

## АНОТАЦІЯ

Хома В. В. Властивості металотіонеїнів двостулкового молюска 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 молюска *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 молюски 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 використанням 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 індукцйбельні тіоли володіють антиоксидантним потенціалом.

Гербицид 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 °С та спільно при 18 °С (Mix) та 25 °С (MixT), а також Раундапу (Rn, 16,9 мкг/л, що відповідає ~40 нМ гліфосату) при температурах 18 °С та при 25 °С (RnT), хлорпромазину (Cpz, 18,0 мкг/л) та суміші Раундапу і хлорпромазину при 18 °С (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 °С 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, ZnCl<sub>2</sub>, 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 MTSN, збільшуючи каспазу-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  $\mu\text{g}$  / l, corresponding to  $\sim 80$  nM glyphosate) separately at 18 ° C and jointly at 18 ° C (Mix) and 25 ° C (MixT), as well as Roundup (Rn, 16.9  $\mu\text{g}$  / l, corresponding to  $\sim 40$  nM glyphosate) at 18 ° C and 25 ° C), chlorpromazine (Cpz, 18.0  $\mu\text{g}$  / 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, ZnCl<sub>2</sub>, TPEN and combinations of ZnTPEN or ZnRn at a concentration of 3  $\mu\text{M}$ .

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., 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. 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., Sprinġe, 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., Zacik, 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., Manusadžianas, 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.