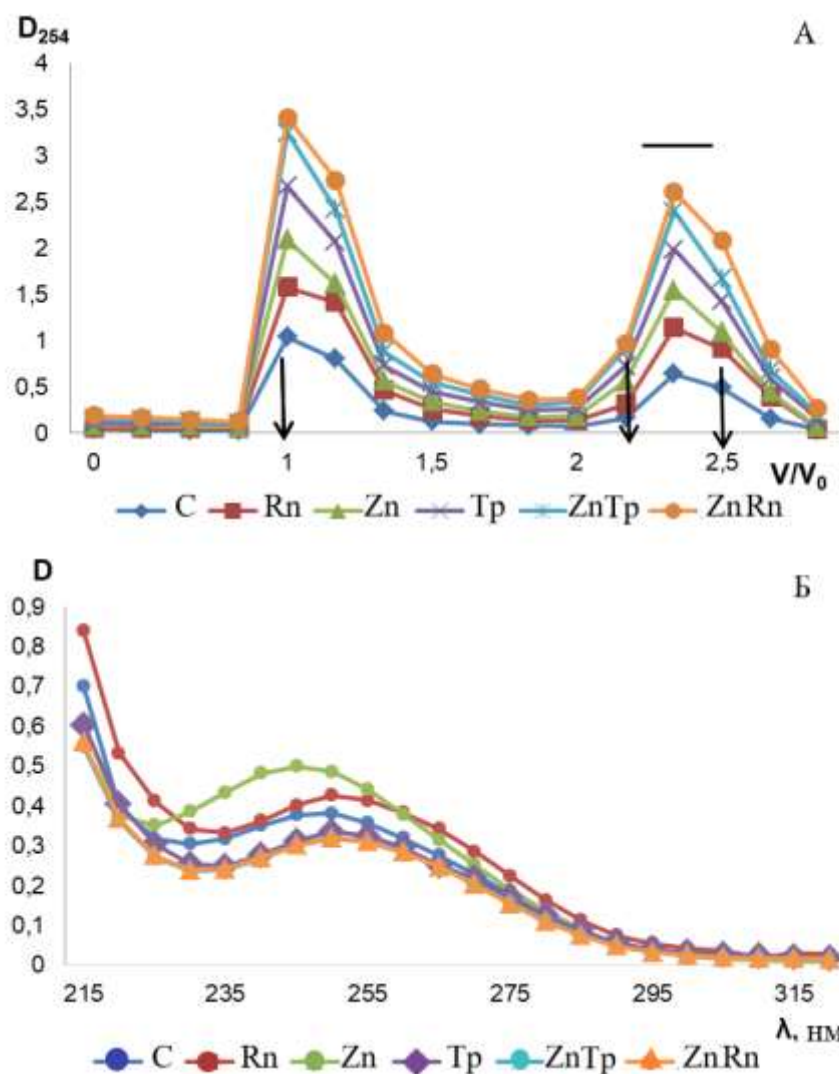


Рис. 3.5.1.1. Хроматографічні ознаки термостабільних супернатантів з травної залози молюска *U. tumidus* при дії в умовах *ex vivo* Раундапу (Rn), цинку (Zn), ТРЕНу (Tr), суміші цинку та ТПЕНу (ZnTr) і суміші цинку та Раундапу (ZnRn): профілі елюцій на Сефадексі G-50 (А) та УФ-спектри низькомолекулярних фракцій (Б).

Примітка. Стрілки позначають об'єм елюції маркерів: альбумін сироватки (67,0 кДа), цитохром с (12,3 кДа), інсулін (5,8 кДа), мають параметри елюції 1,0; 2,2; 2,5 V_e/V_0 відповідно.

Наявність цих протеїнів у термостабільному супернатанті травної залози кожної дослідної групи підтверджено методом електрофорезу в поліакриламідному гелі (ПААГ) у денатуруючих умовах (Рис. 3.5.1.2).

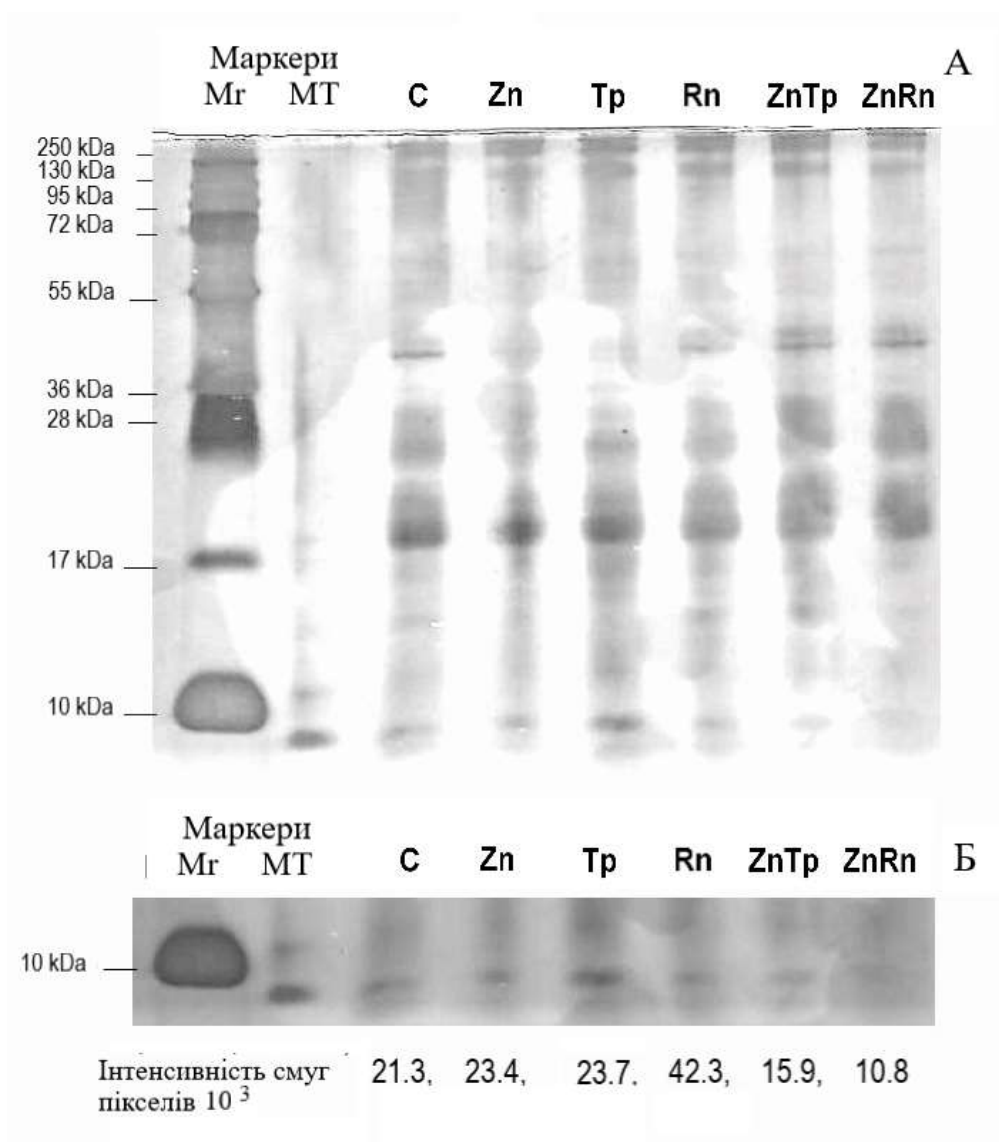


Рис 3.5.1.2. Електрофорез в поліакриламідному гелі в денатуруючи умовах термостабільного супернатанту травної залози молюска *U. tumidus* при дії в умовах *ex vivo* Раундапу (Rn), цинку (Zn), ТРЕНу (Tp), суміші цинку та ТПЕНу (ZnTp) і суміші цинку та Раундапу (ZnRn): А – відокремлені термостабільні протеїни, забарвлені аргентум нітратом; Б – відокремлена металотіонеїнова смуга, забарвлена аргентум нітратом.

Примітка. Доріжки гелю містили маркери молекулярних мас (Mr) (250 кДа, 130 кДа, 72 кДа, 55 кДа, 36 кДа, 28 кДа, 17 кДа, 10 кДа) та стандарт МТ.

Отже, нами не виявлено утворення різних за молекулярною масою форм МТ, що за умов експерименту може бути наслідком посттрансляційної модифікації протеїнів через гідроліз дводоменної структури або часткове окиснення. Відтак, у всіх експозиціях не виявлено екстремального впливу умов середовища.

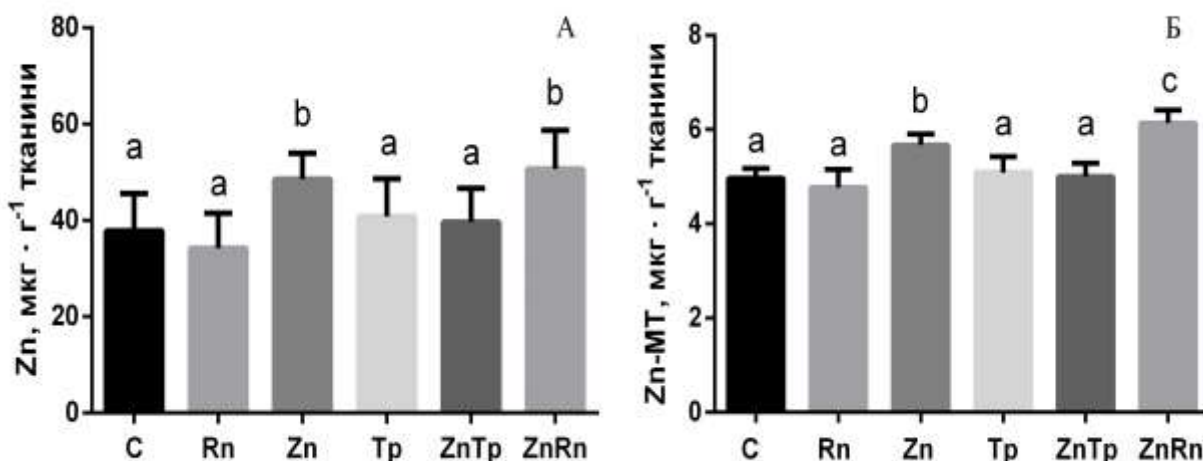


Рис. 3.5.1.3. Концентрації цинку загального (Zn) (А) та зв'язаного МТ (Zn-MT) (Б) у травній залозі моллюска *U. tumidus* при дії в умовах *ex vivo* Раундапу (Rn), цинку (Zn), ТПЕНу (Tp), суміші цинку та ТПЕНу (ZnTp) і суміші цинку та Раундапу (ZnRn), $M \pm SD$, $n=8$.

При дії цинку та комбінації цинку з Раундапом, відбулося підвищення концентрації цинку у тканині (Рис. 3.5.1.3.А) та МТ (Рис. 3.5.1.3.Б), тоді як за впливу інших чинників його концентрація у тканині та МТ не відрізнялася від контрольного значення. Зокрема, присутність ТПЕНу при спільному впливі з цинком запобігала накопиченню цинку в тканині та у МТ, навіть за його вмісту 3 мкМ у середовищі інкубації, на відміну від Раундапу, який не проявляв такого ефекту.

За результатами електрофорезу у системі Трицин-SDS-ПААГ (Рис. 3.5.1.2. Б) інтенсивність смуг МТ становила $21,3 \cdot 10^3$, $23,4 \cdot 10^3$, $23,7 \cdot 10^3$, $42,3 \cdot 10^3$, $15,9 \cdot 10^3$ та $10,8 \cdot 10^3$ пікселів відповідно у контрольній, Zn-, Tp-, Rn-, ZnTp- та ZnRn-групах, що свідчить про збільшення концентрації МТ при впливі цинку,

ТПЕНу і Раундапу, але зниження за впливу сумішей. Ортимані дані співпали щодо вмісту МТ визначеного спектрофотометричним методом для всіх груп, крім Тр. У Тр-групі ці два методи дали протилежні результати, які можна було б пояснити специфічною взаємодією між Тп і Zn-доменами (Yuchi et al. 1993).

Отже, присутність Раундапу, на відміну від ТПЕНу, не запобігала накопиченню цинку в тканині та МТ, тобто, він не проявляв безпосередньої хелатуючої дії на цинк на відміну від ТПЕНу.

3.5.2. Параметри системи антиоксидантного захисту та прояви окисного ураження

З метою встановлення антиоксидантних/прооксидантних властивостей Раундапу та цинку, ми визначали вміст GSH, GSSG, МТSH та загальну антиоксидантну активність.

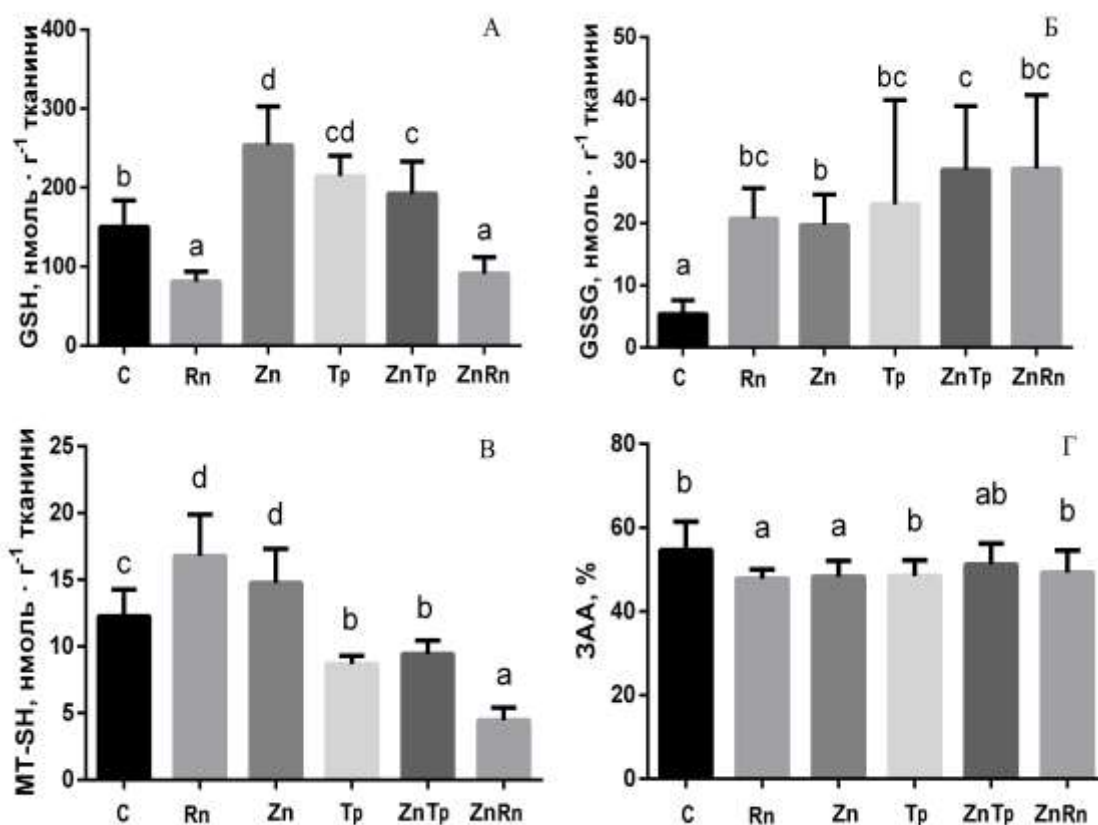


Рис. 3.5.2.1. Концентрації відновленого глутатіону (GSH) (А), окисненого глутатіону (GSSG) (Б), МТ (MT-SH) (В) та загальна антиоксидантна активність

(Г) у травній залозі молюска *U. tumidus* при дії в умовах *ex vivo* Раундапу (Rn), цинку (Zn), ТРЕНу (Tr), суміші цинку та ТПЕНу (ZnTr) і суміші цинку та Раундапу (ZnRn), $M \pm SD$, $n=8$.

Дослідження показало, що клітинні тіоли GSH, GSSG та MTSH були високочутливі до дії всіх досліджуваних чинників (Рис.3.5.2.1 А,Б,В). У той час, як рівень GSH різко знизився в Rn- та ZnRn -групах, він підвищився в Zn-, Tr- та ZnTr-групах. Концентрація GSSG помітно збільшувалася при всіх експозиціях. Відповідно, рівень RI GSH знижувався з 25,3 у контрольній групі до 4,0, 13,3, 9,8, 7,2 та 3,5 у RnZn-, Tr-, ZnTr- та Тп-групах відповідно (у 2-8 разів).

Рівень MT-SH підвищувався під впливом Rn і Zn, але суттєво знижувався при дії інших чинників. Визначення загальної антиоксидантної активності показало (Рис. 3.5.2.1 Д.), що відбулося її зниження порівняно з контролем в Rn- та Zn-групах і не спостерігали вірогідної відмінності від контролю в інших експозиціях.

Отже, серед досліджуваних чинників Раундап має особливий вплив на рівень GSH, що проявляється як окремо так і в суміші, тоді як для комбінації чинників спільною реакцією було зниження рівня металотіонеїни. Проте Раундап і Zn проявляють пооксидантні властивості, зменшуючи загальну антиоксидантну активність, а зміна GSSG є спільною реакцією на стресорні чинники.

