

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

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

МАРТИНЮК ВІКТОРІЯ ВАЛЕНТИНІВНА

УДК : 502/504:57(477.81) 577.47: 504.054

ДИСЕРТАЦІЯ

Біохімічні механізми впливу мікропластику на організм
двостулкового молюска *Unio tumidus* поокремо та за
комбінованої 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

_____ Вікторія Мартинюк

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор **Оксана Столяр**

Тернопіль 2023

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	21
ВСТУП.....	22
РОЗДІЛ I ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	29
1.1. Вплив мікропластику на водні організми	29
1.2. Мікропластик як вектор для інших новітніх забруднювачів водойм.....	33
1.3. Біохімічні маркери двостулкових моллюсків... ..	42
РОЗДІЛ II МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	50
2.1 Відбір дослідних груп тварин та хімічний аналіз води.....	50
2.2. Аналіз акумуляції мікропластику в організмі моллюска	55
2.3. Виділення та визначення вмісту металотіонеїнів.....	56
2.4. Визначення вмісту металів у тканині та металотіонеїнах.....	57
2.5. Визначення концентрації глутатіону	58
2.6. Електрофорез термостабільних протеїнів.....	59
2.7. Оцінка активності ензимів антиоксидантного захисту	60
2.7.1. Активність супероксиддисмутази	60
2.7.2. Активність каталази	61
2.7.3. Визначення вмісту та співвідношення концентрацій нікотинамідних коензимів... ..	61
2.7.4. Утворення продуктів окисної деструкції ліпідів та протеїнів	62
2.8. Визначення активності протеаз	63
2.8.1. Визначення активності катепсину Д	63
2.8.2. Активність каспази-3	64
2.9. Визначення вмісту протеїнів	64
2.10. Статистичні методи оцінки експериментальних даних	64
РОЗДІЛ III РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	66
3.1 Накопичення мікропластику в організмі двостулкового моллюска за експериментальних та польових умов існування.....	66
3.2. Характеристика металотіонеїнів <i>U. tumidus</i> за впливу на організм мікропластику різного розміру та фармацевтичних препаратів.....	70

3.2.1. Реакція металотіонеїнів за впливу на організм мікропластику розміром 0,1-0,5 мм окремо та спільно з ібупрофеном	70
3.2.2. Реакція металотіонеїнів за впливу на організм мікропластику розміром 2 мкм окремо та у суміші з саліноміцином за двох температурних режимів.....	77
3.3 Дослідження реакції окисного/редуктивного стресу у травній залозі молюсків <i>U. tumidus</i> за впливу на організм мікропластику різного розміру та фармацевтичних препаратів	81
3.3.1 Вплив мікропластику розміром 0,1-0,5 мм окремо та спільно з ібупрофеном на стан системи антиоксидантного захисту у молюсків з двох популяцій.....	81
3.3.2. Вплив мікропластику розміром 2 мкм окремо та спільно з саліноміцином за двох температурних режимів на стан системи антиоксидантного захисту ...	86
3.4. Оцінка токсичності впливу на організм <i>U. tumidus</i> мікропластику та фармацевтичних препаратів окремо та у комбінаціях за ознаками апоптозу та лізосомальної функціональності	90
РОЗДІЛ IV АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	95
4.1. Спільні реакції стресу та цитотоксичності молюсків за експериментальних умов.....	96
4.2. Залежність біохімічних реакцій організму на вплив мікропластику залежно від його розмірів	101
4.3. Чи спостерігаються ознаки взаємодії між мікропластиком та фармацевтичними препаратами в організмі молюска?	103
4.3.1. Як впливають екологічні особливості – популяційні адаптації та тепловий чинник – на реакції молюсків за впливу ксенобіотиків ?	112
4.4 Обґрунтування мінімального набору біомаркерів екотоксичності мікропластику окремо та у комбінованій експозиції	116
ВИСНОВКИ	121
ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	123

АНОТАЦІЯ

Мартинюк В.В. Біохімічні механізми впливу мікропластику на організм двостулкового молюска *Unio tumidus* поокремо та за комбінованої 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, 2023.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню біохімічних реакцій прісноводного молюска перлівниці *Unio tumidus* (Philipson et al., 1788) на дію мікропластика водного середовища залежно від розміру частинок окремо та у поєднанні з іншими несприятливими чинниками хімічного та екологічного походження. У якості біохімічних мішеней впливу ксенобіотиків було обрано акумуляційну здатність організму щодо есенціального металу цинку за участю металотіонеїнів, реакції окисного/відновного стресу та активність ензимів апоптозу та аутофагії. У роботі використано методи препаративної біохімії спектрофотометрія, хроматографічний та електрофоретичний аналізи, світлова та люмінесцентна мікроскопія, гістологічні та морфометричні дослідження, статистичний аналіз.

Мета роботи зумовлена проблемою забруднення довкілля мікропластиком та його потенційної екотоксичності. Серед прогнозованих наслідків цього забруднення чільне місце займає здатність мікропластику сорбувати на своїй поверхні гідрофобні молекули та діяти як вектор, сприяючи контакту цих ксенобіотиків з організмом. Двостулкові молюски є загальновизнаними біоіндикаторами стану водойм, оскільки вони, завдяки фільтруючому способу харчування та осілому способу життя, акумулюють забруднювачі водного середовища та володіють механізмами реакції на стрес та токсичність середовища консервативними у тваринному світі. Разом з тим, двостулкові молюски здатні адаптуватись до умов існування у природному біотопі, та відповідно, демонструють залежні від популяції відмінності у резистентності до впливу пошкоджуючих чинників. Як ектотермні організми,

вони чутливо реагують на температурний режим існування. Щодо потенційної токсичності мікропластику для двостулкових моллюсків висновки суперечливі з огляду на високу фільтруючу активність організму, проте дослідження стосуються здебільшого гостротоксичної дії, а у поєднанні з перспективними щодо векторної взаємодії гідрофобними ксенобіотиками поодинокі. Тому метою роботи стало дослідження здатності *U. tumidus* акумулювати мікропластик водного середовища та пошук потенційних молекулярних мішеней, задіяних у біохімічну відповідь на його вплив окремо та у поєднанні з супутніми ксенобіотиками у субхронічній експозиції.

Відповідно у дисертаційному дослідженні в I-й експериментальній серії ми оцінювали акумулятивну здатність перлівниці з антропогенно навантаженої території (р. Нічлава, Ст-популяція) щодо мікропластику (MP) розміром частинок 0,1-0,5 мм (подрібнений побутовий поліетилентерефталат, згідно з новою класифікацією за розміром – мезопластик) у концентрації 1 мг/л протягом 14 діб. Біохімічні реакції організму на вплив MP окремо та у поєднанні досліджували у двох наступних експериментах. II серія – перлівницю *U. tumidus* з двох територій – референтної (р. Случ, Pr-популяція) та антропогенно навантаженої (р. Нічлава, Ст-популяція) - впродовж 14 днів піддавали впливу мезопластику концентрацією 1 мг/л (MP), ібупрофену (IBU, фармацевтичної якості, 8 мкг/л (3,9 нМ)) окремо та їх суміші (Mix). III серія - перлівницю з антропогенно навантаженої території (Ст-популяція) піддавали впливу MP (полістирол, Sigma Aldrich) розміром 2 мкм, концентрацією 1 мг/л, саліноміцину (Sal, концентрацією 6 мкг/л) окремо та у суміші за температурних режимів 18°C (Mix) та 25°C (MixT). Концентрації ксенобіотиків та розмір частинок MP відповідали їх характеристикам у природних водоймах, а температурний режим 25°C – встановленим показникам для прісних водойм у досліджуваній місцевості у літній час.

З'ясовано, що перлівниця володіє високою здатністю акумулювати MP із середовища з максимальною кількістю частинок у м'яких тканинах на 8-10 доби інкубації, що становить $\approx 320-330$ частинок з розрахунку на організм

порівняно з 9,5 частинками у контролі, та узгоджено зі зниженням його кількості у дослідному середовищі. Ці результати дозволяють стверджувати про доцільність використання перлівниці як індикаторного організму для оцінки вмісту МР у водному середовищі.