3.5.3. Активність апоптозу та ознаки цитотоксичності

Активність центрального виконавчого ензиму апоптозу каспази-3 знижувалася при дії цинку та збільшувалася при впливі ТПЕНу (рис. 3.5.3.1. А). У всіх інших експозиціях не було змін порівняно з контрольним значенням. Zn є інгібітором каспази-3, коли його концентрації не перевищують десятків мкМ (Truong-Tran et al. 2001), що також підтверджено в цьому дослідженні. Більше того, активуючий вплив Tr на каспазу-3 може бути наслідком порушення внутрішньоклітинного розподілу Zn (Eron et al. 2018). Ці результати

підтверджуються інформацією про зниження вмісту лабільного Zn як про апоптичний прояв (Thambiyu et al. 2012).

У експерименті було підтверджено цитотоксичність Раундапу: лізосомальні мембрани були дестабілізовані Раундапом, а також ТПЕНом, тоді як у Zn- та ZnRn-групах їх стабільність зросла порівняно з контролем (рис. 3.4.1. Б). У ZnTp-групі протилежні ефекти цинку та ТПЕНу нівелювалися, що в результаті не призводило до змін порівняно з контролем.

Zn є добре відомим стабілізатором лізосомних мембран (Kukic et al. 2014). Наше дослідження підтверджує цю роль, тоді як наявність Tp зменшує цей ефект. Цікаво, що як Tp, так і Раундап викликають дестабілізацію лізосом. Однак причини цього ефекту можуть бути різними в Rn- і Tp-групах. Особлива токсичність Раундапу, яка проявляється як втрата лізосомної стабільності, підтверджена в інших експозиціях *ex vivo* та *in vivo* (Haj et al. 2019; Khoma et al. 2021).

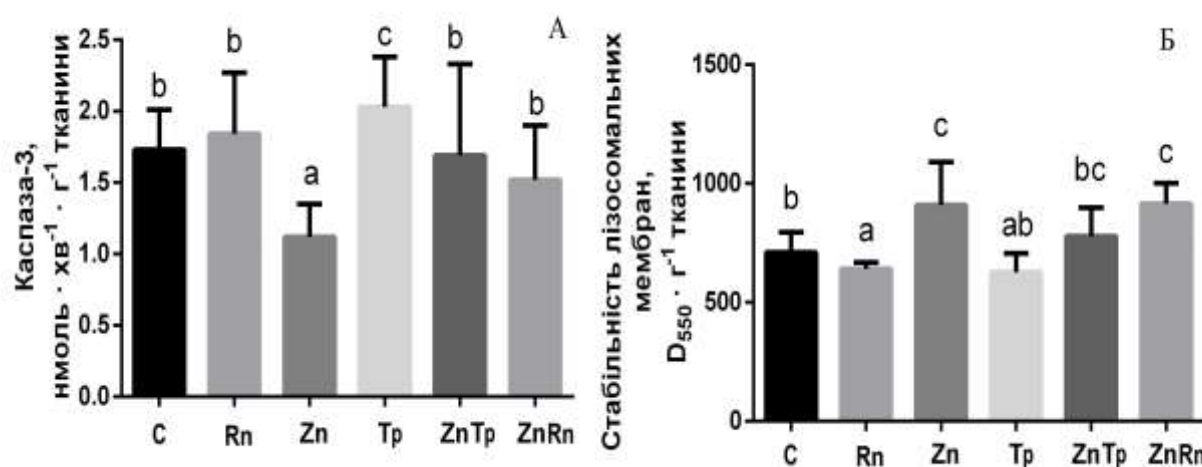


Рис. 3.5.1.5.. Активність каспази-3 (А) і стабільність лізосомної мембрани (Б) у травній залозі молюска *U. tumidus* при дії в умовах *ex vivo* Раундапу (Rn), цинку (Zn), ТПЕНу (Tp), суміші цинку та ТПЕНу (ZnTp) і суміші цинку та Раундапу (ZnRn), M ± SD, n=8.

Результати вивчення впливу Tp і ZnTp у системі вказують на те, що хелатування Zn знижує захист лізосом. Аналогічно, у культурі клітин щурів 3 мкМ Tp знижує життєздатність клітин (Yang et al. 2015). Показано, що Tp-

опосередковане внутрішньоклітинне виснаження Zn впливає на розпад лізосом і загибель клітин без генерації АФК (Matias et al. 2016). У нашому дослідженні ми підтверджуємо, що Tr не бере участь у генерації АФК, і дестабілізація лізосом у тканині, що піддається впливу Tr, може бути прямим результатом внутрішньоклітинного виснаження Zn.

Проведене нами дослідження *ex vivo* вперше засвідчило успішність підходу з використанням хелатора цинку ТПЕНу для з'ясування цинк-залежних біохімічних реакцій у двостулкових моллюсків. Специфічна токсичність Раундапу у цьому дослідженні найбільш чітко проявилася як виснаження GSH. Проте за умов впливу на організм спостерігаються різні прояви впливу Раундапу на GSH та інші антиоксиданти (Matozzo et al. 2019, Khoma et al. 2021). У той же час, виснаження окислювально-відновного стану GSH було загальною ознакою всіх експозицій. Ця особлива вразливість GSH та GSSG під час експозиції *ex vivo* потребує подальшого вивчення.

Висновки до підрозділу

Результати цього експерименту переконливо довели, що Раундап не має прямого впливу на акумуляцію цинку у МТ, на відміну від ТПЕНу. Лише ТПЕН поокремо та за спільної з цинком дії викликав протилежні до дії цинку ефекти, зменшуючи рівень MTSN, збільшуючи каспазу-3 активність та лізосомальну стабільність. З іншого боку, Раундап мав прооксидантний ефект, знижуючи рівень GSH та лізосомальну стабільність, що відповідало результатам його впливу у субхронічному експерименті. Спільним проявом для всіх груп у цьому експерименті було зниження у 2-8 разів співвідношення GSH/GSSG, що указує на лімітуючі можливості інкубації тканини у агресивному середовищі.

Представлені у підрозділі 3.5 результати опубліковано у статтях (Khoma et al., 2020b, 2022a).

РОЗДІЛ IV. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

У нашій роботі було досліджено вплив поширених ксенобіотиків водного середовища, які у наномолярних кількостях потрапляють у водойми разом з побутовими та сільськогосподарськими стоками (Ebele et al., 2017; Matozzo et al., 2020) та вирізняються впливом на метал-депонувальну функцію у цільових організмах. Разом з тим було, створено умови, які відповідають екологічно реальним, зокрема комбінація одночасних впливів кількох чинників при підвищеній температурі, що характерно для природніх водойм в умовах змін клімату. Ми виходили з того, що, на даний час немає чітких меж визначення адаптаційних можливостей організму щодо певного пошкоджуючого чинника, оскільки ефективність таких молекулярних механізмів напряду залежать від ступеню резистентності організму, зумовленого поєднанням комплексного забруднення середовища та кліматичними аномаліями (Lionetto et al., 2021; Zeng et al., 2015)IPCC, 2014).

Використання біохімічних маркерів прийнято вважати одним з найбільш доцільних підходів для ранньої діагностики наслідків впливів на навколишнє середовище, зокрема водну біоту (IPCC, 2014). Враховуючи комплексний характер забруднення навколишнього середовища, в організмах можуть бути ініційовані різноманітні біологічні реакції, тому виникає потреба у використанні комплексу біомаркерів з різною специфічністю. Він повинен включати маркери, які дозволять ідентифікувати характерні специфічні реакції організмів на окремі забруднювачі, а також неспецифічні біомаркери, які реагують на різноманітні екологічні та хімічні фактори, зокрема демонструють ознаки окисного стресу та пошкодження клітинних структур (Lionetto et al., 2021).

Як показали результати нашого дослідження, прогноз використання МТ як метал-депонувальних протеїнів для оцінки впливу на організм ксенобіотиків, дія яких впливає на розподіл та акумуляцію металів у таргетному організмі, був виправданий. З метою диференціації впливу окремих чинників та встановлення

взаємозв'язку між окремими показниками також було використано низку статистичних методів.

У нашому дослідженні ми акцентувалися на МТ, які розглядали як тіолатні ліганди, які відображають чутливість гомеостазу металів та редокс-стану тіолів. Проте вивченню МТ у такому аспекті поєднання їх металодепонувальних та антиоксидантних властивостей у вдних організмів приділяється мало уваги (Amiard et al., 2006).

Цинк відіграє фундаментальну роль у молекулярних механізмах клітинного захисту, клітинної регуляції, передачі сигналів та метаболізму, зокрема виконуючи структурну, каталітичну та сигнальну функції (Andreini et al., 2006; Eron et al., 2018; Yamasaki et al., 2007). Тому зміни перерозподілу цього металу між клітинними мішенями, чи накопичення у вільній формі може визначити здатність організму протистояти несприятливому впливу. У літературі повідомляється, що дія різних ксенобіотиків та фізико-хімічних факторів призводить до порушення гомеостазу цинку, а відтак і до дефіциту цинку у тварин (Beaver et al., 2017; Krężel & Maret, 2016).

Здатність МТ утримувати метали визнана центральною роллю цього протеїну, проте вона залежить від окислювально-відновного стану їх тіолів (Atrián-Blasco et al., 2017, Krężel and Maret, 2017). З іншого боку, навпаки, окислювальна здатність МТ залежить від складу металів (тип металу і стехіометрія зв'язування). У фізіологічних умовах Zn(II) і Cu(I) є найбільш поширеними йонами металів, зв'язаними з МТ. Наші результати показали, що МТ *U. tumidus* зв'язують 3,1–14,9% Zn у травній залозі. Важливо, що лише для впливу диклофенаку зростання вмісту МТ-Ме співпадало зі збільшенням концентрації Zn в тканині. У інших випадках баланс загального та зв'язаного з МТ металу свідчить про зменшення вмісту цинку у вільній або депонованій у МТ формі, зокрема дія 80 нМ Раундапу викликала помітне зниження вмісту Zn в МТ, що потенційно могло призвести до підвищення рівня металу в інших клітинних формах, а вплив 40 нМ Раундапу зменшив вміст цинку у тканині, та,

відповідно, його вміст у лабільній формі. Подібно, залучення МТ у регуляцію гомеостазу Zn показали Gagné et al. (2007) для прісноводних двостулкових, які зазнали впливу міських побутових стоків.

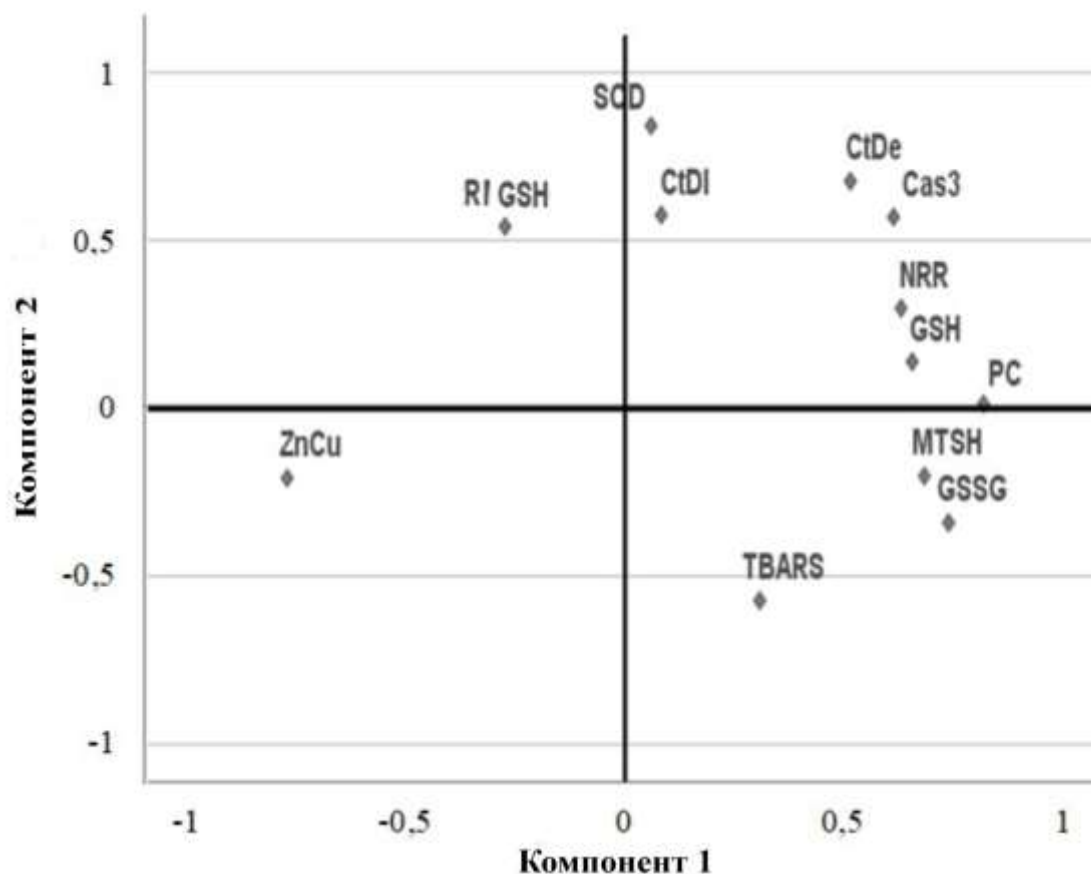


Рис. 4.1. Результати аналізу головних компонентів (PCA) показників травної залози двостулкового молюска *U. tumidus* при дії на організм диклофенаку (Dc), ніфедипіну (Nf), 80 нМ Раундапу (Rn), їх суміші при температурах 18°C (Mix) та 25°C (MixT).

Примітка. Скорочені назви показників подано у тексті.

Відповідно можна передбачити наслідки дисбалансу металу у тканині. Підвищення рівня редокс-активного Cu в тканині та зниження співвідношення Zn/Cu може бути ймовірною причиною окиснення низькомолекулярних тіолів (Atrián-Blasco et al., 2017). Крім того, метали, особливо Zn, захищають МТ від протеолізу (Lee, 2018), і цей захисний механізм послаблюється за впливу Раундапу.

Таблиця 4.1. Коефіцієнти кореляції Пірсона для показників травної залози двостулкового молюска *U. tumidus* при дії на організм диклофенаку (Dc), ніфедипіну (Nf), 80 нм Раундапу (Rn), їх суміші при температурах 18°C (Mix) та 25°C (MixT); $r=0,288$, $p=0,05$; $r=0,372$, $p=0,01$ (N=48)

Індекс	SOD	TBARS	PC	GSH	GSSG	RI GSH	MTSH	NRR	CtDL	CtDe	Cas-3
TBARS	- ,352*										
PC	,036	,250									
GSH	,145	-,003	,407**								
GSSG	-,166	,288*	,559**	,555**							
RI GSH	,316*	-,415**	-,236	,242	-,638**						
MTSH	-,031	,377**	,445**	,350*	,449**	-,243					
NRR	,168	-,020	,718**	,444**	,342*	,009	,053				
CtDL	,427* *	-,289*	,080	,028	,045	-,020	-,111	,220			
CtDe	,701* *	-,132	,373**	,304*	,130	,125	,406**	,357*	,328*		
Cas-3	,446* *	-,051	,521**	,438**	,261	,107	,172	,560**	,402**	,649**	
Zn/Cu	-,100	-,006	- ,632**	- ,532**	-,382**	-,049	-,530**	-,554**	-,026	- ,527**	- ,531**

Примітка. Скорочені назви показників подано у тексті; * – Кореляція достовірна при рівні 0,05 (2-хвостова); ** – Кореляція достовірна при рівні 0,01 (2-хвостова).

Відповідно до результатів компонентного аналізу (рис. 4.1.), угруповання біомаркерів, що включає MTSH, GSH, GSSG, а також показник стабільності лізосомальних мембран (NRR), активність каспази-3 (Cas-3) та позалізосомального катепсину Д (CtDe) та рівень окисних модифікацій протеїнів (PC), розташоване вірогідно навпроти співвідношення Zn/Cu вздовж осі Компонента 1 з максимальною відстанню між цими групами індексів. Перший головний компонент пояснює 67,3 % загальної дисперсії результатів.

Він включає низькомолекулярні тіоли GSH і MT-SH, ОМП (PC), каспазу-3 (Cas3), катепсин Д (CtD) вільний і стабільність лізосомальних мембран (NRR) і співвідношення Zn/Cu в протилежному положенні. Другий основний компонент пояснив 14,5% загальної дисперсії результатів з протилежним розташуванням антиоксидантних характеристик супероксиддисмутазної активності (SOD) і редокс-індексу глутатіону (RI GSH), катепсин Д лізосомального (CtDL) проти ТБК-АП (TBARS) (Рис. 4.1.).

Встановлені взаємозалежності підтверджуються і за допомогою визначення коефіцієнту кореляції Пірсона (Табл 4.1).

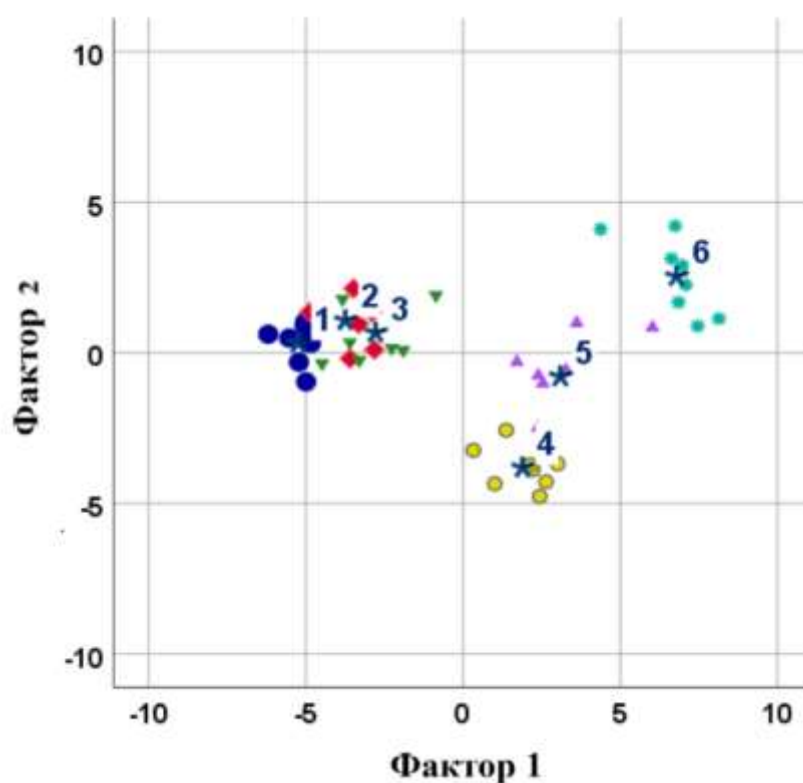


Рис. 4.2. Результати канонічного дискримінантного аналізу показників травної залози двостулкового моллюска *U. tumidus* для контрольної групи (1) та при дії на організм диклофенаку (Dc-2), ніфедипіну (Nf-3), 80 нМ Раундапу (Rn-4), їх суміші при температурах 18°C (Mіx-5) та 25°C (MіxT-6).

Результати компонентного аналізу демонструють негативну роль дисбалансу Zn/Cu у забезпеченні функціонального стану тканини та взаємозв'язок характеристик низькомолекулярних тіолів – MT та GSH – з показниками апоптозу та лізосомальної функціональності. Важливо, що

виявлена закономірність об'єднує всі досліджені у цій серії впливи – Раундапу, диклофенаку та ніфедипіну. Разом з тим, незалежне розташування показників окисного стресу відображає загальне пригнічення антиоксидантного захисту, спричинене субхронічним впливом ксенобіотиків. При цьому важливо, що окисні модифікації протеїнів корелюють не з утворенням продуктів пероксидації ліпідів, а з характеристиками тіолів та апоптозу. Це підкреслює різні механізми сигнальної участі цих ушкоджень у реакції клітин, зокрема узгодженість активності апоптозу із станом протеїнів, тіолів та лізосомальною функціональністю, тоді як утворення ТБК-АП в першу чергу характеризує неспроможність антиоксидантних ензимів (СОД) до адекватного АОЗ.

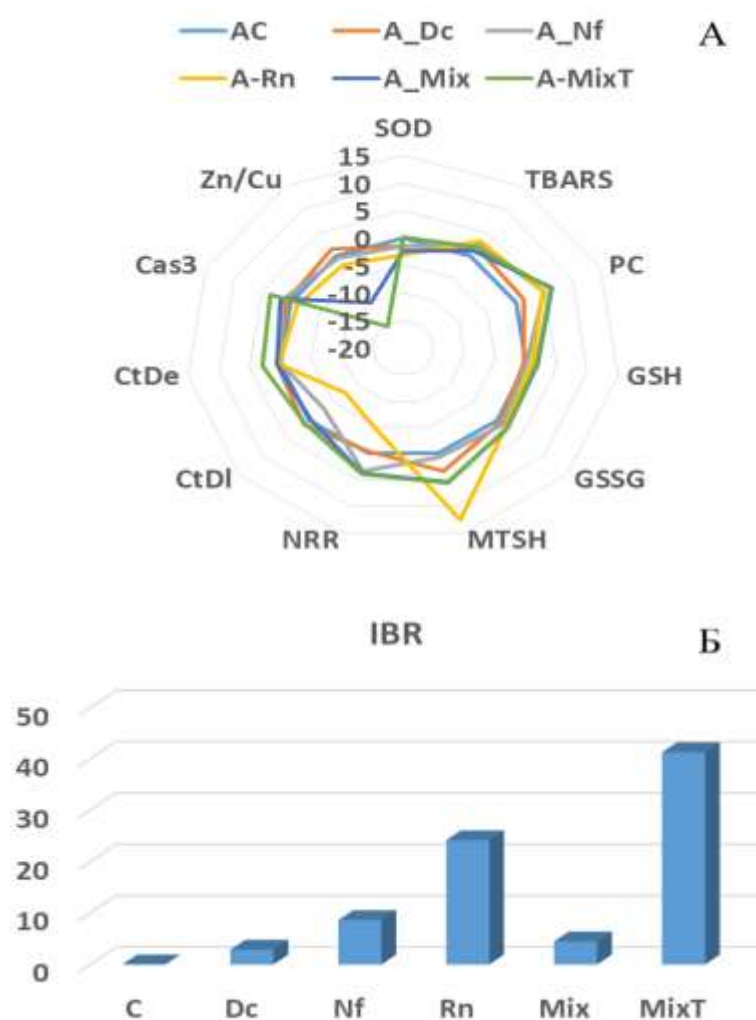


Рис. 4.3. Результати обчислення інтегрального біомаркерного індексу (IBR) при дії на організм диклофенаку (Dc), ніфедипіну (Nf), 80 нМ Раундапу (Rn), їх суміші при температурах 18°C (Mix) та 25°C (MixT) у

порівнянні до даних контрольної групи, прийнятих за «0»: А – складові індексу, Б – індекс, обчислений за рівнянням $IBR = (SOD * TBARS + TBARS * PC + PC * GSH + GSH * GSSG + GSSG * MTSH + MTSH * NRR + NRR * CTDI + CTDI * CTDe + CTDe * Cas3 + Cas3 * Zn/Cu + Zn/Cu * SOD) / 2$.

Згідно результатів ідентифікації груп за допомогою канонічного дискримінантного аналізу для першої дослідної серії (Рис. 4.2) видно, що Rn-, Міх- і МіхТ-групи добре відокремлені в просторі дискримінантних змінних від набору С-, Dc- і Nf-груп. Крім того, три останні групи також розділені в межах використаного набору параметрів своїми центроїдами, розташованими вздовж осі Функції 2. Середні значення центроїдів групи дорівнюють -5,240 (С), -3,744 (Dc) і -2,782 (Nf).

Відтак, за сумою визначених індексів, дія диклофенаку та ніфедипіну найменше позначається на біохімічних реакціях перлівниці, тоді як групи, що піддавалися впливу Раундапу та комплексній дії, особливо при 25°C, чітко локалізовані на значній відстані від інших. Цей розподіл демонструє визначальну роль впливу 80 нМ Раундапу у суміші та наявність кумулятивного ефекту, особливо для суміші при 25°C, що посилює ефект окремих складових, зокрема щодо балансу металів цинк/купрум у тканині. Результати обчислення інтегрального біомаркерного індексу (IBR) (Рис. 4.3) демонструють аналогічні залежності та наочно відображають, що у відповіді до дії суміші при 18 °С реакція організму більше подібна до дії фармацевтичних препаратів, тоді як сумарна реакція за впливу суміші при 25 °С за силою відповідає реакції на Раундап, хоча складові, які зумовлюють таку потужну реакцію організму, різні. За впливу Раундапу – це реакція МТ, а за дії суміші – співвідношення Zn/Cu (Рис. 4.3.А). Проте обидві ознаки стосуються метаболізму у тканині есенціальних металів – цинку та купруму.

Участь МТ у зв'язуванні Cu і Cd відповідає 17,1 і 61,5 % загальної концентрації металу в тканині (С-група), що відображає добре відомі властивості МТ брати участь в метаболізмі Cu та зберігати основну частину Cd в клітинах. Фармацевтичні засоби викликали збільшення частки Cu в структурі

МТ до 41–49% порівняно з загальною концентрацією. Навпаки, вплив Раундапу та двох сумішей спровокували виснаження металів, зв'язаних з МТ: незважаючи на багаторазове збільшення концентрацій Cu та Cd в тканині, накопичення цих металів у МТ знизилося до 7,5 % (Cu) і 11,6 % (Cd) у МіхТ-групі. Ці різкі зміни в розподілі металів у клітинах під час усіх впливів, пов'язаних з Раундапом, відображають або спотворення в загальному метаболізмі металів, або нездатність МТ зв'язувати метали, незважаючи на підвищену концентрацію МТ-SH. Втрата металів МТ свідчить про послаблення функціональної здатності тіолатних кластерів у цих метал-зв'язуючих структурах. У МіхТ-групі порушення накопичення та розподілу металу були найбільшими.

Особливий вплив Раундапу на біологічну поведінку металів було відзначено у низці досліджень. Гліфосат є сильним хелатуючим агентом, який зв'язує макро- та мікроелементи (Mertens et al., 2018). У щурів, які отримували перорально гліфосат, окислювальний стрес супроводжувався дисбалансом металів, включаючи Zn і Cu, в тканинах (Tang et al., 2017). Було показано, що одночасний вплив на прісноводне ракоподібне *Ceriodaphnia dubia* гліфосату або Раундапу та кількох мікроелементів (Cd, Cu, Cr, Ni, Pb, Se та Zn) у бінарних комбінаціях значно знижує гостру токсичність металів (Tsui et al., 2005). У цитованому дослідженні гліфосат зміг не тільки хелатувати метали, а й викликати дисбаланс в їх біоаккумуляції. Виходячи з отриманого в цьому дослідженні співвідношення Zn/Cu, ми можемо дійти аналогічного висновку.

Грунтуючись на отриманих у першій серії експерименту результатах ми поставили за мету з'ясувати нижній поріг деметалюючого впливу Раундапу у субхронічному експерименті та порівняти його дію з відомим чинником впливу на гомеостаз металів – хлорпромазином. Вплив останнього на гомеостаз Zn через його антагонізм з багатьма Ca-залежними процесами (Xu et al., 2010; Hamaguchi et al., 2014). Зв'язок між порушеннями Ca та Zn можливий залежно від надходження Zn в клітину через кілька типів Ca-проникних каналів (Sensi et al., 1997; Bouron & Oberwinkler, 2014). Однак інформація про прямий вплив хлорпромазину на акумуляцію Zn майже відсутня, незважаючи на важливу роль

Zn у неврологічних захворюваннях (Grabrucker et al., 2011). На підтвердження цієї інформації ми виявили зниження акумуляції Zn у Crz-групі, що узгоджується з даними на моделях вищих хребетних (Xu et al., 2010; Hamaguchi et al., 2014; Sensi et al., 1997; Bouron & Oberwinkler, 2014). Специфічність впливу хлорпромазину на моллюсків підтверджується також наявністю дофамінового D1-подібного рецептора у прісноводного моллюска *Helisoma duryi* (Planorbidae) (Mukai et al., 2004). Тим не менш, у нашому дослідженні цей ефект хлорпромазину був відсутній при комплексному впливі на *U. tumidus* Rn та Crz.

Щодо впливу Раундапу, ми встановили, що у концентрації 40 нМ він майже не впливав на показники травної залози моллюска, що і відповідає кваліфікації цієї концентрації як 0,5 PNEC. Важливо, що дія 40 нМ Раундапу при поєднанні з тепловим фактором призвела до ознак дестабілізації вмісту цинку на рівні тканини, хоча МТ акумулювали ефективно цинк, це стало, очевидно, адаптивною реакцією на зменшення вмісту цинку у тканині. Подібне зниження рівня Zn у тканині було показано у НДЛ раніше при дії наночастинок ZnO на організм моллюска за підвищеної температури (Falfushynska et al., 2015). Подібне посилення реакції організму на вплив Раундапу за теплового навантаження було показано дослідженні Amid та ін. (2018) на прикладі тропічних коралів *Acropora formosa*.

За даними канонічного дискримінантного аналізу, всі праметри в групах C-, RnCrz- і Crz та 75% параметрів у групах Rn- і RnT були вірно класифіковані. На рис. 4.4. видно, що C- і Rn-групи зі значеннями центроїдів груп -7,55 і -3,96 відповідно розділені в просторі дискримінантних змінних уздовж осі 1 та розташовується наспроти Crz-групи зі значенням центроїда 7,33. Групи RnT- і RnCrz, які піддавали дії комбінацій чинників були розміщені між цими крайніми локаціями зі значеннями центроїдів 2,97 і 2,51 стосовно осі 2 відповідно. Отже, на відміну від дії 80 нМ Раундапу, удвічі менша його концентрація викликає найменші зміни параметрів порівняно з іншими групами, тоді як дія хлорпромазину найбільш вирізняється. Разом з тим, за комбінованих впливів експериментальні групи мають подібну локацію,

причому більш наближену до групи, яку піддавали дії 40 нМ Раундапу, ніж групи, що зазнавала лише впливу хлорпромазину. Відтак, навіть у мінімальній концентрації у реальних умовах комплексного забруднення Раундап здатний визначати реакцію молюска. На нашу думку, дослідження комплексних впливів ксенобіотиків на організм дозволяє визначати пріоритетні складники та умови пошкоджуючого впливу (тепловий ефект, тощо), що сприятиме прогнозу реальних екологічних загроз у водоймах.

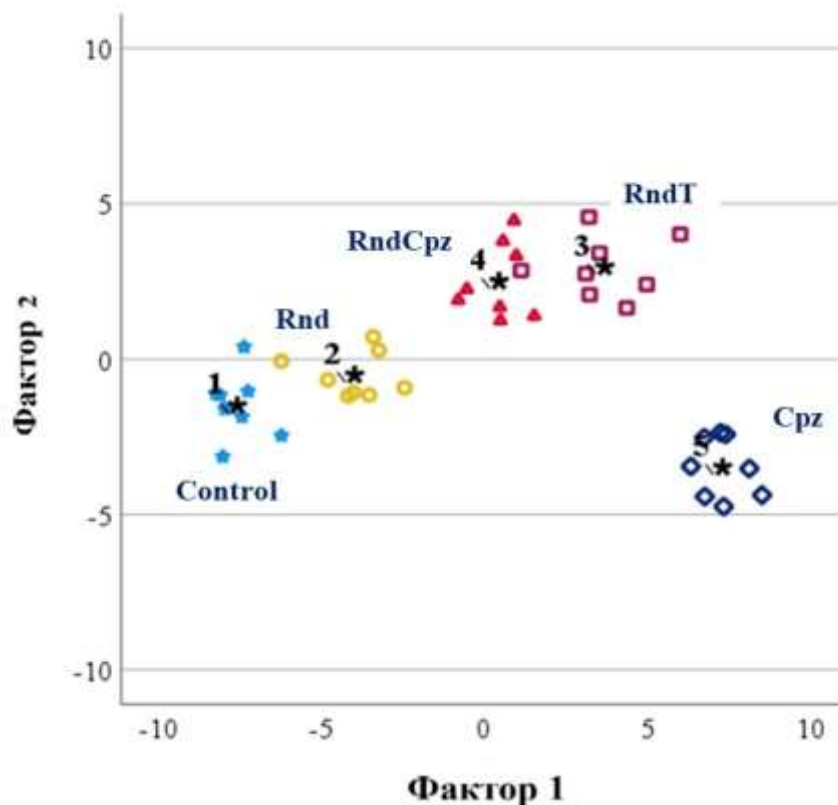


Рис. 4.4. Результати канонічного дискримінантного аналізу показників травної залози двостулкового молюска *U. tumidus* для контрольної групи (1) та груп, які зазнали впливу 40 нМ Раундапу при 18°C (Rn, 2), при 25°C (RnT, 3), Раундапу та хлорпромазину (RnCpz, 4) та хлорпромазину (Cpz, 5).

Розраховані значення IBRn порівняно зі значенням параметрів для контрольної групи, які були прийняті за 0 узгоджуються з результатами канонічного дискримінантного аналізу (Рис. 4.5). Найвищі значення IBRn спостерігалися в групах, які піддавали впливу суміші 40 нМ Раундапу та

хлорпромазину і хлорпромазину поокремо. При цьому дисбаланс загального а акумульованого в МТ цинку за впливу хлорпромазину та загальна активація функцій МТ та глутатіону за впливу всіх Раундап-вмісних експозицій є найбільш визначальними.