Серед біохімічних реакцій на вплив ксенобіотиків ми акцентували на здатності тканини травної залози депонувати есенціальний метал цинк за участю метал-депонувальних протеїнів металотіонеїнів. Металотіонеїни чутливо і селективно реагують на вплив не лише токсичних металів, але й на численні інші пошкоджуючі чинники хімічної та екологічної природи змінами як загального вмісту у тканині, так і ступенем металювання. Нами були виділені термостабільні протеїни, які за ознаками молекулярної маси ≈ 7 кДа, типових для метал-тіолатних кластерів, максимуму поглинання при 245-250 нм та поведінки при тричин SDS-PAGE електрофорезі ідентифіковані як металотіонеїни. За експериментальних умов не спостерігали ознак їх димеризації. Порівняння контрольних груп з двох популяцій виявило відмінність у 3,5 рази у концентрації загального протеїну металотіонеїну з вищим вмістом у Pr-молюсків. За впливу МР у St-молюсків проявлялась типова реакція зростання рівня металотіонеїну як стрес-реакційних протеїнів, тоді як у Pr-молюсків їх вміст зменшувався. Вплив ібупрофену та суміші в обох популяціях призводив до зменшення вмісту металотіонеїну на 34-57% порівняно з відповідним контролем. Разом з тим, вміст металюваної форми металотіонеїну залишався незмінним порівняно з відповідним контролем за всіх експозицій за виключенням збільшення у групі Pr-Mix. Відтак забезпечувався стабільний рівень депонування цинку у складі металотіонеїнів, не зважаючи на зміни його загального вмісту у тканині (збільшення у St-MP та Mix та Pr-IBU групах). Разом з тим, лише за впливу МР у St-популяції зростав вміст неметалюваної (апо-) форми металотіонеїну, що характеризується високою активністю тіолових груп.

Дослідження впливу МР розміром 2 мкм окремо та у комбінації з антибіотиком саліноміцином за двох температурних режимів на організм

моллюска виявило зростання загального вмісту металотіонеїну за впливу на організм МР і саліноміцину, тоді як у Міх-групі він не змінювався, а у групі МіхТ зменшувався. Вміст цинку у складі металотіонеїнів зростав у всіх експозиціях, найпомітніші зміни спостерігали у Міх- та МіхТ-групах (у 4,4 і 2,9 раза відповідно). При визначенні загального вмісту цинку у тканині травної залози спостерігали іншу залежність ніж у складі металотіонеїнів, а саме зниження його вмісту за впливу МР та МіхТ, та збільшення у групі Міх. Відтак, не зважаючи на нестабільність рівня загального вмісту цинку у тканині, і у цій серії спостерігалась здатність металотіонеїнів забезпечувати певний резерв цинку, особливо у групах МР (21% загального вмісту цинку у тканині порівняно з 11% у контролі) та МіхТ. У цій дослідній серії було виявлено, що всі експериментальні умови викликають збільшення у три-п'ять разів вміст купруму у тканині. Відповідно, у всіх експериментальних групах зменшувалось співвідношенням вмісту цинку і купруму у тканині (у 6,9 раза за впливу саліноміцину).

Відтак металотіонеїни відіграють важливу роль у депонуванні цинку у тканині травної залози за порушень його акумуляції та дисбалансу з купрумом, викликаних мікропластиком обох розмірів та фармацевтичними препаратами. У моллюсків з референтної популяції та за теплового навантаження стрес-реакція металотіонеїнів на вплив ксенобіотиків послаблена.

Оцінка реакції окисного/редуктивного стресу у травній залозі *U. tumidus* за впливу на організм МР різного розміру та фармацевтичних препаратів свідчить, що у Pr-популяції вплив МР пригнічував активність Cu,Zn-супероксиддисмутази (SOD) та посилював утворення продуктів перекисного окиснення ліпідів (TBARS). Вплив ібупрофену окремо та в суміші викликав посилення карбонілювання протеїнів. На противагу, у моллюсків з St-популяції за експериментальних впливів були виражені ознаки посилення антиоксидантного захисту, малоспецифічні до природи чинника: активація Mn-SOD на 185-300%, а за впливу ібупрофену й активація Cu,Zn-SOD, за впливу ібупрофену окремо та в суміші - пригнічення карбонілювання протеїнів на 37-

26%. Каталазна активність не зазнавала змін за умов досліджу. Відтак, залежно від популяції, у молюсків проявлялись ознаки пригнічення (Pr-популяція), або активації (St-популяція) антиоксидантного захисту, які були найбільше виражені за впливу МР, або ібупрофену відповідно. Ці результати не дають можливості виокремити індикаторні показники впливу МР окремо та у суміші. МР розміром 2 мкм не викликав змін системи окисного стресу у молюсків. Проте дія саліноміцину окремо та у суміші призвела до проявів окисного стресу – активації Mn-SOD та каталази, та зростання рівня карбонілювання протеїнів (саліноміцин). За підвищеної температури реакція каталази на вплив суміші пригнічувалась на 19% порівняно з контролем. Відтак МР викликав ознаки окисного стресу лише у Pr-популяції, тоді як обидва фармацевтики окремо та у суміші визначали помітні зміни у системі антиоксидантного захисту.

Оцінка відновного статусу у тканині травної залози показала відмінність у стані системи глутатіону між контрольними групами з двох популяцій з меншим рівнем GSH та GSSG у Pr-популяції, проте показник GSH/GSSG між популяціями не відрізнявся. Різною була і реакція на експериментальний вплив: у молюсків з Pr-популяції система глутатіону помітно активувалась за впливу МР окремо та в суміші зі зростанням рівня GSH, GSSG та, за впливу МР, індексу GSH/GSSG. У молюсків St-популяції відбувались прооксидантні зміни у системі глутатіону у всіх експозиціях, проте баланс GSH/GSSG відповідав контролю. За впливу на організм МР 2 мкм показники системи GSH зазнавали ще помітнішого ураження. Вміст GSH та показник GSH/GSSG зменшувались за впливу МР, його сумішей, особливо за теплового впливу (до 50%).

Вміст нікотинамідного коензиму NAD^+ був удвічі вищим у Pr-, ніж у St-контрольних молюсків, проте співвідношення NAD^+/NADH було удвічі вищим у St-популяції. Разом з тим, в обох популяціях вплив експозицій викликав різку та неспецифічну реакцію редукційного стресу – зменшення цього співвідношення у діапазоні 37-88% від відповідного контролю. Редукційний стрес за ознаками зменшення частки NAD^+/NADH у тканині спостерігався й у молюсків III експериментальної серії за впливу всіх чинників внаслідок

зростання концентрації NADH за виключенням МіхГ групи, у якій спостерігалось різке зменшення вмісту обох форм коензиму, демонструючи виснаження системи енергетичного забезпечення тканини. Відтак, зміщення до відновного стану у тканині характеризує неспецифічну реакцію на дію пошкоджуючих чинників, спільну для двох популяцій та всіх розглянутих експериментальних впливів.

Популяційні особливості були виявлені і при визначенні активності показників апоптозу і лізосомальної функціональності, причому у St-популяції активність каспази-3, як ключового виконавчого ензиму апоптозу та лізосомальної протеази катепсину Д була вища, ніж в екземплярів Pr-популяції. МР 0,1-0,5 мм не впливав на активність каспази-3 в обох популяціях, тоді як ібупрофен окремо та у суміші у Pr-групах зменшував її на 37-38%, а у St-популяції не викликав змін. У серії з дослідження МР 2 мкм та саліноміцину при температурі 18°C спостерігали збільшення активності каспази-3 у всіх дослідних групах на 61-98%, тоді як тепловий вплив нівелював цей ефект суміші. У Pr-популяції відзначено також особливу реакцію в експозиціях – зменшення активності катепсину Д у лізосомах та його посилений вихід по-за лізосоми, особливо за впливу МР (на 240%). У молюсків St-популяції загальна активність катепсину Д зростала за впливу МР обох розмірів, ібупрофену, саліноміцину та їх поєднання. При цьому вивільнення катепсину Д з лізосом також зростало за впливу МР обох розмірів, ібупрофену (особливо) та поєднання МР з саліноміцином у двох температурних режимах. Узгоджену активацію цитоплазматичного та лізосомального шляхів апоптозу/аутофагії відзначено за впливу МР 2 мкм окремо та у поєднанні.

Відтак, нами було виявлено низку неспецифічних біохімічних ознак у функціонуванні травної залози молюска, які характеризують його чутливість до змін середовища і здатність пластично пристосовуватись до них. Це акумуляція резерву цинку у складі металотіонеїнів, збільшення частки купрум/цинк, активація редокс системи та лізосомального катаболізму. Преадаптація молюсків до впливу несприятливих чинників середовища в антропогенно

навантаженій місцевості визначає реакції на вплив МР обох досліджених розмірів окремо та спільно з фармацевтиками. Теплова дія нівелює реакції організму на комбінований вплив МР та фармацевтика. Доведено, що вплив МР залежить від його розміру і більше виражений для дії МР 2 мкм. За спільного впливу МР та фармацевтиків проявляється синергічний ефект. Запропоновано простий у виконанні метод визначення акумуляції МР розміром 0,1-0,5 мм у м'яких тканинах молюска та використання показників співвідношення $NAD^+/NADH$ та Zn/Cu для оцінки реакції організму молюска на пошкоджуючий вплив довкілля.

Ключові слова: акумуляція, металотіонеїни, цинк, купрум, тіолвмісні сполуки, апоптоз, синергічний ефект, цитотоксичність, окисний стрес, карбоніли протеїнів, редокс система, гідробіонти, адаптація, забруднення.

SUMMARY

Martyniuk V.V. Biochemical mechanisms of the influence of microplastics on the organism of the bivalve mollusk *Unio tumidus* individually and under combined action - Qualification scientific work on the rights of the manuscript.

Thesis for the degree of Doctor of Philosophy 091 "Biology" (09 - Biology). – Ternopil Volodymyr Hnatyuk National Pedagogical University. – Ternopil, 2023.

The dissertation is devoted to the investigation of biochemical responses of the freshwater mussels *Unio tumidus* (Philipson et al., 1788) in the exposures to waterborne microplastics depending on the size of the particles separately and in combination with other adverse factors of chemical and environmental origin. The accumulation capacity of the important essential metal zinc with the participation of metallothioneins, the oxidative/reductive stress response and the activity of apoptosis and autophagy enzymes were selected as a biochemical targets in these exposures. The work utilised methods of preparative biochemistry, spectrophotometry, chromatographic and electrophoretic analyses, light and luminescent microscopy, histological and morphometric studies, and statistical analysis.

The aim of the study is determined by the problem of environmental pollution with microplastics and its potential ecotoxicity. Among the predicted consequences of this pollution, the ability of microplastics to adsorb hydrophobic molecules on its surface and act as a vector, contributing to the contact of these xenobiotics with the organism, caused a main concern. Bivalves are generally recognized bioindicators of the water quality due to their filter feeding and sedentary lifestyle, that provide the accumulation of pollutants in the aquatic environment, and in respect to their sensitivity to environmental stress and toxicity, which are conservative in the animal world. At the same time, bivalve molluscs are able to adapt to the environmental conditions in their native biotope, and, accordingly, show population-dependent differences in resistance to the influence of damaging factors. As ectotherm organisms, they respond sensitively to the temperature regime. Regarding the potential toxicity of microplastics for bivalve molluscs, the views are contradictory due to the high filtering activity of the organism. However, the studies are mostly

devoted to the acute toxic effect, and mostly they are not focused on the expected vector interaction with hydrophobic xenobiotics. Therefore, the aim of this study was to investigate the ability of *U. tumidus* to accumulate waterborne microplastics and the selection of prospective molecular targets involved in the biochemical response to its effect alone and in combination with related xenobiotics in subchronic exposures.

Accordingly, in the dissertation work, in the 1st experimental series, we evaluated the accumulative capacity of mussels from an anthropogenically loaded area (Nichlava River, Ct-population) concerning to microplastics (MP) with a particle size of 0.1-0.5 mm (shredded household polyethylene terephthalate, according to the new size classification - mesoplastic) at a concentration of 1 mg/l for 14 days. In the next two experiments, biochemical responses of the mussels to the effect of MP separately and in combination were studied. Series II - *U. tumidus* from two areas - reference (Sluch River, Pr-population) and anthropogenically loaded (Nichlava River, Ct-population) - were exposed to mesoplastic at a concentration of 1mg/l (MP), ibuprofen (IBU, pharmaceutical grade, 8 µg/l (3.9 nM) separately and their mixtures (Mix) for 14 days. Series III - mussels from an anthropogenically loaded area (Ct population) were exposed to MP (polystyrene, Sigma Aldrich) with a size of 2 µm, at concentration of 1 mg/l, salinomycin (Sal, a concentration of 6 µg/l) separately and in a mixture at 18°C (Mix) and 25°C (MixT). Concentrations of xenobiotics and the size of MP particles corresponded to their characteristics in natural water bodies, and the temperature regime of 25°C corresponded to the established temperature for water in the studied area in summer.

It was found that the mussels have a high ability to accumulate MP from the environment with the maximum number of particles in soft tissues at 8-10 days of incubation (≈320-330 particles per organism compared to 9.5 particles in the control), accordingly to decrease in its quantity in the experimental environment. Basing on these results, we recommend the utilizing of freshwater bivalve *U. tumidus* as a bioindicator for assessing the content of MP in the aquatic environment.

Among expected biochemical responses on the exposures to xenobiotics, we focused on the ability of the digestive gland tissue to accumulate the essential metal

zinc with the participation of metal-buffering proteins metallothioneins. Besides the responses to toxic metals, metallothioneins sensitively and selectively react on plural other damaging factors of a chemical and ecological nature by changes in both the total content in the tissue and the degree of metalation.

We eluted the thermostable proteins, which were identified as metallothioneins based on molecular weight of ≈ 7 kDa, absorption maximum at 245-250 nm typical for metal-thiolate clusters, and behavior during tricine SDS-PAGE electrophoresis. Under the experimental conditions, no signs of their dimerization were observed. Comparison of control groups from the two populations revealed a 3.5-fold difference in the concentration of total metallothionein protein with a higher content in Pr-molluscs. Under the influence of MP, Ct-molluscs showed a typical reaction of an increase in the level of metallothioneins as stress-responsive proteins, while their content decreased in Pr-molluscs. Exposure to ibuprofen and the mixture in both populations resulted in a 34-57% decrease in metallothionein content compared to the respective control. However, the content of the metalated form of these proteins remained unchanged compared to the corresponding control at all exposures, except an increase in the Pr-Mix group. Therefore, a stable level of zinc deposition in the composition of metallothioneins was provided, regardless of changes in its total content in the tissue (increase in Ct-MP, Mix and Pr-IBU groups). At the same time, the content of non-metalated (apo-) form of metallothioneins that characterized by high antioxidant activity of thiol groups increased only under the influence of MP in the Ct population.

The study of the effect on mollusk of 2 μm MP alone and in combination with the antibiotic salinomycin under two temperature regimes showed an increase in the total content of metallothioneins under the exposures to MP and salinomycin, while it did not change in the Mix group and decreased in the MixT group. The content of metallothionein-bound zinc increased in all exposures, the most noticeable changes were observed in the Mix- and MixT groups (by 4.4 and 2.9 times, respectively). When the total content of zinc in the tissue of the digestive gland was indicated, a different regularity than for the composition of metallothionein was indicated. In

particular, a decrease in its content under the effect of MP and MixT, and an increase in the Mix group were shown. Therefore, regardless of the instability of the level of total zinc content in the tissue, the ability of metallothioneins to provide a certain reserve of zinc was also observed in this series, especially in the MP groups (21% of the total zinc content in the tissue compared to 11% in the control) and MixT. In this experimental series, all exposures were found to cause a three- to fivefold increase in copper content in the tissue. Accordingly, the ratio of zinc to copper content in the tissue decreased (by 6.9 times under the influence of salinomycin).