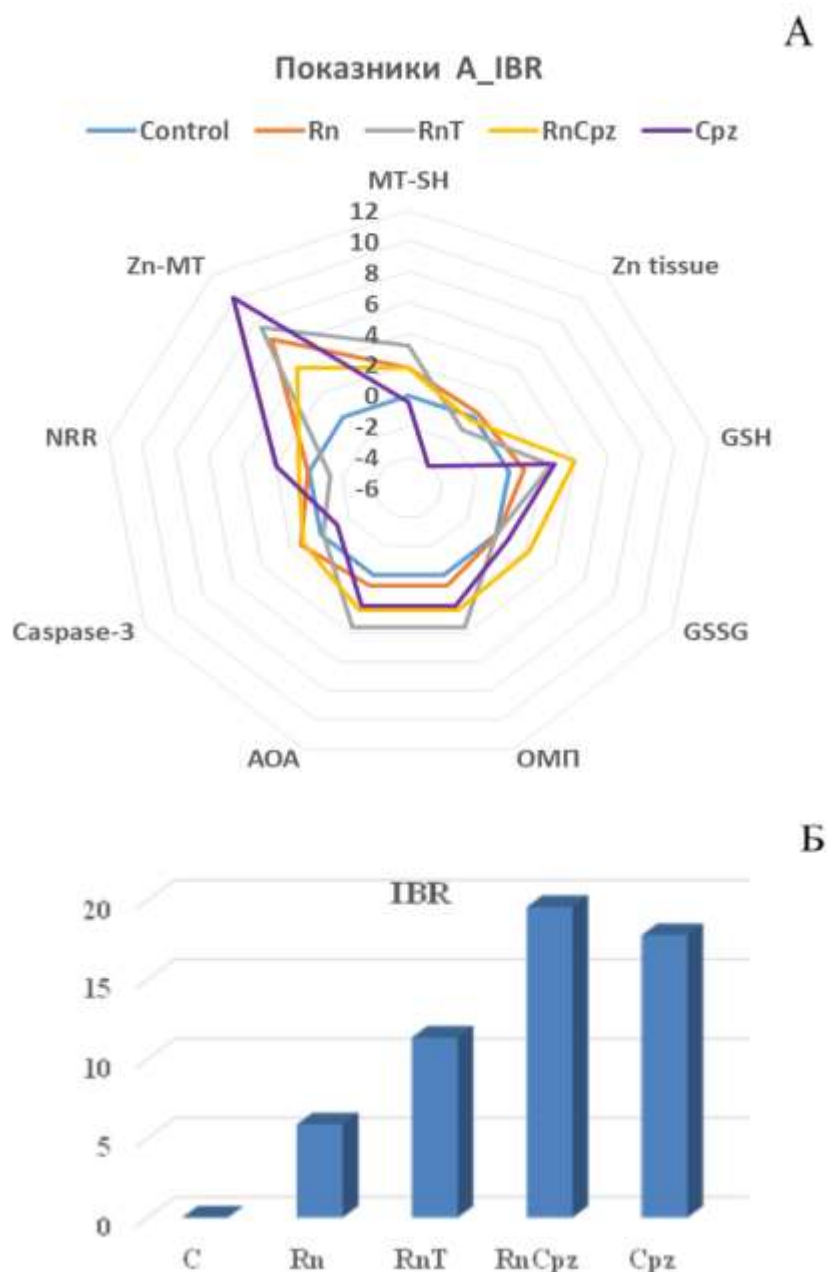


Рис. 4.5. Результати обчислення інтегрального біомаркерного індексу (IBR) при дії на організм 40 нМ Раундапу при 18°C (Rn), при 25°C (RnT), Раундапу та хлорпромазину (RnCpz) та хлорпромазину (Cpz) у порівнянні до даних контрольної групи, прийнятих за «0»: А – складові індексу, Б - індекс, обрахований за рівнянням $IBR = (Zn-MT * MT-SH + MT-SH * Zn + Zn * GSH + GSH * GSSG + GSSG * OMP + OMP * AOA + AOA * Cas3 + Cas3 * NRR + NRR * Zn-MT) / 2$.

Таблиця 4.2. Підсумкова схема ефектів 40 та 80 нМ Раундапу (Rn(40); Rn(80)), фармацевтичних препаратів диклофенаку (Dc), ніфедипіну (Nf), хлорпромазину (Cpz) суміші 80 нМ Раундапу, диклофенаку та ніфедипіну при температурі 18о С (Mix(80)) та 25о С (MixT(80)), поєднаного впливу 40 нМ Раундапу та теплового чинника (RnT(40)) та 40 нМ Раундапу та хлорпромазину (RnCpz(40)) на організм *U. tumidus* за характеристиками травної залози у субхронічному експерименті

Групи/ Показники	Rn (80)	Rn (40)	RnT (40)	Dc	Nf	Cpz	RnCpz (40)	Mix (80)	MixT (80)
Zn/Cu	↓	0	0	↑	—	0	0	↓	↓
Zn t	—	—	↓	↑	—	↓	—	—	↓
Zn in MT	↓	↑	↑	↑	—	↑	↑	—	—
MT-SH	↑	↑	↑	↑	↑	—	↑	↑	↑
MT-Me	↓	↑	↑	↑	—	↑	↑	—	—
GSH	—	—	↑	—	—	↑	↑	↑	↑
GSSG	↑	—	—	—	↑	—	↑	↑	↑
RI	↓	—	↑	↓	↓	↑	↑	↓	—
SOD	↓	↑	—	↓	↓	—	—	↓	↑
CAT	0	—	—	0	0	↓	—	0	0
Заг. ААЗ	0	↑	↑	0	0	↑	↑	0	0
ТБК-АП	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
ОМП	↑	—	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
CatDe	—	0	0	—	↓	0	0	—	↑
CatDL	↓	0	0	↑	↓	0	0	—	↑
NRR	↓	—	↓	—	↑	↑	—	↑	↑
Cas-3	—	↑	—	—	↑	—	↑	↑	↑

Примітка.

↑	Зросло порівняно з контролем	↓	зменшилося порівняно з контролем	—	Не змінилося порівняно з контролем	0	Параметр не визначався
---	------------------------------	---	----------------------------------	---	------------------------------------	---	------------------------

Як видно із підсумкової схеми результатів субхронічного експерименту, отримані нами результати дозволили визначити специфічні ознаки токсичності для кожного з використаних ксенобіотиків, причому окремі з них

спостерігались тільки при самотійному впливі, а деякі були виражені і при комплексній дії. У більшості випадків за комплексного впливу домінував ефект Раундапу, причому він найбільше проявлявся за ознаками цинк-депонувальної функції МТ. З іншого боку домінуючий вплив фармацевтичних препаратів у сумішах був найкраще виражений для ніфедипіну та, меншою мірою, хлорпромазину (не зважаючи на те, що окрема дія останнього вирізняла його помітно від дії Раундапу). Специфічні ефекти цих препаратів проявлялися у їх впливі на лізосомальні характеристики, зокрема унікальній здатності посилювати стабільність їх мембран, та ензими апоптозу, що і відповідає ефектам цих препаратів, які повідомлялися для моделей вищих тварин (Elferink, 1982; Okamoto & Lefer, 1983; Mak et al., 1992; Anand et al., 2019).

Температурний чинник відігравав непрогнозовану роль у впливі ксенобіотиків на організм молюска. Зокрема, у групі, що піддавалася спільному впливу фармацевтичних препаратів та 80 нМ Раундапу за температури 25 оС нівелювалися прооксидантні ефекти, які спостерігалися за температури 18 оС та за окремих впливів. З огляду на кліматичні аномалії, що супроводжуються підвищенням температури води у прісних водоймах, великої ваги набуває встановлення чутливих індикаторів теплової дії на водні організми-ектотерми. Факти посилення окисного стресу та втрати здатності систем детоксикації молюсків за підвищеної температури спостерігалися нами і раніше у екземплярів з застійних водойм, зокрема у ділянках ГЕС (Gnatyshyna et al., 2020b)..

Реакція на окислювальний стрес є одним із найбільш досліджених проявів токсичного впливу ксенобіотиків у двостулкових молюсків (Giuliani et al., 2013). У нашому дослідженні окисне пошкодження (підвищені рівні ТБК-АП, ОМБ, GSSG, зниження Редокс індексу GSH) у травній залозі молюсків було встановлено майже у всіх експозиціях. Це було пов'язано зі зниженням активності антиоксидантних ферментів СОД (єдиний виняток активації СОД у МіхТ-групі). Подібні результати спостерігали у молюсків, які піддалися впливу досліджуваних речовин. Фармацевтичні препарати, включно з диклофенаком,

спровокували значні зміни активності основних антиоксидантних ферментів та/або їх транскрипційного рівня (Bebiano et al., 2017; Fontes et al., 2018; Trombini et al., 2019). Ніфедипін, у високій концентрації (10 мкМ, 14 днів) викликав активізацію СОД у *U. tumidus* (Falfushynska et al., 2015) та (5 і 20 мкМ) посилив ПОЛ в культивованих ендотеліальних клітинах. клітини (Mak et al., 1992). Було виявлено, що Раундап, подібно до наших умов впливу, знижує активність СОД у травній залозі мідії *M. galloprovincialis* (Matozzo et al., 2019). Однак висока концентрація та триваліший вплив гліфосату на мідії золотистої *Limnoperna fortunei* не викликали змін у рівнях СОД, GSH, ТБК-АП та ОМП (Iummato et al., 2018). Ефект Раундапу на систему АОЗ у двостулкових молюсків ґрунтовно обговорюється у огляді Matozzo et al. (2019), здебільшого на прикладі стану гемоцитів.

Порівняння вмісту протеїну МТ (за групами –SH) та металюваного МТ у нашому дослідженні показує, що МТ не був повністю залучений у зв'язування металу, і цей дисбаланс неметалюваної форми потенційно міг посилювати антиоксидантний потенціал у клітинах. Проте внесок МТ у вигляді тіолів в антиоксидантну здатність тіолому часто недооцінюється (Cavaletto et al., 2002). Тим не менш, МТ забезпечують еквівалентний до глутатіону у травній залозі молюсків - близько 500-700 нмоль·г⁻¹ SH-груп. Крім того, окислювально-відновний потенціал МТ дуже низький, нижчий, ніж у GSH (Krežel & Maret, 2017). Як свідчать наші результати, саме підвищений вміст МТ та його неповне металювання могли забезпечувати досить високий антиоксидантний потенціал у тканині молюска, незважаючи на зниження інших антиоксидантних активностей (СОД). Крім того, окислювально-відновний потенціал МТ дуже низький, нижчий, ніж у GSH (Krežel & Maret, 2017). МТ здатні знешкоджувати гідроксильний радикал (OH) з ефективністю в 300 разів більшою, ніж GSH (Sato & Bremner, 1993). Типовий прооксидант, перекис водню, викликав окислювальний стрес у травній залозі *M. galloprovincialis* в концентрації 20 мкМ, проте підвищення МТSH на 43% після 4-денного впливу, очевидно, зумовило антиоксидантні зміни (Cavaletto et al., 2002). Trombini et al. (2019)

повідомляли про підвищення вмісту MTSN у травній залозі молюска *Ruditapes philippinarum* після 7-денного впливу 15 мкг/л диклофенаку, тоді як через 14 днів це підвищення нівелювалося. У дослідженні Soudani et al. (2019), було доведено посилення експресії генів MT (MT I та MT II) у щурів, які отримували гліфосат протягом 15 днів. MT були визнані ймовірними учасниками у антиоксидантному захисті у *U. tumidus* у природних популяціях (Gnatyshyna et al., 2020). Докази антиоксидантної ролі MT підтверджуються також результатами досліджень впливу заліза та кадмію на мідії *M. galloprovincialis* (Viarengo et al., 1999). Відтак, наведені аргументи дозволяють кваліфікувати MT як чутливий до пошкоджуючих впливів біомаркер.

В останні роки у екотоксикологічних дослідженнях водних організмів відзначаються окремі факти застосування підходу *ex vivo*. Він заслуговує на увагу завдяки своїм перевагам, таким як підтримка міжклітинних взаємодій (на відміну від *in vitro* експозицій) та здатність виявляти прямий вплив на ізольовану тканину (Vehovszky et al. 2018; El Haj et al. 2019; Rehberger et al. 2018). Тому для перевірки гіпотези про адгезивну дію Раундапу щодо цинку у організмі двостулкового молюска ми застосували цей підхід, що дозволив спостерігати короткотривалу дію Раундапу на рівні тканини.

Дослідження підтвердило доречність цього підходу для розуміння прямого впливу Раундапу на живі тканини. Якщо у субхронічному експерименті в умовах *in vivo* вплив Раундапу (гліфосату) концентрацією ~80 нМ, а також 40 нМ за поєднання з тепловим впливом викликав дисбаланс цинку, то результати, представлені в цьому дослідженні, не підтверджують гіпотезу про прямий вплив Раундапу. Дійсно, вплив Zn збільшував концентрацію Zn т і Zn-MTs як при окремій дії (Zn-група), так і в поєднанні з Rn(ZnRn-група). З іншого боку, комбінація ZnTп нівелювала вплив цинку на накопичення цього металу в тканині та MT. Разом з тим, вплив Раундапу призводив до збільшення концентрації MTSN, так само, як за впливу *in vivo*. Така реакція могла бути викликана прооксидантним впливом Раундапу або цинку у гостротоксичному експерименті. Дійсно, як Раундап, так і цинк можуть спровокувати

окислювальні зміни залежно від умов впливу (Kukic et al. 2014; McCord & Aizenman 2014; Matozzo et al. 2020). Однак іммобілізація Zn (у Tп- та ZnTп-групах) може нівелювати цю відповідь (Andrews, 2000). Ми підтвердили це зменшення рівню MTSН у комбінованих експозиціях двома методами (визначення тіолів та результати електрофорезу).

Токсичність Раундапу найбільш чітко проявляється як зниження вмісту GSH. Разом з тим, посилене окиснення глутатіону виявилось спільною реакцією у цій дослідній серії. Проте ми не можемо підтвердити це спостереження іншими дослідженнями, оскільки GSH/GSSG не вивчалися у відомих прикладах вивчення впливу в умовах *ex vivo* (Vehovszky et al. 2018; El Haj et al. 2019). Отже, прямий вплив Раундапу на акумуляцію цинку не підтвердився, проте було показано, що його дестабілізуюча дія на лізосоми є загальною ознакою короткотривалого та субхронічного впливу, що спостерігалось і у іншому експерименті *ex vivo* (El Haj et al. 2019).

Відповідно до факторного аналізу наборів даних, компоненти 1 і 2 пояснюють 57,7% застосованих індексів. Серед досліджуваних змінних індекси тіолів, MTSН та RI GSH згруповані протилежно до GSSG у межах першого головного компонента (PC1) з факторним навантаженням вище $|0,85|$. Показники накопичення Zn (Zn-MT, Zn t) та NRR були розташовані навпроти каспази-3 (факторне навантаження вище $|0,50|$). Рівні GSH і TAC не були суттєво пов'язані ні з PC1, ні з PC2, що відбиває їх специфічну до обраного чинника реакцію. Результати канонічного дискримінантного аналізу показали, що всі зразки в C-, Rn, Zn- та ZnRn-групах були коректно класифіковані, тоді як Tр- та ZnTр-групи мали перекриття складових. C-група чітко відокремлювалася від набору всіх експонованих груп уздовж осі 1.

Інтегральний аналіз показав, що закономірності накопичення та розподілу Zn взаємопов'язані з лізосомною стабільністю та апоптотичною активністю (Рис. 4.6А). Специфічний ефект Раундапу та відсутність таких ефектів при комбінованому впливі відображається за результатами дискримінантного аналізу, оскільки Zn- та ZnRn-групи об'єднані разом і розташовані окремо від

Rn-групи (Рис 4.6Б). З іншого боку, адгезивна дія ТПЕНу щодо цинку ілюструється спільною локалізацією Tr- і ZnTr-груп.

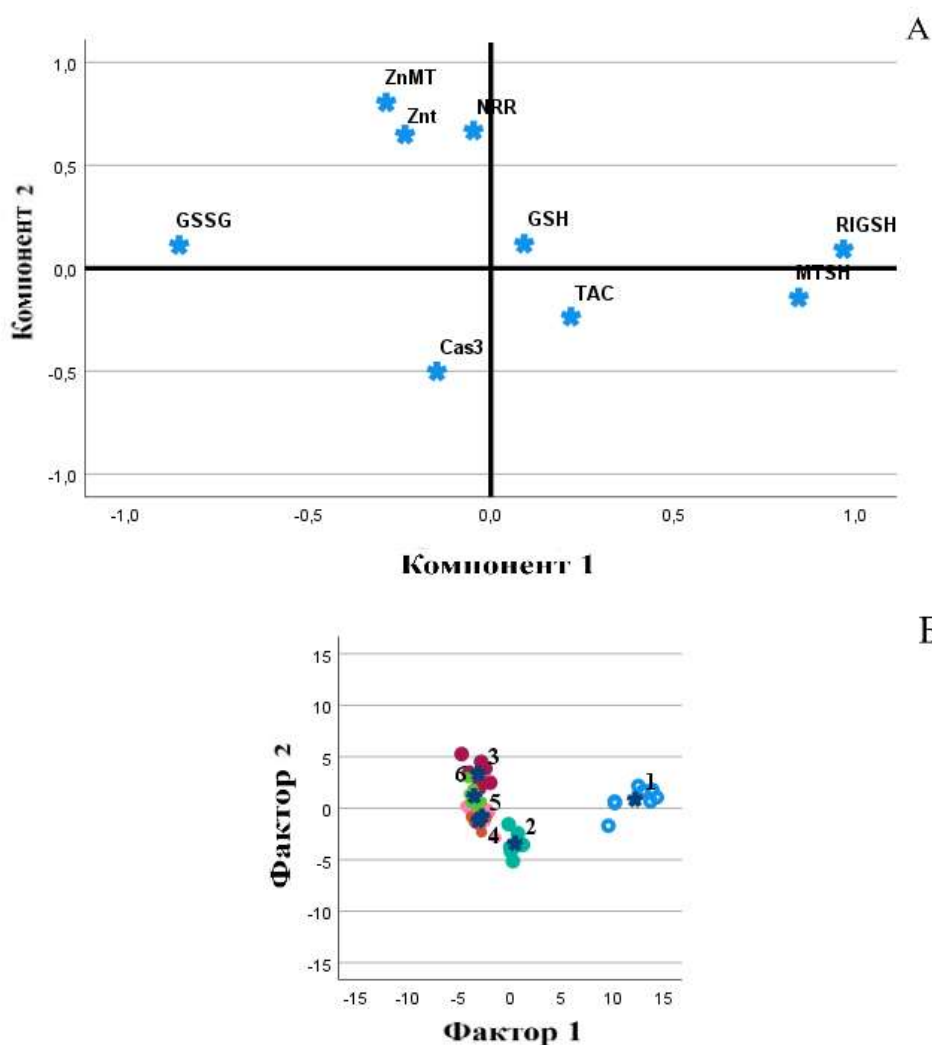


Рис. 4.6. Результати аналізу головних компонентів, застосованих для виявлення зв'язків між вимірними параметрами (А) та діаграмами розсіювання канонічних значень на першій та другій осях канонічних дискримінантів для розрізнення груп (Б) *U. tumidus*, підданих *ex vivo* впливу ксенобіотиків. Скорочення для «А»: Znt, Zn в тканині; Zn-MT, цинк в металотіонеїнах; MTSH, концентрація протеїну металотіонеїнів; GSH, GSSG, RI GSH, рівні глутатіону відновленого, окисненого та редокс індекс глутатіону; TAC, загальна антиоксидантна активність; cas3, каспаза-3; NRR, лізосомна стабільність; для «Б»: контрольна група (1); групи, піддані впливу Rn (2), Zn (3), Tr (4), ZnTr (5) і ZnRn (6).