Hence, metallothioneins play an important role in the accumulation of Zinc in the tissue of the digestive gland under the disturbance of its accumulation and imbalance with Copper caused by microplastics of both sizes and pharmaceuticals. In molluscs from the reference population and under elevated temperature, the stress reaction of metallothioneins to the exposures was alleviated.

Evaluation of the oxidative/reductive stress response in the digestive gland of *U. tumidus* under the influence of MPs of different sizes and pharmaceuticals on the organism shows that in the Pr population, exposure to MPs inhibited the activity of Cu,Zn-superoxide dismutase (SOD) and increased the formation of lipid peroxidation products (TBARS). Exposure to ibuprofen alone and in a mixture caused an increase in protein carbonylation. On the contrary, in molluscs from the Ct population, under experimental exposure, there were pronounced signs of increased antioxidant protection, not specific to the nature of the factor: activation of Mn-SOD by 185-300%, and ibuprofen solely induced the Cu,Zn-SOD activity and the ibuprofen solely and in mixture suppressed the protein carbonylation by 37-26%. Catalase activity did not change under the experimental conditions. Therefore, depending on the population, molluscs showed signs of inhibition (Pr-population) or activation (Ct-population) of antioxidant defence, which were most pronounced under the effect of MP or ibuprofen, respectively. These results do not make it possible to select the markers of the impact of MP separately and in a mixture. MP with a size of 2 μm did not cause changes in the oxidative stress system in molluscs. However, the action of salinomycin alone and in a mixture led to manifestations of oxidative stress -

activation of Mn-SOD and catalase, and an increase in the level of protein carbonylation (salinomycin). At elevated temperature, the reaction of catalase to the influence of the mixture was inhibited by 19% compared to the control. Therefore, MP caused signs of oxidative stress only in the Pr-population, while both pharmaceuticals separately and in a mixture determined noticeable changes in the antioxidant defense system.

Assessment of the reductive status in the digestive gland tissue showed a difference in the state of the glutathione system between the control groups from two populations with a lower level of GSH and GSSG in the Pr population, but the GSH/GSSG ratio was the same in both counterparts. The response to exposures was also different. In molluscs from the Pr population, the glutathione system was significantly activated under the effect of MP alone and in a mixture with an increase in the level of GSH, GSSG and, GSH/GSSG index (under the effect of MP). Ct-molluscs had shown the pro-oxidant changes in the glutathione system in all exposures, but the GSH/GSSG balance was not significantly changed in respect to control. Under the effect of MP 2 μm , the indices of the GSH system had shown even more noticeable damage. The GSH content and the GSH/GSSG ratio decreased under the influence of MP and its mixtures, especially under heating (up to 50%).

The content of the nicotinamide coenzyme NAD^+ was twice as high in Pr- than in Ct-control molluscs, but the NAD^+/NADH ratio was twice as high in the Ct-population. At the same time, in both populations, the impact of the exposures caused a sharp and non-specific reaction of reduction stress - a decrease in this ratio in the range of 37-88% of the corresponding control. Reductive stress was also observed in molluscs of the experimental series under the influence of all factors due to the decrease in the ratio of NAD^+/NADH in the tissue as the consequence of increase in the concentration of NADH/ One exception was the response of MixT group, in which a sharp decrease in the content of both forms of the coenzyme was observed, demonstrating the depletion of the energy supply system of the tissue. Therefore, the shift to the reductive state in the tissue characterizes a non-specific reaction to the effect of damaging factors shared between two populations and all applied exposures.

Population peculiarities were also revealed under the indication of apoptotic activity and lysosomal functionality. Particularly, in the Ct population, the activities of caspase-3, the key executive enzyme of apoptosis, and the lysosomal protease cathepsin D was higher than in the specimens of the Pr-population. MP 0.1-0.5 mm did not affect the activity of caspase-3 in both populations, while ibuprofen alone and in a mixture in the Pr-groups reduced it by 37-38%, and in the Ct-population it did not cause changes. In the exposures to MP 2 μm and salinomycin at a temperature of 18°C, an increase in caspase-3 activity was observed in all experimental groups by 61-98%, while thermal exposure alleviated this effect of the mixture. In the Pr-population, a specific response to exposures was also noted - a decrease in the activity of cathepsin D in lysosomes and its enhanced exit from lysosomes, especially under the influence of MP (by 240%). In Ct-population molluscs, the total activity of cathepsin D increased under the influence of MP of both sizes, ibuprofen, salinomycin, and their combination. At the same time, the release of cathepsin D from lysosomes also increases under the influence of MP of both sizes, ibuprofen (especially) and the combination of MP with salinomycin in two temperature regimes. Coordinated activation of cytoplasmic and lysosomal pathways of apoptosis/autophagy was noted under the influence of 2 μm MP alone and in combination.

Summarizing, we discovered a number of non-specific biochemical signs in the functioning of the mollusk's digestive gland, which characterize its sensitivity to environmental changes and the ability to plastically adapt to them. These biochemical signs are the accumulation of the zinc reserve in the composition of metallothioneins, an increase in the proportion of copper/zinc, activation of the redox system and lysosomal catabolism. Pre-adaptation of molluscs to the influence of adverse environmental factors in an anthropogenically loaded area determines the reactions to the influence of MP of both studied sizes separately and in combination with pharmaceuticals. The heating reduced the responses of the organism to the combined effect of MP and pharmaceutical. It has been proven that the effect of MP depends on its size and is more pronounced for the effect of MP 2 μm . Under the joint influence

of MP and pharmaceuticals, a synergistic effect is manifested. It as proposed the easy-to-implement method for determining the accumulation of 0.1-0.5 mm MP in the soft tissues of the mollusc and analysis of the NAD^+/NADH and Zn/Cu ratios to assess the response of the mollusc to the harmful effects of the environment.

Key words: accumulation, metallothioneins, zinc, copper, thiol-containing compounds, apoptosis, synergistic effect, cytotoxicity, oxidative stress, protein carbonyls, redox system, hydrobionts, adaptation, pollution.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці в яких опубліковані наукові результати дисертації:

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

1. Martyniuk, V., Gylytė, B., Matskiv, T., Khoma, V., Tulaidan, H., Gnatyshyna, L., Orlova-Hudim, K., Manusadžianas, L., & Stoliar, O. (2022). Stress responses of bivalve mollusc *Unio tumidus* from two areas to ibuprofen, microplastic and their mixture. *Ecotoxicology*, 31(9), 1369–1381. <https://doi.org/10.1007/s10646-022-02594-8>

2. Martyniuk, V., Khoma, V., Matskiv, T., Baranovsky, V., Orlova-Hudim, K., Gylytė, B., Symchak, R., Matciuk, O., Gnatyshyna, L., Manusadžianas, L., & Stoliar, O. (2022). Indication of the impact of environmental stress on the responses of the bivalve mollusk *Unio tumidus* to ibuprofen and microplastics based on biomarkers of reductive stress and apoptosis. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology*, 261, 109425. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109425>

3. Martyniuk, V., Khoma, V., Matskiv, T., Yunko, K., Gnatyshyna, L., Stoliar, O., & Faggio, C. (2023). Combined effect of microplastic, salinomycin and heating on *Unio tumidus*. *Environmental toxicology and pharmacology*, 98, 104068. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2023.104068>

4. Martyniuk, V. V. (2022). Accumulation of microplastics in the bivalve mollusc *Unio tumidus* under experimental and field exposures. *Studia Biologica*, 16(4): 33–44. <https://doi.org/10.30970/sbi.1604.694>

Наукові фахові видання:

1. Martyniuk, V., Matskiv, T., Yunko, K., Khoma, V., Gnatyshyna, L., Faggio, C., Stoliar, O. (2023) Reductive stress and apoptotic activities in bivalve mollusc *Unio tumidus* exposed to the combination of microplastics, antibiotic salinomycin and heating. Preprint from Research Square, 11 Jul 2023. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3156761/v1>.