Відтак, порівняння комбінованого впливу цинку і Раундапу та і Zn і TPEN довело, що порушення функціональності Zn, зазначене при субхронічному впливі Раундапу на молюсків, не було результатом прямої взаємодії. Отриманий експеримент уперше застосував TPEN для визначення активності Zn у тканинах молюска. Загалом, підхід *ex vivo* може бути корисним у дослідженні чисельних водних забруднювачів, оскільки він дозволяє у короткотривалому експерименті моделювати пряму дію ксенобіотиків на біологічні тканини.

Відтак, у дисертаційній роботі встановлено спільні особливості функціонального стану металотіонеїнів двостулкових молюсків *U. tumidus* за впливу Раундапу у низьких екологічно реальних концентраціях, що пов'язані з деметалюванням цих протеїнів. Доведено, що дестабілізуюча дія Раундапу на цинк-залежні функції реалізується опосередковано через його прооксидантний вплив та ураження лізосомальних мембран. Інтегральний аналіз довів, що серед досліджуваних ефектів Раундапу, його вплив на клітинні низькомолекулярні тіоли MT та GSH/GSSG був найбільш вираженим та послідовним, що робить ці показники перспективним біомаркерами токсичного впливу Раундапу.

Відзначено, що фармацевтичні препарати диклофенак, ніфедипін та хлорпромазин, які відомі як препарати, що впливають на транспорт та акцептування металів у клітинах таргетних організмів, у екологічно реальних концентраціях спричинюють низку специфічних реакцій металотіонеїнів, системи антиоксидантного захисту, ензимів апоптозу та функціонального стану лізосом. Проте більшість цих реакцій, за виключенням стабілізації лізосом, нівелюється за спільного впливу з Раундапом. Отримані результати вивчення комбінованого субхронічного (*in vivo*) та безпосереднього (*ex vivo*) впливу Раундапу та фармацевтичних препаратів у поєднанні з тепловим впливом на молюска *U. tumidus* свідчать про перспективність запропонованих дослідних схем для оцінки екологічно реального впливу забруднювачів водного середовища на біоту.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі отримано докази специфічної реакції молюска *U. tumidus* на субхронічну дію на організм та пряму дію на рівні тканини гербіциду Раундапу, що проявляється як дестабілізація участі металотіонеїнів у метаболізмі цинку посередництвом прооксидантної дії та як ураження функціонального стану лізосом у тканині травної залози залежно від концентрації Раундапу та теплового чинника. Для фармацевтичних препаратів кальцій-модулюючої дії доведено стабілізуючий вплив на мембрани лізосом. За поєднаної дії Раундапу та фармацевтичних препаратів домінує ефект Раундапу на цинк-депонувальну функцію та пригнічується його антистабілізаційний вплив на мембрани лізосом. Збільшення концентрації металотіонеїнів та їх антиоксидантний потенціал як низькомолекулярних тіолів проявляється як неспецифічна реакція до впливу всіх експериментальних чинників за винятком хлорпромазину. Проапоптична дія досліджених ксенобіотиків посилюється у суміші за підвищеної температури.

1. За допомогою гель-розподільчої хроматографії, електрофорезу у ПААГ виділено металотіонеїни з травної залози молюска та встановлено оптимальні умови їх виділення як цинк-металотіонеїнів з дводоменною структурою. В експериментальних умовах не спостерігалось утворення однодоменної або димерної форм металотіонеїнів за виключенням впливу на організм суміші Раундапу (80 нМ), диклофенаку (2 нМ), ніфедипіну (2 нМ) та температури 25° С, коли у профілі елюції відзначено ознаки їх димеризації.

2. Встановлено що за субхронічної експозиції до 40 та 80 нМ Раундапу окремо, чи в суміші при температурі 18° С та 25° С, а також диклофенаку і ніфедипіну відбувається збільшення концентрації протеїну металотіонеїну у травній залозі, особливо за спільного впливу 40 нМ Раундапу та підвищеної температури (на 57,7%). Хлорпромазин (56 нМ) не викликав змін концентрації металотіонеїну.

3. Вплив на організм перлівниці диклофенаку, ніфедипіну, хлорпромазину, 40 нМ та 80 нМ Раундапу, його поєднаного впливу з

диклофенаком та ніфедипіном та хлорпромазином за 18° С та 25° С, порушує акумуляцію та розподіл металів у травній залозі. За впливу 40 нМ Раундапу зменшується вміст цинку у тканині. Вміст металованої форми металотіонеїнів зменшується за впливу 40 нМ Раундапу при 25° С та 80 нМ Раундапу (удвічі) порівняно з контролем. Дія диклофенаку та ніфедипіну приводить до збільшення вмісту купруму та (диклофенак) цинку у складі металотіонеїнів. За окремого та комбінованого впливу 80 нМ Раундапу зменшується співвідношення вмісту Zn/Cu у тканині.

4. Встановлено, що дія на організм моллюска Раундапу (80 нМ), диклофенаку, ніфедипіну та хлорпромазину окремо та у поєднанні з Раундапом призводить до прооксидантний проявів – збільшення утворення ТБК-активних продуктів пероксидації ліпідів та окисних модифікацій протеїнів. Дія на організм 40 нМ Раундапу при 18° С активує супероксиддисмутази, при 25° С не змінює її, а 80 нМ Раундапу, диклофенак, ніфедипін та їх суміш (при 18° С) пригнічують активність супероксиддисмутази, а хлорпромазин - каталази.

5. Вміст та співвідношення GSH/GSSG чутливо реагують на вплив на організм ксенобіотиків. Вплив на організм 80 нМ Раундапу, хлорпромазину та всіх поєднань ксенобіотиків викликає збільшенні вмісту GSH порівняно з контролем. Разом з тим, 80 нМ Раундапу, диклофенак, ніфедипін та їх суміш при 18° С зменшують редокс-індекс GSH. Дія 40 нМ Раундапу при 25° С, спільно з хлорпромазином та хлорпромазин окремо викликають збільшення редокс-індексу GSH, що корелює із зростанням загальної антиоксидантної активності у тканині травної залози.

6. Доведено, що Раундап (80 нМ та 40 нМ при 25° С) викликає дестабілізацію лізосомальних мембран у травній залозі та (80 нМ) пригнічує активність лізосомального катепсину Д. Препарати ніфедипіну та хлорпромазину, що асоціюються з гомеостазом кальцію, посилюють стабілізацію лізосомальних мембран за впливу поокремо та у сумішах (ніфедипін). Вплив 40 нМ Раундапу, ніфедипіну та його сумішей активують каспазу-3. При дії суміші ніфедипіну, диклофенаку, 80 нМ Раундапу при 25° С

відзначено ознаки посилення апоптозу/аутофагії як одночасне збільшення активностей каспази-3 та естралізосомальної форми катепсину Д.

7. У експерименті *ex vivo* з використанням 3 мкМ-их концентрацій реагентів Раундап, на відміну від хелатора цинку ТПЕНу, не блокує акумуляцію цинку у металотіонеїнах, що доводить відсутність прямої цинк-хелатуючої активності Раундапу у клітинах. Дія Раундапу окремо та у поєднанні з цинком зменшує рівень GSH, загальну антиоксидантну активність у тканині та стабільність лізосомальних мембран. Зменшення редокс-індексу глутатіону є загальною ознакою інкубації *ex vivo*.

8. Застосування інтегральних індексів та диференційного аналізу результатів дозволило визначити специфічні молекулярні мішені впливу стресорних чинників, що реагують як за окремої, так і комбінованої дії.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ:

1. Aebi H. (1974). Catalase. *Methods of Enzymatic Analysis*, 2, 673-684. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-091302-2.50032-3>
2. Alkimin, G. D., Nunes, B., Soares, A. M. V. M., Bellot, M., Gómez-Canela, C., & Barata, C. (2020). *Daphnia magna* responses to fish kairomone and chlorpromazine exposures. *Chemico-Biological Interactions*, 325, 109123. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109123>
3. Al-Odaini, N., Zakaria, M., Yaziz, M., Surif, S., & Abdulghani, M. (2011). The occurrence of human pharmaceuticals in wastewater effluents and surface water of Langat River and its tributaries, Malaysia. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 93, 245-264. <https://doi.org/10.1080/03067319.2011.592949>
4. Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., & Rainbow, P. S. (2006). Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 76(2), 160–202. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.08.015>
5. Amid, C., Olstedt, M., Gunnarsson, J. S., Le Lan, H., Tran Thi Minh, H., Van den Brink, P. J., Hellström, M., & Tedengren, M. (2018). Additive effects of the herbicide glyphosate and elevated temperature on the branched coral *Acropora formosa* in Nha Trang, Vietnam. *Environmental science and pollution research international*, 25(14), 13360–13372. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8320-7>
6. Anand, A., Liu, B., Dicroce Giacobini, J., Maeda, K., Rohde, M., & Jäättelä, M. (2019). Cell Death Induced by Cationic Amphiphilic Drugs Depends on Lysosomal Ca²⁺ Release and Cyclic AMP. *Molecular cancer therapeutics*, 18(9), 1602–1614. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-18-1406>
7. Andreini, C., Banci, L., Bertini, I., & Rosato, A. (2006). Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *Journal of Proteome Research*, 5(1), 196–201. <https://doi.org/10.1021/pr050361j>
8. Andrews, G. K. (2000). Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochemical Pharmacology*, 59(1), 95–104. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(99\)00301-9](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(99)00301-9)

9. Annett, R., Habibi, H. R., & Hontela, A. (2014). Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. *Journal of Applied Toxicology*, *34*, 458–479. <https://doi.org/10.1002/jat.2997>
10. Appelqvist, H., Wäster, P., Kågedal, K., & Öllinger, K. (2013). The lysosome: from waste bag to potential therapeutic target. *Journal of Molecular Cell Biology*, *5*(4), 214–226. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjt022>
11. Arini, A., Daffe, G., Gonzalez, P., Feurtet-Mazel, A., & Baudrimont, M. (2014). Detoxification and recovery capacities of *Corbicula fluminea* after an industrial metal contamination (Cd and Zn): A one-year depuration experiment. *Environmental Pollution*, *192*, 74–82. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.04.012>
12. Atama, C. I., Nnaji, E. C., Christian Ezeoyili, I., Udeani, F. O., Onovo, C. J., Ike Ossai, N., Oscar Aguzie, I., & Nwani, C. D. (2020). Neuromodulatory and oxidative stress evaluations in African catfish *Clarias gariepinus* exposed to antipsychotic drug chlorpromazine. *Drug and chemical toxicology*, *45*(3), 1318–1324. <https://doi.org/10.1080/01480545.2020.1822391>
13. Atrián-Blasco, E., Conte-Daban, A., & Hureau, C. (2017). Mutual interference of Cu and Zn ions in Alzheimer's disease: perspectives at the molecular level. *Dalton Transactions*, *46*(38), 12750–12759. <https://doi.org/10.1039/C7DT01344B>
14. Babula, P., Masarik, M., Adam, V., Eckschlager, T., Stiborova, M., Trnkova, L., Skutkova, H., Provaznik, I., Hubalek, J., & Kizek, R. (2012). Mammalian metallothioneins: properties and functions. *Metallomics: Integrated Biometal Science*, *4*(8), 739–750. <https://doi.org/10.1039/c2mt20081c>
15. Baier, F., Gruber, E., Hein, T., Bondar-kunze, E., Ivankovi, M., Mentler, A., Spangl, B., Zaller, J. G., & Bru, C. A. (2016). Non-target effects of a glyphosate-based herbicide on Common toad larvae (*Bufo bufo*, Amphibia) and associated algae are altered by temperature. *PeerJ*, *4*, e2641. <https://doi.org/10.7717/peerj.2641>
16. Bao, Y., Liu, X., Zhang, W., Cao, J., Li, W., Li, C., & Lin, Z. (2016). Identification of a regulation network in response to cadmium toxicity using blood clam *Tegillarca granosa* as model. *Scientific Reports*, *6*(1), 35704.

<https://doi.org/10.1038/srep35704>

17. Beaver, L. M., Truong, L., Barton, C. L., Chase, T. T., Gonnerman, G. D., Wong, C. P., Tanguay, R. L., & Ho, E. (2017). Combinatorial effects of zinc deficiency and arsenic exposure on zebrafish (*Danio rerio*) development. *PloS One*, *12*(8), e0183831. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183831>

18. Bebianno, M. J., Mello, A., Serrano, M., Flores-Nunes, F., Mattos, J. J., Zacchi, F. L., Piazza, C. E., Siebert, M. N., Piazza, R. S., Gomes, C., Melo, C., & Bainy, A. (2017). Transcriptional and cellular effects of paracetamol in the oyster *Crassostrea gigas*. *Ecotoxicology and environmental safety*, *144*, 258–267. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.06.034>

19. Beliaeff, B., & Burgeot, T. (2002). Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *21*(6), 1316–1322.

20. Bell, S. G., & Vallee, B. L. (2009). The metallothionein/thionein system: an oxidoreductive metabolic zinc link. *ChemBioChem*, *10*(1), 55–62. <https://doi.org/10.1002/cbic.200800511>

21. Bi, Y., Palmiter, R. D., Wood, K. M., & Ma, Q. (2004). Induction of metallothionein I by phenolic antioxidants requires metal-activated transcription factor 1 (MTF-1) and zinc. *The Biochemical Journal*, *380*(3), 695–703. <https://doi.org/10.1042/BJ20031677>

22. Blindauer, C. A. (2014). CHAPTER 21 Metallothioneins. In W. Maret & A. Wedd (Eds.) *Binding Transport and Storage of Metal Ions in Biological Cells* (pp. 606–665). *The Royal Society of Chemistry*. <https://doi.org/10.1039/9781849739979-00606>

23. Bouron, A., & Oberwinkler, J. (2014). Contribution of calcium-conducting channels to the transport of zinc ions. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, *466*(3), 381–387. <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1295-z>

24. Breton, T. S., & Prentiss, N. K. (2019). Metal stress-related gene expression patterns in two marine invertebrates, *Hediste diversicolor* (Annelida, Polychaeta) and *Littorina littorea* (Mollusca, Gastropoda), at a former mining site.

Comparative Biochemistry and Physiology. *Toxicology & Pharmacology : CBP*, 225, 108588. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.108588>

25. Bringolf, R. B., Cope, W. G., Mosher, S., Barnhart, M. C., & Shea, D. (2007). Acute and chronic toxicity of glyphosate compounds to glochidia and juveniles of *Lampsilis siliquoidea* (unionidae). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(10), 2094–2100. <https://doi.org/10.1897/06-519R1.1>

26. Broeg, K., & Lehtonen, K. (2006). Indices for the assessment of environmental pollution of the Baltic Sea coasts: Integrated assessment of a multi-biomarker approach. *Marine Pollution Bulletin*, 53, 508–522. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.02.004>

27. Bu, Q., Shi, X., Yu, G., Huang, J., & Wang, B. (2016). Assessing the persistence of pharmaceuticals in the aquatic environment: Challenges and needs. *Emerging Contaminants*, 2(3), 145–147. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2016.05.003>

28. Burchfield, S. L., Bailey, D. C., Todt, C. E., Denney, R. D., Negga, R., & Fitsanakis, V. A. (2019). Acute exposure to a glyphosate-containing herbicide formulation inhibits Complex II and increases hydrogen peroxide in the model organism *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 66, 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.12.019>

29. Calatayud, S., Garcia-Risco, M., Pedrini-Martha, V., Eernisse, D. J., Dallinger, R., Palacios, Ò., Capdevila, M., & Albalat, R. (2021). Modularity in Protein Evolution: Modular Organization and De Novo Domain Evolution in Mollusk Metallothioneins. *Molecular Biology and Evolution*, 38(2), 424–436. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa230>

30. Calvo, J., Jung, H., & Meloni, G. (2017). Copper metallothioneins. *IUBMB Life*, 69(4), 236–245. <https://doi.org/10.1002/iub.1618>

31. Canesi, L. (2015). Pro-oxidant and antioxidant processes in aquatic invertebrates. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1340, 1–7. <https://doi.org/10.1111/nyas.12560>

32. Cappello, T., Maisano, M., D'Agata, A., Natalotto, A., Mauceri, A., & Fasulo, S. (2013). Effects of environmental pollution in caged mussels (*Mytilus*

galloprovincialis). *Marine Environmental Research*, 91, 52–60.
<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.12.010>

33. Carles, L., Gardon, H., Joseph, L., Sanchís, J., Farré, M., & Artigas, J. (2019). Meta-analysis of glyphosate contamination in surface waters and dissipation by biofilms. *Environment International*, 124, 284–293.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.12.064>

34. Carpenè, E., Andreani, G., & Isani, G. (2007). Metallothionein functions and structural characteristics. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 21, 35–39. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2007.09.011>

35. Carvalho, R. N., Ceriani, L., Ippolito, A., & Lettieri, T. (2015). *Development of the first watch list under the environmental quality standards directive*. Publications Office of the European Union.