Патенти:

1. Гнатишина Л.Л., Загричук 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, МРК 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

2. Столяр О.Б., Мартинюк В.В., Мочарський В.С., Тулайдан Г, М., Барановський В.С. Спосіб експрес аналізу забруднення водою мікропластиком з використанням біоіндикації: МРК: А61К 35/618 (2015.01), А61К35/08, С01N33/18 (2006.01), А23L 17/50 (2016.01) № u202300217; заявл. 23.01.2023.

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. Martyniuk V.V., Khoma V.V., Mackiv T.R., Yunko K.B., Formanchuk R.T., Nikonchuk A.I. Biochemical responses of bivalve mollusk to ibuprofen dependent on the presence of microplastics and history of population. *«Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2021»*: збірник тез конференції-конкурсу молодих вчених (м. Київ, 20-21 травня 2021 р.) Київ. 2021. С.40.

2. Martinyuk V.V., Khoma V.V., Matskiv T.R., Yunko K.B., Formanchuk R.T., Nikonchuk A.I., Gnatyshyna L.L., Stoliar O.B. Environmentally realistic concentration of microplastic modulates the effect of pharmaceutical ibuprofen on the bivalve mollusk. *Тернопільські біологічні читання – Ternopil Bioscience – 2021*. Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції, присвяченої 50-річчю кафедри загальної біології та методики навчання природничих дисциплін і 100-річчю від дня народження доктора біологічних наук, професора Шуста Івана Васильовича. Тернопіль: Вектор, 2021. 189 с.

3. Martyniuk V., Khoma V., Mackiv T., Nikonchuk A., Kravchuk O., Gnatyshyna L., Stoliar O. The evaluation of the effect of microplastic on bivalve mollusk in the single and combine with ibuprofen exposures. *Хімічні проблеми сьогодення (ХПС-2021)*: збірник тез доповідей IV Міжнародної (XIV Української) наукової конференції студентів, аспірантів і молодих учених (м. Вінниця, 23-25 березня 2021р.). Вінниця. 2021. С. 29.

4. Martyniuk V., Khoma V., Mackiv T., Nikonchuk A., Formanchuk R., Gnatyshyna L., Stoliar O. Microplastic influence the effect of ibuprofen on the oxidative stress and lysosomal activities in the model organism. *Молодь і поступ*

біології: збірник тез доповідей XVII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів (м. Львів, 19–21 квітня 2021 р.). Львів. 2021. С. 67.

5. Martyniuk V., Khoma V., Mackiv T., Nikonchuk A., Kravchuk O., Gnatyshyna L., Stoliar O. Multi-marker approach in the environmentally relevant co-exposure of bivalve mollusk with microplastic confirms new pharmacological targets of ibuprofen. *Modern approach of experimental and preclinical pharmacology: Materials of the International Distance Scientific and Practical Conference* (19 February, 2021, Kharkiv). Kharkiv. 2021. P. 20–21.

6. Martyniuk V., Khoma V., Matskiv T., Yunko K., Gnatyshyna L., Mudra A., Stoliar O., Faggio C. Heating diminishes the apoptotic activities of novel anti-cancer drug salinomycin and its mixture with microplastic in bivalve mollusc. *Current problems of biochemistry, cell biology and physiology: 6 International scientific conference*, Dnipro, October, 6–7. 2022. P. 83–85.

7. Martyniuk V., Khoma V., Matskiv T., Yunko K., Gnatyshyna L., Stoliar O., Faggio C. Biochemical responses in bivalve mollusc *Unio tumidus* to pharmaceutical salinomycin and microplastic under the heating. *Youth and progress of biology: XVIII International scientific conference for students and Phd students*, October, 6–7. Lviv, 2022

8. Martinyuk V. V., Khoma V. V., Matskiv T. R., Yunko K. B., Gnatyshyna L. L., Stoliar O. B. Accumulation of microplastic and its impact on the responses to pharmaceutical in the bivalve mollusc *Unio tumidus*. *Тернопільські біологічні читання – Ternopil Bioscience – 2022: матеріали VI Міжнар. наук.-практ. конф.*, 4–6 листопада 2022 р. Тернопіль: ТНПУ, 2022.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- GSH – глутатіон відновлений
- GSSG – глутатіон окиснений
- MP – мікропластик
- MTSH – металотіонеїни, визначені за кількістю SH- груп (загальний вміст)
- PC – окисні модифікації протеїнів
- RI GSH – редокс- індекс глутатіону
- SOD – супероксиддисмутаза
- TBARS – перекисне окиснення ліпідів
- Zn-MT – концентрація цинку у складі металотіонеїнів
- АФК – активні форми кисню
- ДТНБ – 5,5-дитіобіс-2-нітробензойна кислота
- ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота
- ПВХ – полівінілхлорид
- ПЕ – поліетилен
- ПЕТ – поліетилентерефталат
- ПП – поліпропілен
- ПС – полістирол
- ТБК – 2-тіобарбітурова кислота
- УФ-спектри – спектри абсорбції в ультрафіолетовому діапазоні
- ФМСФ – фенілметилсульфонілфторид

ВСТУП

Актуальність теми. Поверхневі води є кінцевим реципієнтом забруднювачів різноманітного походження. Повідомляється, що більше ніж половина річок та озер у Європі відзначається нижчим, ніж «добрий» екологічним статусом або потенціалом (<http://www.eea.europa.eu/soer-2015/europe/freshwater>). Традиційно найбільша увага серед забруднювачів водойм впродовж десятиліть приділялась перехідним металам. Проте, в наш час цей вид забруднення залишається актуальним здебільшого для індустріальних районів (Kumar et al., 2019; Wang et al., 2022; Pandey and Kumari, 2023). Натомість в урбанізованих та аграрних ареалах на перший план виступає біологічна загроза численних комбінацій побутових та фармацевтичних препаратів, наноматеріалів, а також пестицидів, ветеринарних відходів, залишків харчового виробництва та їх біоактивних метаболітів (Faggio et al., 2018; Zhou et al., 2019). Зокрема, до пріоритетних забруднювачів водного середовища належить низка фармацевтичних препаратів протизапальної, нейротропної та антидіабетичної дії, не зважаючи на їхню присутність у водоймах у малих кількостях (Riva et al., 2010; Pal et al., 2010; Ikkere et al., 2018; Sousa et al., 2018; Vystavna et al., 2018; Diamanti et al., 2020). Методології оцінки ризиків комбінованого впливу цих сумішей знаходяться на початковому рівні розробки, що ускладнюється різноманіттям ймовірних взаємодій між складовими суміші, як у водному середовищі, так і в організмі.

У структурі сучасних забруднювачів водного середовища дедалі більше занепокоєння викликає мікропластик (MP). Magni та ін., (2019) показали, що навіть за очисної ефективності водоочисних споруд 83% у водойму з них потрапляє 160 млн частинок на день, представлених поліестерами, поліамідом, поліетиленом, поліакрилатами, сягаючи 1 млн часток на м³ (Li et al., 2018). Відомі труднощі диференціації цих частинок у середовищі (Binelli et al., 2019). Особливу небезпеку становить сорбція на цих частинках з великою загальною площею поверхні інших новітніх забруднювачів, таких як фармацевтичні препарати, щодо яких також малоефективні очисні споруди. Доведено

каталітичну функцію металотіонеїнів у дії побутових ксенобіотиків, зокрема, посилення біоакуміляції бензопірену у присутності МР (потенційний ефект Троянського коня) (de Sá et al., 2018). Відомо, що мікропластик та фармацевтичні препарати водного середовища спричинюють ендокринні порушення, метаболічний та генотоксичний ефекти, що проте досліджено здебільшого у гостротоксичних модельних експериментах з використанням високих концентрацій чинників (de Sá et al., 2018; Li et al., 2018; Binelli et al., 2019; Pannetier et al., 2020; Rowley et al., 2020; Santos et al., 2021; Jeyavani et al., 2021). У переліку токсичних викидів муніципального походження у річках, що знаходяться на території України, чільні позиції займають ліки диклофенак та диоксин-подібні поліхлоровані бісфенілноніфеноли, тоді як забруднення МР не повідомляється (Vystavna et al., 2018; Diamanti et al., 2020).