36. Cavaletto, M., Ghezzi, A., Burlando, B., Evangelisti, V., Ceratto, N., & Viarengo, A. (2002). Effect of hydrogen peroxide on antioxidant enzymes and metallothionein level in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. cavalett@unipmn.it. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP*, 131(4), 447–455. [https://doi.org/10.1016/s1532-0456\(02\)00030-3](https://doi.org/10.1016/s1532-0456(02)00030-3)

37. Chen, Y., Vymazal, J., Březinová, T., Koželuh, M., Kule, L., Huang, J., & Chen, Z. (2016). Occurrence, removal and environmental risk assessment of pharmaceuticals and personal care products in rural wastewater treatment wetlands. *The Science of the Total Environment*, 566–567, 1660–1669.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.06.069>

38. Cherian, M. G., & Apostolova, M. D. (2000). Nuclear localization of metallothionein during cell proliferation and differentiation. *Cellular and Molecular Biology*, 46(2), 347–356.

39. Choi, S. Y., Kim, Y. H., Lee, Y. K., & Kim, K. T. (2001). Chlorpromazine inhibits store-operated calcium entry and subsequent noradrenaline secretion in PC12 cells. *British Journal of Pharmacology*, 132(2), 411–418.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703840>

40. Conus, S., Perozzo, R., Reinheckel, T., Peters, C., Scapozza, L., Yousefi, S., & Simon, H. U. (2008). Caspase-8 is activated by cathepsin D initiating neutrophil apoptosis during the resolution of inflammation. *The Journal of experimental medicine*, *205*(3), 685–698. <https://doi.org/10.1084/jem.20072152>
41. Coyle, P., Philcox, J. C., Carey, L. C., & Rofe, A. M. (2002). Metallothionein: the multipurpose protein. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *59*(4), 627–647. <https://doi.org/10.1007/s00018-002-8454-2>
42. Coyle, P., Hubert, C. A., Philcox, J. C., & Rofe, A. M. (2001). Importance of storage conditions for the stability of zinc- and cadmium-induced metallothionein. *Biological Trace Element Research*, *81*(3), 269–278. <https://doi.org/10.1385/BTER:81:3:269>
43. Datel, J. V., & Hrabankova, A. (2020). Pharmaceuticals load in the Svihov water reservoir (Czech Republic) and impacts on quality of treated drinking water. *Water*, *12*(5), 1387. <https://doi.org/10.3390/w12051387>
44. De Francisco, P., Melgar, L. M., Díaz, S., Martín-González, A., & Gutiérrez, J. C. (2016). The Tetrahymena metallothionein gene family: twenty-one new cDNAs, molecular characterization, phylogenetic study and comparative analysis of the gene expression under different abiotic stressors. *BMC Genomics*, *17*, 346. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2658-6>
45. Deppert, W. R., & Lukačín, R. (2000). Chapter 24 - Buffers and Additives. In M. B. T.-J. of C. L. Kastner (Ed.) *Protein Liquid Chromatography* (pp. 839–862). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0301-4770\(08\)60552-7](https://doi.org/10.1016/S0301-4770(08)60552-7)
46. Dingle, J. T., Barrett, A. J., & Weston, P. D. (1971). Cathepsin D. Characteristics of immunoinhibition and the confirmation of a role in cartilage breakdown. *The Biochemical Journal*, *123*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1042/bj1230001>
47. Dingle, J. T., Barrett, A. J., & Weston, P. D. (1971). Cathepsin D. Characteristics of immunoinhibition and the confirmation of a role in cartilage breakdown. *The Biochemical journal*, *123*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1042/bj1230001>

48. Diniz, M. S., Salgado, R., Pereira, V. J., Carvalho, G., Oehmen, A., Reis, M. A. M., & Noronha, J. P. (2015). Ecotoxicity of ketoprofen, diclofenac, atenolol and their photolysis byproducts in zebrafish (*Danio rerio*). *The Science of the Total Environment*, 505, 282–289. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.09.103>
49. Dodds, W., & Whiles, M. (2010). Responses to Stress, Toxic Chemicals, and Other Pollutants in Aquatic Ecosystems. In *Aquatic Ecology, Freshwater Ecology* (pp. 399–436). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374724-2.00016-7>
50. Dong, G., Chen, H., Qi, M., Dou, Y., & Wang, Q. (2015). Balance between metallothionein and metal response element binding transcription factor 1 is mediated by zinc ions (review). *Molecular Medicine Reports*, 11(3), 1582–1586. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2969>
51. Dos Santos, K. C., & Martinez, C. B. R. (2014). Genotoxic and biochemical effects of atrazine and Roundup®, alone and in combination, on the Asian clam *Corbicula fluminea*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 100, 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.11.014>
52. Du, Y., Bales, K. R., Dodel, R. C., Hamilton-Byrd, E., Horn, J. W., Czilli, D. L., Simmons, L. K., Ni, B., & Paul, S. M. (1997). Activation of a caspase 3-related cysteine protease is required for glutamate-mediated apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(21), 11657–11662. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.21.11657>
53. Dziegiel, P., Pula, B., Kobierzycki, C., Stasiolek, M., & Podhorska-Okolow, M. (2016). Metallothioneins in normal and cancer cells. In *Metallothioneins in Normal and Cancer Cells*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27472-0_1
54. Ebele, A. J., Abou-Elwafa Abdallah, M., & Harrad, S. (2017). Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. *Emerging Contaminants*, 3(1), 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2016.12.004>
55. El Haj, Y., Bohn, S., & Souza, M. M. (2019). Tolerance of native and

invasive bivalves under herbicide and metal contamination: an ex vivo approach. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(30), 31198–31206. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06256-x>

56. Elferink J. G. (1982). Interference of the calcium antagonists verapamil and nifedipine with lysosomal enzyme release from rabbit polymorphonuclear leukocytes. *Arzneimittel-Forschung*, 32(11), 1417–1420.

57. Eron, S. J., MacPherson, D. J., Dagbay, K. B., & Hardy, J. A. (2018). Multiple Mechanisms of Zinc-Mediated Inhibition for the Apoptotic Caspases-3, -6, -7, and -8. *ACS Chemical Biology*, 13(5), 1279–1290. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.8b00064>

58. Escudero, J., Muñoz, J. L., Morera-Herreras, T., Hernandez, R., Medrano, J., Domingo-Echaburu, S., Barceló, D., Orive, G., & Lertxundi, U. (2021). Antipsychotics as environmental pollutants: An underrated threat? *Science of The Total Environment*, 769, 144634. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144634>

59. Faggio, C., Tsarpali, V., & Dailianis, S. (2018). Mussel digestive gland as a model tissue for assessing xenobiotics: An overview. *The Science of the Total Environment*, 636, 220–229. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.264>

60. Falfushynska, H., Gnatyshyna, L., Horyn, O., Shulgai, A., & Stoliar, O. (2019). A calcium channel blocker nifedipine distorts the effects of nano-zinc oxide on metal metabolism in the marsh frog *Pelophylax ridibundus*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(3), 481–489. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.10.004>

61. Falfushynska, H., Gnatyshyna, L., Yurchak, I., Sokolova, I., & Stoliar, O. (2015). The effects of zinc nanooxide on cellular stress responses of the freshwater mussels *Unio tumidus* are modulated by elevated temperature and organic pollutants. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 162, 82–93. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.03.006>

62. Fang, Y., Yang, H., Liu, B., & Zhang, L. (2013). Transcriptional response of lysozyme, metallothionein, and superoxide dismutase to combined exposure to heavy metals and bacteria in *Macra veneriformis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 157(1), 54–62.

<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2012.10.002>

63. Faria, M., Bedrossiantz, J., Ramírez, J. R. R., Mayol, M., García, G. H., Bellot, M., Prats, E., Garcia-Reyero, N., Gómez-Canela, C., Gómez-Oliván, L. M., & Raldúa, D. (2021). Glyphosate targets fish monoaminergic systems leading to oxidative stress and anxiety. *Environment International*, *146*, 106253. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106253>

64. Figueira, E., Branco, D., Antunes, S. C., Gonçalves, F., & Freitas, R. (2012). Are metallothioneins equally good biomarkers of metal and oxidative stress? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *84*, 185–190. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.07.012>

65. Floriańczyk, B. (2007). Metallothioneins and its role in metal regulation, binding of reactive oxygen species, apoptosis and cell differentiation. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research*, *1*(1), 16–18. <http://www.jpccr.eu/Metallothioneins-and-its-role-in-metal-regulation-binding-of-reactive-oxygen-species-apoptosis-and-cell-differentiation,71220,0,2.html>

66. Fontes, M., Gusso Choueri, P., Maranhão, L., Abessa, D., Mazur, W., Campos, B., Guimaraes, L., Toledo, M., Lebre, D., Marques, J., Felicio, A., Cesar, A., Almeida, E., & Pereira, C. (2017). A tiered approach to assess effects of diclofenac on the brown mussel *Perna perna*: A contribution to characterize the hazard. *Water Research*, *132*, 361–370. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.12.077>

67. Ford, A. T., & Herrera, H. (2019). ‘Prescribing’ psychotropic medication to our rivers and estuaries. *BJPsych Bulletin*, *43*(4), 147–150. <https://doi.org/DOI:10.1192/bjb.2018.72>

68. Fried, R. (1975). Enzymatic and non-enzymatic assay of superoxide dismutase. *Biochimie*, *57*(5), 657–660. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(75\)80147-7](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(75)80147-7)

69. Gagné, F., Gagnon, C., Turcotte, P., & Blaise, C. (2007). Changes in Metallothionein Levels in Freshwater Mussels Exposed to Urban Wastewaters: Effects from Exposure to Heavy Metals? *Biomarker Insights*, *2*, 117727190700200020. <https://doi.org/10.1177/117727190700200012>

70. Gao, Z., Sun, H., Chiu, S.-W., Lau, C.-P., & Li, G.-R. (2005). Effects of diltiazem and nifedipine on transient outward and ultra-rapid delayed rectifier potassium currents in human atrial myocytes. *British Journal of Pharmacology*, *144*(4), 595–604. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706113>
71. Garrett, S. H., Phillips, V., Somji, S., Sens, M. A., Dutta, R., Park, S., Kim, D., & Sens, D. A. (2002). Transient induction of metallothionein isoform 3 (MT-3), c-fos, c-jun and c-myc in human proximal tubule cells exposed to cadmium. *Toxicology Letters*, *126*(1), 69–80. [https://doi.org/10.1016/s0378-4274\(01\)00448-9](https://doi.org/10.1016/s0378-4274(01)00448-9)
72. Ge, D., Zhang, L., Long, Z., Chi, C., & Liu, H. (2020). A novel biomarker for marine environmental pollution: A metallothionein from *Mytilus coruscus*. *Aquaculture Reports*, *17*, 100364. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100364>
73. Ghoshal, K., & Jacob, S. T. (2001). Regulation of metallothionein gene expression. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, *66*, 357–384. [https://doi.org/10.1016/s0079-6603\(00\)66034-8](https://doi.org/10.1016/s0079-6603(00)66034-8)
74. Giuliani, M. E., Benedetti, M., Arukwe, A., & Regoli, F. (2013). Transcriptional and catalytic responses of antioxidant and biotransformation pathways in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to chemical mixtures. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, *134-135*, 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.03.012>
75. Gnatyshyna, L., Falfushynska, H., Horyn, O., Khoma, V., Martinyuk, V., Mishchuk, O., Mishchuk, N., & Stoliar, O. (2019). Biochemical responses of freshwater mussel *Unio tumidus* to titanium oxide nanoparticles, Bisphenol A, and their combination. *Ecotoxicology*, *28*(8), 923–937. <https://doi.org/10.1007/s10646-019-02090-6>
76. Gnatyshyna, L., Falfushynska, H., Stoliar, O., & Dallinger, R. (2020a). Preliminary Study of Multiple Stress Response Reactions in the Pond Snail *Lymnaea stagnalis* Exposed to Trace Metals and a Thiocarbamate Fungicide at Environmentally Relevant Concentrations. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *79*(1), 89–100. <https://doi.org/10.1007/s00244-020-00728-9>
77. Gnatyshyna, L., Khoma, V., Mishchuk, O., Martinyuk, V., Sprinçge, G., &

Stoliar, O. (2020b). Multi-marker study of the responses of the *Unio tumidus* from the areas of small and micro hydropower plants at the Dniester River Basin, Ukraine. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(10), 11038–11049. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-07698-4>

78. Gómez-Oliván, L. M., Neri-Cruz, N., Galar-Martínez, M., Islas-Flores, H., & García-Medina, S. (2014). Binary mixtures of diclofenac with paracetamol, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid and these pharmaceuticals in isolated form induce oxidative stress on *Hyalella azteca*. *Environmental monitoring and assessment*, 186(11), 7259–71. <https://doi.org/10.1007/s10661-014-3925-0>

79. Gonzalez-Rey, M., & Bebianno, M. (2011). Non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) ibuprofen distresses antioxidant defense system in mussel *Mytilus galloprovincialis* gills. *Aquatic Toxicology*, 105, 264–269. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.06.015>

80. Grabrucker, A. M., Rowan, M., & Garner, C. C. (2011). Brain-Delivery of Zinc-Ions as Potential Treatment for Neurological Diseases: Mini Review. *Drug delivery letters*, 1(1), 13–23. <https://doi.org/10.2174/2210303111101010013>

81. Griffith, O. W. (1980). Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical Biochemistry*, 106(1), 207–212. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(80\)90139-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(80)90139-6)

82. Gutierrez, E. M., Seebacher, N. A., Arzuman, L., Kovacevic, Z., Lane, D. J., Richardson, V., Merlot, A. M., Lok, H., Kalinowski, D. S., Sahni, S., Jansson, P. J., & Richardson, D. R. (2016). Lysosomal membrane stability plays a major role in the cytotoxic activity of the anti-proliferative agent, di-2-pyridylketone 4,4-dimethyl-3-thiosemicarbazone (Dp44mT). *Biochimica et biophysica acta*, 1863(7 Pt A), 1665–1681. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.04.017>

83. Haider, S. R., Reid, H. J., & Sharp, B. L. (2012). Tricine-SDS-PAGE. *Methods in Molecular Biology*, 869, 81–91. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-821-4_8

84. Hamaguchi, R., Haginaka, J., Tanimoto, T., & Kuroda, Y. (2014). Maintenance of luminal pH and protease activity in lysosomes/late endosomes by

vacuolar ATPase in chlorpromazine-treated RAW264 cells accumulating phospholipids. *Cell biology and toxicology*, 30(1), 67–77. <https://doi.org/10.1007/s10565-014-9269-2>

85. Hamer, D. H. (1986). Metallothionein. *Annual Review of Biochemistry*, 55(1), 913–951. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.55.070186.004405>

86. Haq, F., Mahoney, M., & Koropatnick, J. (2003). Signaling events for metallothionein induction. *Mutation Research*, 533(1–2), 211–226. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2003.07.014>

87. Hayase, N., Inagaki, S., & Abiko, Y. (1995). Effects of photodegradation products of nifedipine: the nitroso-derivative relaxes contractions of the rat aortic strip induced by norepinephrine and other agonists. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 275(2), 813–821.

88. Hübner, C., & Haase, H. (2021). Interactions of zinc- and redox-signaling pathways. *Redox Biology*, 41, 101916. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101916>

89. IPCC. (2014). *Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Geneva, IPCC.

90. Isani, G., & Carpenè, E. (2014). Metallothioneins, unconventional proteins from unconventional animals: a long journey from nematodes to mammals. *Biomolecules*, 4(2), 435–457. <https://doi.org/10.3390/biom4020435>

91. Iummato, M. M., Di Fiori, E., Sabatini, S. E., Cacciatore, L. C., Cochón, A. C., de Molina, M. del C. R., & Juárez, A. B. (2013). Evaluation of biochemical markers in the golden mussel *Limnoperna fortunei* exposed to glyphosate acid in outdoor microcosms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 95, 123–129. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.05.024>

92. Iummato, M. M., Sabatini, S. E., Cacciatore, L. C., Cochón, A. C., Cataldo, D., de Molina, M., & Juárez, Á. B. (2018). Biochemical responses of the golden mussel *Limnoperna fortunei* under dietary glyphosate exposure. *Ecotoxicology and environmental safety*, 163, 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.046>

93. Jiménez, J. J., Muñoz, B. E., Sánchez, M. I., Pardo, R., & Vega, M. S.

(2016). Fate of the drug chlorpromazine in river water according to laboratory assays. Identification and evolution over time of degradation products. Sorption to sediment. *Chemosphere*, 162, 285–292. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.07.107>

94. Kägi, J. H. (1991). Overview of metallothionein. *Methods in Enzymology*, 205, 613–626. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)05145-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)05145-1)

95. Kägi, J. H., & Schäffer, A. (1988). Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry*, 27(23), 8509–8515. <https://doi.org/10.1021/bi00423a001>

96. Kang, Y. J. (2006). Metallothionein redox cycle and function. *Experimental Biology and Medicine*, 231(9), 1459–1467. <https://doi.org/10.1177/153537020623100903>

97. Karaman, Y., & Menek, N. (2012). Investigation of Electrochemical Behavior of 2-(5-Bromo-2-Pyridylazo)-5-[N-Propyl-N-(3-Sulfopropyl)Amino]Phenol Disodium Salt Dihydrate. *Journal of The Electrochemical Society*, 159, H805–H810. <https://doi.org/10.1149/2.031210jes>

98. Khoma, V. V. (2019). The content of metals in metallothioneins of the bivalve mollusk *Unio tumidus* depending on different in situ and *in vitro* exposures. *Biol. Stud.*, 13(1), 61–70.

99. Khoma, V. V., Gnatyshyna, L. L., Martyniuk, V. V., Mackiv, T. R., Mishchuk, N. Y., & Stoliar, O. B. (2020a). Metallothioneins contribution to the response of bivalve mollusk to xenobiotics. *Ukrainian Biochemical Journal*, 92(5), 87–96. <https://doi.org/10.15407/ubj92.05.087>

100. Khoma, V., Gnatyshyna, L., Martinyuk, V., Mackiv, T., Yunko, K., Formanchuk, R., Baranovskii, V., Gladyuk, M., Manusadžianas, L., & Stoliar, O. (2020c). Combine exposures to low roundup concentration induces thiolome response in the digestive gland of bivalve mollusk. Scientific Issue Ternopil Volodymyr Hnatiuk National Pedagogical University. Series: *Biology*, 80(3–4), 72–78. <https://doi.org/10.25128/2078-2357.20.3-4.9>

101. Khoma, V., Martinyuk, V., Mackiv, T., Gnatyshyna, L., Sprinĝe, G., & Stoliar, O. (2020b). The effect of Rundup on the bivalve *Unio tumidus* mollusk utilizing *ex vivo* approach. *Studia Biologica*, 14(1), 41–50.

<http://dx.doi.org/10.30970/sbi.1401.614>

102. Khoma, V., Martinyuk, V., Matskiv, T., Gnatyshyna, L., Baranovsky, V., Gladiuk, M., Gylytė, B., Manusadžianas, L., & Stoliar, O. (2022a). Environmental concentrations of Roundup in combination with chlorpromazine or heating causes biochemical disturbances in the bivalve mollusc *Unio tumidus*. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(10), 14131–14142. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-16775-1>

103. Khoma, V., Martinyuk, V., Matskiv, T., Yunko, K., Gnatyshyna, L., & Stoliar, O. (2022b). Does roundup affect zinc functions in a bivalve mollusk in *ex vivo* exposure? *Ecotoxicology*, 31(2), 335–340. <https://doi.org/10.1007/s10646-021-02512-4>

104. Khoma, Vira, Gnatyshyna, L., Martinyuk, V., Mackiv, T., Mishchenko, L., Manusadžianas, L., & Stoliar, O. (2021). Common and particular biochemical responses of *Unio tumidus* to herbicide, pharmaceuticals and their combined exposure with heating. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, 111695. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111695>

105. Klaassen, C. D., Liu, J., & Choudhuri, S. (1999). Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 39, 267–294. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.39.1.267>

106. Kojima, Y., Berger, C., Vallee, B. L., & Kägi, J. H. (1976). Amino-acid sequence of equine renal metallothionein-1B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(10), 3413–3417. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.10.3413>

107. Kostić, J., Kolarević, S., Kračun-Kolarević, M., Aborgiba, M., Gačić, Z., Paunović, M., Višnjić-Jeftić, Ž., Rašković, B., Poleksić, V., Lenhardt, M., & Vuković-Gačić, B. (2017). The impact of multiple stressors on the biomarkers response in gills and liver of freshwater breams during different seasons. *Science of The Total Environment*, 601–602, 1670–1681. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.273>

108. Krężel, A., & Maret, W. (2007). Different redox states of metallothionein/thionein in biological tissue. *The Biochemical Journal*, *402*(3), 551–558. <https://doi.org/10.1042/BJ20061044>
109. Krężel, A., & Maret, W. (2016). The biological inorganic chemistry of zinc ions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *611*, 3–19. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.04.010>
110. Krężel, A., & Maret, W. (2017). The functions of metamorphic metallothioneins in zinc and copper metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(6). <https://doi.org/10.3390/ijms18061237>
111. Krężel, A., & Maret, W. (2021). The bioinorganic chemistry of mammalian metallothioneins. *Chemical Reviews*, *121*(23), 14594–14648. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00371>
112. Kukic, I., Kelleher, S. L., & Kiselyov, K. (2014). Zn²⁺ efflux through lysosomal exocytosis prevents Zn²⁺-induced toxicity. *Journal of cell science*, *127*(Pt 14), 3094–3103. <https://doi.org/10.1242/jcs.145318>
113. Lavryshyn, Y. Y., Varkholyak, I. S., Martyschuk, T. V., Guta, Z. A., & Ivankiv, L. B. (2016). The biological significance of the antioxidant defense system of animals body. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnology*, *18*(2(66)), 100–112. <https://doi.org/10.15421/nvlvet6622>
114. Le, T. T. Y., Zimmermann, S., & Sures, B. (2016). How does the metallothionein induction in bivalves meet the criteria for biomarkers of metal exposure? *Environmental Pollution*, *212*, 257–268. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.01.070>
115. Lee S. R. (2018). Critical Role of Zinc as Either an Antioxidant or a Prooxidant in Cellular Systems. *Oxidative medicine and cellular longevity*, *2018*, 9156285. <https://doi.org/10.1155/2018/9156285>
116. Li, T., Zhou, Q., Zhang, N., & Luo, Y. (2008). Toxic effects of chlorpromazine on *Carassius auratus* and its oxidative stress. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, *43*(8), 638–643. <https://doi.org/10.1080/03601230802352674>

117. Li, X.-T., Li, X.-Q., Hu, X.-M., & Qiu, X.-Y. (2015). The inhibitory effects of Ca²⁺ channel blocker nifedipine on rat Kv2.1 potassium channels. *PloS One*, *10*(4), e0124602. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124602>
118. Li-Juan, J., Wolfgang, M., & L., V. B. (1998). The glutathione redox couple modulates zinc transfer from metallothionein to zinc-depleted sorbitol dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(7), 3483–3488. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.7.3483>
119. Lionetto, M. G., Caricato, R., & Giordano, M. E. (2021). Pollution Biomarkers in the Framework of Marine Biodiversity Conservation: State of Art and Perspectives. *Water*, *13*(13), 1847. <https://doi.org/10.3390/w13131847>
120. Liu, S.-X., Fabisiak, J. P., Tyurin, V. A., Borisenko, G. G., Pitt, B. R., Lazo, J. S., & Kagan, V. E. (2000). Reconstitution of apo-superoxide dismutase by nitric oxide-induced copper transfer from metallothioneins. *Chemical Research in Toxicology*, *13*(9), 922–931. <https://doi.org/10.1021/tx0000623>
121. Liu, X., & Wang, W.-X. (2016). Antioxidant and detoxification responses of oysters *Crassostrea hongkongensis* in a multimetal-contaminated estuary. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *35*(11), 2798–2805. <https://doi.org/10.1002/etc.3455>
122. Liu, Y., Wu, H., Kou, L., Liu, X., Zhang, J., Guo, Y., & Ma, E. (2014). Two metallothionein genes in *Oxya chinensis*: molecular characteristics, expression patterns and roles in heavy metal stress. *PloS One*, *9*(11), e112759. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112759>
123. Liu, Yang, Wang, L., Pan, B., Wang, C., Bao, S., & Nie, X. (2017). Toxic effects of diclofenac on life history parameters and the expression of detoxification-related genes in *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*, *183*, 104–113. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.12.020>
124. López-Serna, R., Jurado, A., Vázquez-Suñé, E., Carrera, J., Petrović, M., & Barceló, D. (2013). Occurrence of 95 pharmaceuticals and transformation products in urban groundwaters underlying the metropolis of Barcelona, Spain. *Environmental Pollution*, *174*, 305–315. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.11.022>

125. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, *193*(1), 265–275.

126. Ludwiczek, S., Theurl, I., Muckenthaler, M. U., Jakab, M., Mair, S. M., Theurl, M., Kiss, J., Paulmichl, M., Hentze, M. W., Ritter, M., & Weiss, G. (2007). Ca²⁺ channel blockers reverse iron overload by a new mechanism via divalent metal transporter-1. *Nature Medicine*, *13*(4), 448–454. <https://doi.org/10.1038/nm1542>

127. Lushchak, O. V., Kubrak, O. I., Storey, J. M., Storey, K. B., & Lushchak, V. I. (2009). Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere*, *76*(7), 932–937. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.04.045>

128. Lynes, M. A., Zaffuto, K., Unfricht, D. W., Marusov, G., Samson, J. S., & Yin, X. (2006). The physiological roles of extracellular metallothionein. *Experimental Biology and Medicine*, *231*(9), 1548–1554. <https://doi.org/10.1177/153537020623100915>

129. Mak, I. T., Boehme, P., & Weglicki, W. B. (1992). Antioxidant effects of calcium channel blockers against free radical injury in endothelial cells. Correlation of protection with preservation of glutathione levels. *Circulation research*, *70*(6), 1099–1103. <https://doi.org/10.1161/01.res.70.6.1099>

130. Mao, N., Huang, L., & Shuai, Q. (2019). Facile synthesis of porous carbon for the removal of diclofenac sodium from water. *ACS Omega*, *4*(12), 15051–15060. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b01838>

131. Maret, W. (2004). Zinc and Sulfur: A Critical Biological Partnership. *Biochemistry*, *43*(12), 3301–3309. <https://doi.org/10.1021/bi036340p>

132. Maret, W. (2017). Zinc in cellular regulation: The nature and significance of “zinc signals.” *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(11), 2285. <https://doi.org/10.3390/ijms18112285>

133. Maret, W., Jacob, C., Vallee, B. L., & Fischer, E. H. (1999). Inhibitory sites in enzymes: Zinc removal and reactivation by thionein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*(5), 1936–1940.

<https://doi.org/10.1073/pnas.96.5.1936>

134. Margoshes, M., & Vallee, B. L. (1957). A cadmium protein from equine kidney cortex. *Journal of the American Chemical Society*, 79(17), 4813–4814. <https://doi.org/10.1021/ja01574a064>

135. Matias, A. C., Manieri, T. M., & Cerchiaro, G. (2016). Zinc Chelation Mediates the Lysosomal Disruption without Intracellular ROS Generation. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016, 6724585. <https://doi.org/10.1155/2016/6724585>

136. Matozzo, V., Fabrello, J., & Marin, M. G. (2020). The effects of glyphosate and its commercial formulations to marine invertebrates: a review. *Journal of Marine Science and Engineering*, 8(6), 399. <http://dx.doi.org/10.3390/jmse8060399>

137. Matozzo, V., Fabrello, J., Masiero, L., Ferraccioli, F., Finos, L., Pastore, P., Di Gangi, I. M., & Bogialli, S. (2018). Ecotoxicological risk assessment for the herbicide glyphosate to non-target aquatic species: A case study with the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environmental Pollution*, 233, 623–632. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.10.100>

138. Matozzo, V., Munari, M., Masiero, L., Finos, L., & Marin, M. G. (2019). Ecotoxicological hazard of a mixture of glyphosate and aminomethylphosphonic acid to the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck 1819). *Scientific Reports*, 9(1), 14302. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50607-0>

139. McCord, M. C., & Aizenman, E. (2014). The role of intracellular zinc release in aging, oxidative stress, and Alzheimer's disease. *Frontiers in aging neuroscience*, 6, 77. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00077>

140. Mertens, M. (2018). Glyphosate , a chelating agent — relevant for ecological risk assessment? *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 5298–5317. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-1080-1>

141. Migliaccio, V., Lionetti, L., Putti, R., & Scudiero, R. (2020). Exposure to dichlorodiphenyldichloroethylene (dde) and metallothionein levels in rats fed with normocaloric or high-fat diet: a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5), 1903. <https://doi.org/10.3390/ijms21051903>

142. Milano, M., & Chèvre, N. (2019). How water quality standards for pesticides affect the classification of the chemical status of rivers. *WIREs Water*, 6(6), e1375. <https://doi.org/10.1002/wat2.1375>

143. Miller, T. H., Bury, N. R., Owen, S. F., MacRae, J. I., & Barron, L. P. (2018). A review of the pharmaceutical exposome in aquatic fauna. *Environmental Pollution*, 239, 129–146. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.04.012>

144. Mortz, E., Krogh, T. N., Vorum, H., & Görg, A. (2001). Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. *Proteomics*, 1(11), 1359–1363. [https://doi.org/10.1002/1615-9861\(200111\)1:11<1359::AID-PROT1359>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/1615-9861(200111)1:11<1359::AID-PROT1359>3.0.CO;2-Q)

145. Mottier, A., Serpentine, A., Dallas, L., James, A., Lebel, J.-M., & Costil, K. (2020). *In vitro* effects of glyphosate-based herbicides and related adjuvants on primary culture of hemocytes from *Haliotis tuberculata*. *Fish & Shellfish Immunology*, 100, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.02.058>

146. Mukai, S. T., Kiehn, L., & Saleuddin, A. S. (2004). Dopamine stimulates snail albumen gland glycoprotein secretion through the activation of a D1-like receptor. *The Journal of experimental biology*, 207(Pt 14), 2507–2518. <https://doi.org/10.1242/jeb.01052>

147. Müller, M., De Weille, J. R., & Lazdunski, M. (1991). Chlorpromazine and related phenothiazines inhibit the ATP-sensitive K⁺ channel. *European Journal of Pharmacology*, 198(1), 101–104. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(91\)90569-c](https://doi.org/10.1016/0014-2999(91)90569-c)

148. Murata, M., Gong, P., Suzuki, K., & Koizumi, S. (1999). Differential metal response and regulation of human heavy metal-inducible genes. *Journal of Cellular Physiology*, 180(1), 105–113. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(199907\)180:1<105::AID-JCP12>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(199907)180:1<105::AID-JCP12>3.0.CO;2-5)

149. Nam, Y. K., & Kim, E. J. (2017). Diversification and domain evolution of molluscan metallothioneins: a mini review. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 20(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s41240-017-0054-z>

150. Nath, R., Kambadur, R., Gulati, S., Paliwal, V. K., & Sharma, M. (1988). Molecular aspects, physiological function, and clinical significance of

metallothioneins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 27(1), 41–85.
<https://doi.org/10.1080/10408398809527477>

151. Nielson, K., & Winge, D. (1985). Independence of the domains of metallothionein in metal binding. *The Journal of Biological Chemistry*, 260, 8698–8701. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)39405-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)39405-X)

152. OECD. (2019). *Pharmaceutical Residues in Freshwater*. Paris: OECD Publishing. <https://doi.org/10.1787/c936f42d-en>.

153. Ogata, N., Yoshii, M., & Narahashi, T. (1990). Differential block of sodium and calcium channels by chlorpromazine in mouse neuroblastoma cells. *The Journal of Physiology*, 420, 165–183. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1990.sp017906>

154. Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95(2), 351–358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)

155. Okamatsu, S., & Lefer, A. M. (1983). The protective effects of nifedipine in the isolated cat heart. *The Journal of surgical research*, 35(1), 35–40. [https://doi.org/10.1016/0022-4804\(83\)90123-3](https://doi.org/10.1016/0022-4804(83)90123-3)

156. Oliveira, L. L. D., Antunes, S. C., Gonçalves, F., Rocha, O., & Nunes, B. (2015). Evaluation of ecotoxicological effects of drugs on *Daphnia magna* using different enzymatic biomarkers. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 119, 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.04.028>

157. Otsuka, F. (2021). Transcription factor MTF-1 involved in the cellular response to zinc. *Yakugaku zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 141(6), 857–867. <https://doi.org/10.1248/yakushi.20-00247>

158. Pavić, M., Turčić, P., & Ljubojević, M. (2019). Forgotten partners and function regulators of inducible metallothioneins. *Arhiv Za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 70(4), 256–264. <https://doi.org/10.2478/aiht-2019-70-3317>

159. Pérez, G. L., Vera, M. S., Miranda, L. (2011). Effects of herbicide glyphosate and glyphosate-based formulations on aquatic ecosystems. In A. Kortekamp (Ed.) *Herbicides and Environment* (pp.343-368), London: IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/12877>

160. Peroza, E. A., dos Santos Cabral, A., Wan, X., & Freisinger, E. (2013). Metal ion release from metallothioneins: proteolysis as an alternative to oxidation. *Metallomics: Integrated Biometal Science*, 5(9), 1204–1214. <https://doi.org/10.1039/c3mt00079f>

161. Petering, D. H., & Mahim, A. (2017). Proteomic high affinity Zn(2+) trafficking: where does metallothionein fit in? *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1289. <https://doi.org/10.3390/ijms18061289>

162. Qu, W., Pi, J., & Waalkes, M. P. (2013). Metallothionein blocks oxidative DNA damage *in vitro*. *Archives of Toxicology*, 87(2), 311–321. <https://doi.org/10.1007/s00204-012-0927-y>

163. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)

164. Refat, M., Mohamed, G., Ibrahim, M., Killa, H., & Fetooh, H. (2013). Synthesis and characterization of coordination behavior of diclofenac sodium drug toward hg(ii), pb(ii), and sn(ii) metal ions: chelation effect on their thermal stability and biological activity. *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry*, 44, 161–170. <https://doi.org/10.1080/15533174.2012.752009>

165. Rehberger, K., Kropf, C., & Segner, H. (2018). *In vitro* or not *in vitro*: a short journey through a long history. *Environmental sciences Europe*, 30(1), 23. <https://doi.org/10.1186/s12302-018-0151-3>

166. Reichert, J. F., Souza, D. M., & Martins, A. F. (2019). Antipsychotic drugs in hospital wastewater and a preliminary risk assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 170, 559–567. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.12.021>

167. Reznick, A. Z., & Packer, L. (1994). Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods in Enzymology*, 233, 357–363. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(94\)33041-7](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(94)33041-7)

168. Rios, C., Santander, I., Méndez-Armenta, M., Nava-Ruiz, C., Orozco-Suárez, S., Islas, M., Barón-Flores, V., & Diaz-Ruiz, A. (2018). Metallothionein-

I+II Reduces Oxidative Damage and Apoptosis after Traumatic Spinal Cord Injury in Rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 3265918. <https://doi.org/10.1155/2018/3265918>

169. Robbins, A. H., McRee, D. E., Williamson, M., Collett, S. A., Xuong, N. H., Furey, W. F., Wang, B. C., & Stout, C. D. (1991). Refined crystal structure of Cd, Zn metallothionein at 2.0 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 221(4), 1269–1293.