Кліматичні аномалії впливають на адаптивний потенціал організмів, виснажуючи його, що, відповідно може позначатися на детоксикаційній активності щодо «коктейлю ксенобіотиків», зокрема у водних тварин (Столяр та ін., 2016; Ebi et al., 2021; Khoma et al., 2021; 2022). З іншого боку, як доведено на різних модельних організмах, від одноклітинних до хребетних тварин, попередня або тривала дія пошкоджуючого чинника помірної сили («м'якого стресу»), зокрема адаптація у природних умовах існування до підвищеного рівня іонізуючої радіації або ксенобіотиків, у багатьох випадках викликає реакцію гормезису, тобто підвищує стійкість організму до гостротоксичного впливу цього ж стресу (явище переадаптації) та інших видів стресів (явище перехресної адаптації) (Bayliak et al., 2013, 2019; Gnatyshyna et al., 2012; Столяр та ін., 2016; Vozhkov et al., 2021). Ці особливості слід враховувати у створенні модельних схем для передбачення наслідків несприятливих впливів на організм у довкіллі.

Двостулкові молюски, які поширені у різноманітних географічних зонах, є визнаними біоіндикаторами стану водойм, оскільки вони адсорбують забруднювачі завдяки фільтруючому способу харчування і ведуть осілий спосіб існування, тобто відображають локальні особливості водного середовища

(Viarengo et al., 2007; Pain-Devin et al., 2014; Breitwieser et al., 2016; Matozzo et al., 2019; Khan et al., 2020). Не зважаючи на наявність певних фізіологічних захисних механізмів у токсичному середовищі, вони характеризуються високим рівнем реактивності на зовнішні впливи завдяки індукцйбельності ензимів антиоксидантного захисту та апоптозу, а стабільність їх лізосомальних мембран визнається одним з найбільш адекватних методів оцінки токсичності середовища (Viarengo et al., 2007). Морські двостулкові молюски широко використовуються в програмах біомоніторингу, таких як Mussel Watch, MED POL і BioMar (Georgieva et al., 2022).

Традиційно в оцінці пошкоджуючого впливу на їх організм використовуються біохімічні маркери окисного стресу, біотрансформації ксенобіотиків та маркери цитотоксичності (Viarengo et al., 2007; Столяр та ін., 2016). Проте, оскільки водні молюски є облігатними анаеробами, при оцінці їх життєвого статусу актуальним є дослідження характеристик редукційного стресу, а саме відновного статусу функціональних груп їх біомолекул. До таких характеристик належать металотіонеїни – поліфункціональні внутрішньоклітинні протеїни, здатність яких хелатувати іони металу та брати участь в антиоксидантному захисті залежить від відновного статусу їх тіолових груп (Broeg and Lehtonen, 2006; Sureda et al., 2011; Hook et al., 2014; Trapp et al., 2014; de Oliveira et al., 2020).

Таким чином, існує нагальна потреба у продукуванні коректних підходів до оцінки потенційної екотоксичності екологічно реальних поєднань новітніх ксенобіотиків на водні організми з врахуванням адаптаційної здатності організмів сформованої у певних біотопах, залежно від кліматичних особливостей та ґрунтуючись на аналізі реакцій окисного/редукційного стресу та цитотоксичності.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Робота виконувалась у межах держбюджетних тем МОН України М/70-2021 (номер державної реєстрації 0121U113511) «Розробка набору біопроб –

біомаркерів для оцінки впливу фармацевтичних препаратів на водні екосистеми»

М/84-2021 (номер державної реєстрації № 0121U113543); М/13-2022 (номер державної реєстрації № 0122U002428) «Імунологічне та біохімічне порівняння резистентності інвазивних і природних двостулкових молюсків до впливу викликів довкілля»

Мета і завдання дослідження.

Мета роботи – дослідження здатності *U. tumidus* акумулювати мікропластик водного середовища та пошук потенційних молекулярних мішеней, задіяних у біохімічну відповідь на його вплив окремо та у поєднанні з супутніми ксенобіотиками у субхронічній експозиції.

Для досягнення мети було визначено такі завдання:

1. Визначити акумуляційну здатність двостулкового молюска *U. tumidus* щодо мікропластику у субхронічній експозиції до його екологічно реальної концентрації;

2. Охарактеризувати реакцію цинк-депонувальних протеїнів металотіонеїнів та їх участь у метаболізмі цинку у травній залозі молюска *U. tumidus* за впливу на організм мікропластику залежно від його розмірів, адаптаційного потенціалу молюсків окремо та у поєднанні з фармацевтичними препаратами ібупрофеном та саліноміцином за двох температурних режимів (18°C та 25°C);

3. З'ясувати стан системи окисного/редукційного стресу у травній залозі молюска *U. tumidus* за впливу на організм мікропластику залежно від його розмірів, адаптаційного потенціалу молюсків окремо та у поєднанні з фармацевтичними препаратами ібупрофеном та саліноміцином за двох температурних режимів (18 °C та 25 °C);

4. Визначити активність ензимів апоптозу/аутофагії у травній залозі молюска *U. tumidus* за впливу на організм мікропластику залежно від його розмірів, адаптаційного потенціалу молюсків окремо та у поєднанні з

фармацевтичними препаратами ібупрофеном та саліноміцином за двох температурних режимів (18 °C та 25 °C);

5. Здійснити інтегральну оцінку впливу мікропластику окремо та у поєднанні з супутніми пошкоджуючими чинниками на організм *U. tumidus* та виокремити перспективні біомаркери екотоксичності мікропластику у водному середовищі.

Об'єкт дослідження – біохімічні реакції двостулкового молюска на вплив мікропластику водного середовища.

Предмет дослідження – клітинні низькомолекулярні тіоли, акумуляція цинку, система окисного/редукційного стресу, цитоплазматичні та лізосомальні протеази у травній залозі двостулкового молюска за впливу на організм мікропластику водного середовища залежно від розміру частинок, окремо та у поєднанні з фармацевтичними препаратами ібупрофеном та саліноміцином за двох температурних режимів (18°C та 25°C) та враховуючи особливості адаптації молюсків у природному ареалі.

Методи дослідження – методи препаративної біохімії, розподільча хроматографія (виділення металотіонеїнів), електрофорез у поліакриламідному гелі (виділення металотіонеїнів), спектрофотометричні (визначення вмісту металотіонеїнів, цинку, метаболітів та активності ензимів, визначення вмісту металів), мікроскопічні (аналіз вмісту мікропластику), гістологічні (визначення статі та наявності інфікування), методи математичної статистики.

Наукова новизна одержаних результатів.

У дисертаційній роботі вперше досліджено здатність двостулкового молюска *U. tumidus* акумулювати мікропластик з середовища, та встановлено високий акумуляційний потенціал організму протягом 14-ти денного впливу, що створює перспективи використання молюсків для ідентифікації мікропластику у водоймах. Підтверджено синергічний ефект мікропластику за комбінованого впливу з поширеними у водному середовищі фармацевтиками: ібупрофеном та саліноміцином. Визначено відмінності між реакцією перлівниці на вплив мікропластику двох розмірів. Вперше виявлено ознаки редуکتивного

стресу, як найбільш послідовну і чутливу реакцію на пошкодуючі впливи різної природи у організмі перлівниці. Доведено, що металотіонеїни забезпечують акумуляцію цинку у тканині травної залози, що є неспецифічним проявом за впливу на організм несприятливих чинників. Доведено вирішальний вплив адаптаційного потенціалу, сформованого у певній популяції, на здатність молюска до реакції на стрес та стратегії кінцевих наслідків несприятливих впливів. Продемонстровано послаблення реакцій перлівниці на комбінований вплив мікропластику та саліноміцину за підвищеної температури.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати щодо здатності двостулкових молюсків акумулювати мікропластик можуть бути використані, як оціночний критерій забруднення водних екосистем пластиком. Створено методологічні основи для експериментального доведення синергічної дії мікропластика та інших мікрополютантів на водні організми. Доведено, що біохімічні реакції молюсків на фармацевтичні препарати відповідають відомим ефектам для вищих тварин, що мотивує використання даного модельного організму для вивчення впливу поширених ксенобіотиків.