170. Roesijadi, G., & Fowler, B. A. (1991). Purification of invertebrate metallothioneins. *Methods in Enzymology*, 205, 263–273. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)05106-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)05106-6)

171. Roesijadi, G., Hansen, K. M., & Unger, M. E. (1996). Cadmium-induced metallothionein expression during embryonic and early larval development of the mollusc *Crassostrea virginica*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 140(2), 356–363. <https://doi.org/10.1006/taap.1996.0231>

172. Romero-Isart, N., & Vasák, M. (2002). Advances in the structure and chemistry of metallothioneins. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 88(3–4), 388–396. [https://doi.org/10.1016/s0162-0134\(01\)00347-6](https://doi.org/10.1016/s0162-0134(01)00347-6)

173. Sakatoku, A., Ishikawa, M., Yamazaki, K., Nakamachi, T., Kamachi, H., Tanaka, D., & Nakamura, S. (2020). Molecular identification, characterization, and expression analysis of a metallothionein gene from *Septifer virgatus*. *Marine Biotechnology*, 22(4), 488–497. <https://doi.org/10.1007/s10126-020-09970-7>

174. Samanta, P., Pal, S., Mukherjee, A. K., & Ghosh, A. R. (2014). Biochemical effects of glyphosate based herbicide, Excel Mera 71 on enzyme activities of acetylcholinesterase (AChE), lipid peroxidation (LPO), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) and protein content on teleostean fishes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 107, 120–125. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.05.025>

175. Sato, M., & Bremner, I. (1993). Oxygen free radicals and metallothionein. *Free radical biology & medicine*, 14(3), 325–337. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(93\)90029-t](https://doi.org/10.1016/0891-5849(93)90029-t)

176. Saydam, N., Adams, T. K., Steiner, F., Schaffner, W., & Freedman, J. H. (2002). Regulation of metallothionein transcription by the metal-responsive transcription factor MTF-1: identification of signal transduction cascades that control metal-inducible transcription. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(23), 20438–20445. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110631200>

177. Scheller, J. S., Irvine, G. W., & Stillman, M. J. (2018). Unravelling the mechanistic details of metal binding to mammalian metallothioneins from stoichiometric, kinetic, and binding affinity data. *Dalton transactions*, *47*(11), 3613–3637. <https://doi.org/10.1039/C7DT03319B>

178. Schmidt, W., Rainville, L.-C., Mceneff, G., Sheehan, D., & Quinn, B. (2014). A proteomic evaluation of the effects of the pharmaceuticals diclofenac and gemfibrozil on marine mussels (*Mytilus* spp.): Evidence for chronic sublethal effects on stress-response proteins. *Drug Testing and Analysis*, *6*, 210-219. <https://doi.org/10.1002/dta.1463>

179. Schulze, T., Weiss, S., Schymanski, E., von der Ohe, P. C., Schmitt-Jansen, M., Altenburger, R., Streck, G., & Brack, W. (2010). Identification of a phytotoxic photo-transformation product of diclofenac using effect-directed analysis. *Environmental Pollution*, *158*(5), 1461–1466. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.12.032>

180. Scudiero, R., Cretì, P., Trinchella, F., & Grazia Esposito, M. (2014). Evaluation of cadmium, lead and metallothionein contents in the tissues of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Campania coast (Italy): Levels and seasonal trends. *Comptes Rendus Biologies*, *337*(7), 451–458. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2014.05.003>

181. Sea temperature. Найбільш точні та повні дані про температуру морів та океанів в Інтернеті. <https://ukr.seatemperature.net/seas-and-rivers/reka-dnestr>.

182. Sensi, S. L., Canzoniero, L. M., Yu, S. P., Ying, H. S., Koh, J. Y., Kerchner, G. A., & Choi, D. W. (1997). Measurement of intracellular free zinc in living cortical neurons: routes of entry. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *17*(24), 9554–9564.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-24-09554.1997>

183. Shaltami, O., Hamed, N., Fares, F., Errishi, H., El Oshebi, F., & Maceda, E. (2020). Water pollution – A review. In *Virtual Conference on Environment and Health* (pp. 55–62). Agricultural University of Iceland.

184. Sharma, P., Reddy, P. K., & Kumar, B. (2021). Trace Element Zinc, a Nature’s Gift to Fight Unprecedented Global Pandemic COVID-19. *Biological Trace Element Research*, 199(9), 3213–3221. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02462-8>

185. Sonier, M. B., & Weger, H. G. (2010). Plasma membrane ferric reductase activity of iron-limited algal cells is inhibited by ferric chelators. *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine*, 23(6), 1029–1042. <https://doi.org/10.1007/s10534-010-9348-7>

186. Stoliar, O., & Stoika, R. (2022). Metallothioneins’ responses on impact of metal-based nanomaterials for biomedical use. In Stoika, R. (Ed.) *Biomedical Nanomaterials* (pp. 265–303). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-76235-3_10

187. Sutherland, D. E. K., & Stillman, M. J. (2011). The “magic numbers” of metallothionein. *Metallomics*, 3(5), 444–463. <https://doi.org/10.1039/c0mt00102c>

188. Sutherland, D. E. K., Summers, K. L., & Stillman, M. J. (2012). Noncooperative metalation of metallothionein 1a and its isolated domains with zinc. *Biochemistry*, 51(33), 6690–6700. <https://doi.org/10.1021/bi3004523>

189. Suzuki, K. T., Itoh, N., Ohta, K., & Sunaga, H. (1986). Amphibian metallothionein. Induction in the frogs *Rana japonica*, *R. nigromaculata* and *Rhacophorus schlegelii*. *Comparative Biochemistry and Physiology. C, Comparative Pharmacology and Toxicology*, 83(2), 253–259. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(86\)90119-2](https://doi.org/10.1016/0742-8413(86)90119-2)

190. Tang, J., Hu, P., Li, Y., Win-Shwe, T.-T., & Li, C. (2017). Ion Imbalance Is Involved in the Mechanisms of Liver Oxidative Damage in Rats Exposed to Glyphosate. *Frontiers in Physiology*, 8, 1083. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.01083>

191. Thambiayya, K., Kaynar, A. M., St Croix, C. M., & Pitt, B. R. (2012).

Functional role of intracellular labile zinc in pulmonary endothelium. *Pulmonary circulation*, 2(4), 443–451. <https://doi.org/10.4103/2045-8932.105032>

192. Tresnakova, N., Stara, A., & Velisek, J. (2021). Effects of glyphosate and its metabolite AMPA on aquatic organisms. *Applied Sciences*, 11(19), 9004. <https://doi.org/10.3390/app11199004>

193. Trombini, C., Blasco, J., & Hampel, M. (2020). Ibuprofen and diclofenac: effects on freshwater and marine aquatic organisms – are they at risk?. In L.M.Gómez-Oliván (Eds.) *The Handbook of Environmental Chemistry*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/698_2020_548

194. Truong-Tran, A. Q., Carter, J., Ruffin, R. E., & Zalewski, P. D. (2001). The role of zinc in caspase activation and apoptotic cell death. *Biometals*, 14(3), 315–330. <https://doi.org/10.1023/A:1012993017026>

195. Tsui, M. T. K., Wang, W.-X., & Chu, L. M. (2005). Influence of glyphosate and its formulation (Roundup) on the toxicity and bioavailability of metals to *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Pollution*, 138(1), 59–68. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.02.018>

196. Tsui, M., & Chu, L. M. (2008). Environmental fate and non-target impact of glyphosate-based herbicide (Roundup®) in a subtropical wetland. *Chemosphere*, 71, 439–446. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.10.059>

197. UNESCO. (2017). *The United Nations world water development report, 2017: Wastewater: the untapped resource*. Paris: United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization. https://unesdoc.unesco.org/notice?id=p::usmarcdef_0000247153

198. Uren Webster, T. M., & Santos, E. M. (2015). Global transcriptomic profiling demonstrates induction of oxidative stress and of compensatory cellular stress responses in brown trout exposed to glyphosate and Roundup. *BMC Genomics*, 16(1), 32. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1254-5>

199. Van Lookeren Campagne, M., Thibodeaux, H., van Bruggen, N., Cairns, B., & Lowe, D. G. (2000). Increased binding activity at an antioxidant-responsive element in the metallothionein-1 promoter and rapid induction of metallothionein-1

and -2 in response to cerebral ischemia and reperfusion. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(14), 5200–5207. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-14-05200.2000>

200. Vašák, M., & Meloni, G. (2011). Chemistry and biology of mammalian metallothioneins. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 16(7), 1067–1078. <https://doi.org/10.1007/s00775-011-0799-2>

201. Vehovszky, Á., Farkas, A., Csikós, V., Székács, A., Mörtl, M., & Gyóri, J. (2018). Neonicotinoid insecticides are potential substrates of the multixenobiotic resistance (MXR) mechanism in the non-target invertebrate, *Dreissena* sp. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 205, 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.10.013>

202. Viarengo A., Burlando B, Dondero F., Marro A., F. R. (1999). Metallothionein as a tool in biomonitoring programmes. *Biomarkers*, 4(6), 455–466. <https://doi.org/10.1080/135475099230615>

203. Viarengo, A., & Nott, J. A. (1993). Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 104(3), 355–372. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(93\)90001-2](https://doi.org/10.1016/0742-8413(93)90001-2)

204. Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Poli, G., Moore, M. N., & Orunesu, M. (1990). Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *mytilus gallopro vincialis* lam. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 97(1), 37–42. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(90\)90168-9](https://doi.org/10.1016/0742-8413(90)90168-9)

205. Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., & Koehler, A. (2007). The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146(3), 281–300. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.04.011>

206. Vignesh, K. S., & Deepe Jr., G. S. (2017). Metallothioneins: Emerging Modulators in Immunity and Infection. *International Journal of Molecular Sciences*,

18(10). <https://doi.org/10.3390/ijms18102197>

207. Wagner, F. (2021). Overview chapter on ecology and biology. In *JDS4 Scientific Report: A Shared Analysis of the Danube River* (pp. 171–182). ICPDR – International Commission for the Protection of the Danube River. www.danubesurvey.org/jds4/full-report

208. Walker, C. J., Gelsleichter, J., Adams, D. H., & Manire, C. A. (2014). Evaluation of the use of metallothionein as a biomarker for detecting physiological responses to mercury exposure in the bonnethead, *Sphyrna tiburo*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 40(5), 1361–1371. <https://doi.org/10.1007/s10695-014-9930-y>

209. Wang, C., Lin, X., Li, L., Lin, L., & Lin, S. (2017). Glyphosate shapes a dinoflagellate-associated bacterial community while supporting algal growth as sole phosphorus source. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2530. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02530>

210. Wang, J., Niu, Y., Zhang, C., & Chen, Y. (2018). A micro-plate colorimetric assay for rapid determination of trace zinc in animal feed, pet food and drinking water by ion masking and statistical partitioning correction. *Food Chemistry*, 245, 337–345. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.054>

211. Wang, W.-C., Mao, H., Ma, D.-D., & Yang, W.-X. (2014). Characteristics, functions, and applications of metallothionein in aquatic vertebrates. *Frontiers in Marine Science*, 1, 34. <https://doi.org/10.3389/fmars.2014.00034>

212. Warner, R. F. (2012). Environmental impacts of hydroelectric power and other anthropogenic developments on the hydromorphology and ecology of the Durance channel and the Etang de Berre, southeast France. *Journal of Environmental Management*, 104, 35–50. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.03.011>

213. Whalley, C., Agency, E. E., & Mohaupt, V. (2018). *Chemicals in European Waters: Knowledge Developments*. Copenhagen: Publications Office of the European Union.

214. WHO. (2017). *WHO model list of essential medicines, 20th list*. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/273826>

215. Wilhelmsen, T. W., Olsvik, P. A., Hansen, B. H., & Andersen, R. A.

(2002). Evidence for oligomerization of metallothioneins in their functional state. *Journal of Chromatography. A*, 979(1–2), 249–254. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(02\)01259-1](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(02)01259-1)

216. Wooltorton, J. R., & Mathie, A. (1993). Block of potassium currents in rat isolated sympathetic neurones by tricyclic antidepressants and structurally related compounds. *British Journal of Pharmacology*, 110(3), 1126–1132. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1993.tb13931.x>

217. Xu, B., Xu, Z. F., Deng, Y., & Yang, J. H. (2010). Protective effects of Chlorpromazine and Verapamil against cadmium-induced kidney damage *in vivo*. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie*, 62(1), 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2008.12.009>

218. Yamasaki, S., Sakata-Sogawa, K., Hasegawa, A., Suzuki, T., Kabu, K., Sato, E., Kurosaki, T., Yamashita, S., Tokunaga, M., Nishida, K., & Hirano, T. (2007). Zinc is a novel intracellular second messenger. *The Journal of Cell Biology*, 177(4), 637–645. <https://doi.org/10.1083/jcb.200702081>

219. Yang, H., Keen, C. L., & Lanoue, L. (2015). Influence of Intracellular Zinc on Cultures of Rat Cardiac Neural Crest Cells. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 104(1), 11–22. <https://doi.org/10.1002/bdrb.21135>

220. Yao, S., Flight, R. M., Rouchka, E. C., & Moseley, H. N. B. (2015). A less-biased analysis of metalloproteins reveals novel zinc coordination geometries. *Proteins*, 83(8), 1470–1487. <https://doi.org/10.1002/prot.24834>

221. Yiwen, W., Xiaohan, T., Chunfeng, Z., Xiaoyu, Y., Yaodong, M., & Huanhuan, Q. (2022). Genetics of metallothioneins in *Drosophila melanogaster*. *Chemosphere*, 288, 132562. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132562>

222. Yu, S.-S., Jiang, L.-R., Ling, Y., Qian, Z.-M., Zhou, Y.-F., Li, J., & Ke, Y. (2017). Nifedipine increases iron content in WKPT-0293 Cl.2 Cells via up-regulating iron influx proteins. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 60. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00060>

223. Yuchi, A., Tanaka, A., Hirai, M., Yasui, T., Wada, H., & Nakagawa, G.

(1993). Complexation Equilibria and Fluorescent Properties of Chelating Reagents Derived from Ethylene Glycol Bis(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic Acid. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 66(11), 3377–3381. <https://doi.org/10.1246/bcsj.66.3377>

224. Zalewska, M., Trefon, J., & Milnerowicz, H. (2014). The role of metallothionein interactions with other proteins. *Proteomics*, 14(11), 1343–1356. <https://doi.org/10.1002/pmic.201300496>

225. Zhou, C.-F., Wang, Y.-J., Li, C.-C., Sun, R.-J., Yu, Y.-C., & Zhou, D.-M. (2013). Subacute toxicity of copper and glyphosate and their interaction to earthworm (*Eisenia fetida*). *Environmental Pollution*, 180C, 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.05.016>

226. Ziller, A., & Fraissinet-Tachet, L. (2018). Metallothionein diversity and distribution in the tree of life: a multifunctional protein. *Metallomics: Integrated Biometal Science*, 10(11), 1549–1559. <https://doi.org/10.1039/c8mt00165k>

227. Аблятіпова, А. М., Беруашвілі, Т. Г., Губіна, К. Е. (2018). ІЧ спектрометричне та термогравіметричне дослідження комплексів купруму, кобальту та цинку на основі гліфосату. Вісник Київського Національного Університету Імені Тараса Шевченка. *Хімія*, 1(55), 31–35. [https://doi.org/10.17721/1728-2209.2018.1\(55\).7](https://doi.org/10.17721/1728-2209.2018.1(55).7)

228. Столяр, О. Б., Фальфушинська, Г. І., Гнатишина, Л. Л., Юкало, В. Г. (2016) *Молекулярні реакції водних тварин на вплив пошкоджувальних чинників середовища*. Тернопіль: ТНТУ ім. Івана Пулюя.