Особистий внесок здобувача. Аналіз та підбір літератури, постановка та реалізація методів дослідження, отримання експериментальних даних та їх опрацювання здійснювались автором самостійно. Проведення експерименту, відбір зразків з водою проводилась спільно з іншими співробітниками держбюджетних тем. Планування стратегії досліджень, аналіз отриманих даних та їх обговорення проведено спільно з науковим керівником д.б.н. проф. Оксаною Столяр. Друковані роботи підготовлено за безпосередньої участі автора.

Апробація результатів дисертації.

Основні положення дисертації були представлені на міжнародних та всеукраїнських конференціях, зокрема на XVII, XVIII Міжнародних наукових конференціях студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2021, 2022); Хімічні проблеми сьогодення 2021 IV Міжнародна (XIV Українська) наукова конференція студентів, аспірантів і молодих учених (Вінниця, 2021),

«Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2021» (Київ, 2021), Міжнародна дистанційна науково-практична конференція «Modern approach of experimental and preclinical pharmacology» (Харків, 2021); Міжнародній науково-практичній конференції «Тернопільські біологічні читання – Ternopil bioscience» (Тернопіль, 2021, 2022), Міжнародній науково-практичній конференції Актуальні проблеми біохімії, клітинної біології та фізіології: 6 Міжнародна наукова конференція, (Дніпро, 2022)

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 15 праць, у тому числі 2 патенти на корисну модель, 5 статей у фахових виданнях, з яких 3 у виданнях з сумарним імпаکت-фактором 11,66, h=6 згідно баз даних Scopus (Scopus Author ID: 57210322204), 8 – матеріали і тези доповідей на з'їздах і конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація викладена на 158 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 263 джерел (з них 260 латиною). Робота ілюстрована 30 рисунками та 10 таблицями.

РОЗДІЛ І ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Вплив мікропластику на водні організми

Проблема забруднення водного середовища пластиковими виробами викликає дедалі більше занепокоєння у світі (Vivekanand et al., 2021). Пластмаси широко використовуються у багатьох галузях, таких як сільське господарство, промисловість, медицина, виробництво побутових товарів та військова промисловість. Якщо сучасні темпи виробництва та використання збережуться то до 2050 року на планеті буде ще 33 млрд тон пластику (Rochman et al., 2013). Привабливість пластикових матеріалів зумовлена їх економічною ефективністю, довговічністю, універсальністю, легкістю та міцністю. Проте ці риси обертаються небезпеками, коли пластик у незміненому вигляді потрапляє у довкілля (Kiran et al., 2022).

Основними видами синтезованих пластмас, а відповідно, і найпоширенішими у середовищі є поліетилентерефталат (ПЕТ), полістирол (ПС), (Рис. 1.1.1) поліетилен (ПЕ), поліпропілен (ПП) та полівінілхлорид (ПВХ). На поліестер, більшу частину якого становить ПЕТ, припадає 70% усіх виробництв волокнистої пластмаси (Geyer et al., 2017).

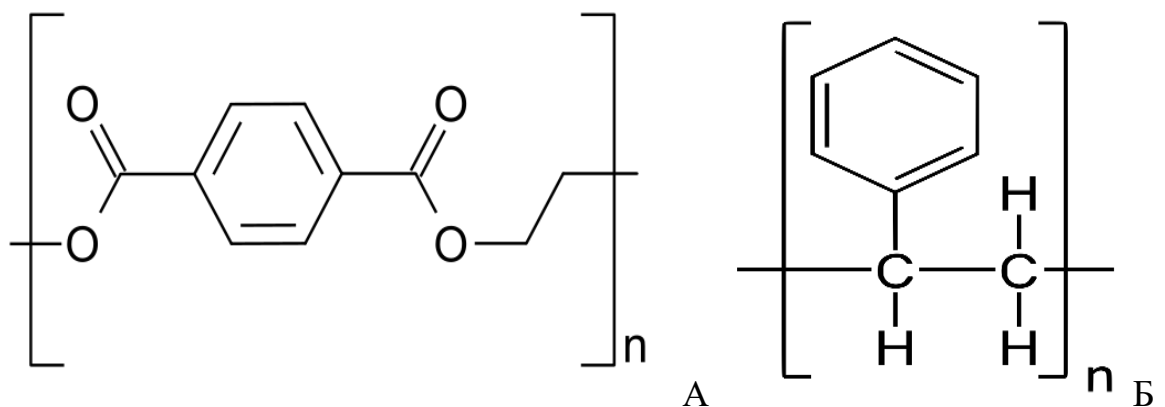


Рис.1.1.1. Хімічна структура головних промислових пластмас: А – поліетилентерефталат; Б – поліестерол

Після потрапляння у навколишнє середовище пластик піддається низці динамічних, гідрологічних, біологічних й атмосферних чинників, включаючи поверхневі течії, припливи, біообростання, механічну та ультрафіолетову

деградацію, опади, шторми тощо (Jambeck et al., 2015; Zhang et al., 2018). У результаті відбувається його подрібнення з утворенням мікро- та наночастинок.

Фрагменти пластику розміром менше ніж 5 мм називають «мікропластиком». За новою класифікацією за розміром частинки 0,1-0,5 мм належать до мезопластику (Bermúdez and Swarzenski, 2021). Залежно від походження він поділяється на первинний та вторинний. Первинний МР – це частинки комерційного пластику розміром < 5 мм, джерелами якого є косметичні продукти, ліки, фарби, також медичні та електронні пристрої, включаючи мікрокульки в засобах особистої гігієни, засобах для чищення, покриттях, фарбах та сировині, що використовується у виробництві пластикових матеріалів (Koelmans et al., 2015; Efimova et al., 2018). Вторинний МР є більш поширеним ніж первинний та утворюється внаслідок деградації або старінні пластмаси більших розмірів, під час утилізації (фрагментація синтетичних волокон у процесі прання одягу, вилучення часток із пляшок та інших пластикових предметів) або після потрапляння у середовище (Sadri and Thompson, 2014; Hirt and Body-Malapel, 2020; Hale et al., 2020).

Прісноводна система служить сполучною ланкою між наземним та морським середовищем існування, збагачуючи світовий океан на 1,15–2,41 млн. тон пластикових відходів у рік. Вміст МР у прісних водоймах Північної та Південної Америки коливається від 0,16 до 3438 часток/м³, в європейських водоймах – від 0,28 до 1265 часток/м³ (Кye et al., 2023), рівень мікрочастинок у муніципальних очисних спорудах складає 15,1–640 часток/л (Kang et al., 2018), у водоймах Азії – від 293 до 19 860 часток/м³ (Sarijan et al., 2021), з середніми концентраціями до $5,51 \pm 9,09$ мг/л у забруднених прісноводних системах (Lasee et al., 2017), у річці Дунай ≈ 900 часток/л (Moore et al., 2005). Інформацію про вміст МР у водоймах України нами не виявлено.

Завдяки малим розмірам МР швидко поширюється середовищем, у результаті частинки знаходяться у повітрі, ґрунті, воді та полярних льодовиках, як у морських глибинах, так і в організмах які там проживають (Fackelmann and Sommer, 2019). Поглинання часток може бути прямим (із середовища) або

непрямим (передаватися через трофічні ланцюги) (Smith et al., 2018). Залежно від щільності пластикових матеріалів, можливий їх розподіл у водоймах: щільніші пластики, такі як ПВХ і ПЕТ осідають на бентосі, а полімери низької щільності, такі як ПС, ПП і ПЕ залишаються у верхніх шарах водойм. Проте дослідження вказують на поєднання частинок високої та низької щільності у різних зразках, що пояснюється спільним впливом різноманітних екологічних та біологічних процесів (Hantoro et al., 2019).

При цьому, понад 50% МР, поглинутого організмами, складається з ПС, ПЕ, ПП, та ПЕТ (Kwon et al., 2020). Повідомляється, що понад 690 морських та більше 50 прісноводних видів організмів споживають пластик, у результаті чого відзначаються такі несприятливі наслідки, як фізичне пошкодження, пряма токсичність або фізіологічний вплив добавок та адсорбованих забруднюючих речовин (Rochman et al., 2013; Gall and Thompson, 2015; Carbery et al., 2018). Поява МР від кількох мкм до 5 мм в шлунково-кишковому тракті прісноводних організмів призводить до голодування, а власне переміщення МР після проковтування спричиняє накопичення, що супроводжується фізичним пошкодженням, засміченням та травмами, з наступним виділенням у вигляді псевдофекалій (Paul-Pont et al., 2018).

У молюсків *Mytilus galloprovincialis* після вживання пластику концентрацією 0,01 мг/мл та розміром 50-570 мкм спостерігали структурні зміни в травній залозі та зябрах, а також некроз мантиї та інших тканин (Brate et al., 2018; Faggio et al., 2018). Хронічна дія як кульок, так і волокон МР у концентрації 0,5-16 мг/л на *Ceriodaphnia dubia* показала дозозалежний вплив на втрату енергії та фізичні пошкодження, що призводить до зниження росту та розмноження (Ziajahromi et al., 2017). Схожий ефект впливу спостерігали для змін довжини тіла, показників розмноження та виживання нематоди *Caenorhabditis elegans* за дії МР концентрацією 1, 10 та 100 мг/л (Alomar et al., 2017; Lei et al., 2018). Слід зауважити, що зміни у моделях поведінки також відображають порушення нормальних реакцій, потенційне втручання у

плодючість та підвищену смертність організмів, які попереджають про наступні екологічні наслідки (Wong and Candolin, 2015; Tosetto et al., 2016).

За впливу частинок ПВХ високої концентрації (100 мг/л) на мідій *Perna viridis* було помічено виснаження запасів енергії, що вплинуло на основні життєві функції та призвело до підвищення смертності організмів (Rist et al., 2016). При впливі фрагментів МР розміром 70 нм, концентрацією 0,001–10 мг/л спостерігали надмірне виробництво активних форм кисню (АФК), що призводить до окисного ушкодження, зокрема у травній залозі *Danio rerio* (Lei et al., 2018).

Для *C. elegans* частинки ПС розміром 1,0 мкм викликали найбільшу летальність, максимум накопичення, найнижчий рівень Ca^{2+} у кишечнику та найвищу експресію глутатіон-S-трансферази. Вплив МР концентрацією 0,26 мг/л на *Dicentrarchus labrax* спричиняла у мозку риб нейротоксичність та активувала перекисне окиснення ліпідів (Barboza et al., 2018; Lei et al., 2018). Фізичні пошкодження та окисний стрес є найбільш очевидними ефектами впливу МР на живі організми (Sureda et al., 2006; Alomar et al., 2017; Lei et al., 2018; Lei et al., 2018). Особливості впливу МР різних розмірів для різних видів залишається нез'ясованою, але біодоступність МР залежить від різноманітності морфології та фізіологічної будови організмів, які безпосередньо пов'язані з ймовірністю проковтування, швидкістю та потенціалом транслокації (Wright et al., 2013).

Відтак, МР, як дрібні хімічно стабільні частинки викликають механічні ушкодження, порушення фізіологічних реакцій, порушення сигнальної активності та окисний стрес у водних організмів. Найбільше інформації існує щодо морських водних організмів, особливо риб та ракоподібних, тоді як прісноводні молюски за реакцією на МР досліджені недостатньо. Інформація щодо біохімічних ознак впливу МР на організм обмежена і несистемна.

1.2. Мікропластик як вектор для інших новітніх забруднювачів водою

Пластикове сміття, що тривало дрейфує у воді та знаходиться у навколишньому середовищі, діє як резервуар або переносник, накопичуючи поширені залишки токсикантів, що призводить до транспортування токсичних речовин на значні відстані із підвищенням біодоступності для організмів. Завдяки великій питомій поверхні та високій спорідненості до гідрофобних речовин, МР може діяти як вектор для забруднювачів, що переносяться водою. До таких забруднювачів потенційно можна віднести перехідні метали (Brennecke et al., 2016; Varboza et al., 2018), численні фармацевтичні препарати (Shi et al., 2020), поліциклічні ароматичні вуглеводні (Liu et al., 2016; Sun et al., 2020) та ветеринарні препарати (Zhang et al., 2018; Zhou et al., 2020).

Фармацевтичні сполуки належать до мікрозабруднювачів навколишнього середовища зростаючого значення (Dietrich et al., 2010). Значна кількість фармацевтичних препаратів та їхніх метаболітів виявляють у стічних водах та очисних спорудах, що є основними джерелами викидів у навколишнє середовище. У водному середовищі виявлено близько 160 фармацевтичних препаратів в межах від нг/л до мкг/л. Найвищі концентрації були зареєстровані для протизапальних засобів, таких як ібупрофен – в басейні р. Дністер концентрація становить 155 нг/л, що в 15,5 рази перевищує прогнозовану концентрацію без ефекту впливу на живі організми (Diamanti et al., 2020), в поверхневих водах Німеччини 17600 нг/л, (Sacher et al., 2008), 120–530 нг/л та 1200–8200 нг/л у стічних водах Канади та Іспанії відповідно (Gagné et al., 2006; Santos et al., 2009); такий же широкий діапазон концентрацій ібупрофену був виявлений у підземних водах у межах від 3 нг/л до 395 нг/л на європейському континенті (Luo et al., 2014); диклофенак – до 10200 нг/л; напроксен – до 59 300 нг/л; для анальгетиків, такі як ацетамінофен (до 584 нг/л) та антибіотиків кларитроміцин – до 616 нг/л; сульфадиметоксин – до 344 нг/л, еритроміцин – до 292 нг/л; левофлоксацин – до 213 нг/л (Patel et al., 2019). Через високу біологічну та фармакокінетичну активність не можна виключати вплив

фармацевтиків на водні організми. Водночас, на відміну від традиційних забруднюючих речовин, фармацевтичні препарати є біологічно активними сполуками із специфічним характером дії, призначеними для взаємодії з певними процесами в організмі. Таким чином, вони представляють клас нових ксенобіотиків, здатних впливати на певні функції живих організмів (ріст, розвиток і розмноження) у концентраціях, що є реальними для навколишнього середовища (LaLone et al., 2014).

Зокрема, протизапальний препарат ібупрофен (Рис. 1.2.1) має високий рівень споживання та низьку швидкість деградації у навколишньому середовищі (Carter and Brown, 2013; Parolini and Binelli, 2012). Річне глобальне споживання ібупрофену оцінюється у понад 10 000 метричних тонн, а його виробництво відповідає декільком кілотоннам (Carter and Brown, 2013). Його виявлено в поверхневих водах у 16 із 31 європейських країн з концентрацією ≥ 100 нг/л. Крім того, у США та Великобританії споживання фармацевтику становить приблизно 300 та 162 тонн на рік відповідно (Parolini and Binelli, 2012; Zhou et al., 2020). Однак, лише 5–15% споживаного ібупрофену може бути метаболізована організмом, а значна його частка (>85%) виводиться з продуктами метаболізму та в кінцевому підсумку потрапляє до очисних споруд (Rainsford, 2009).

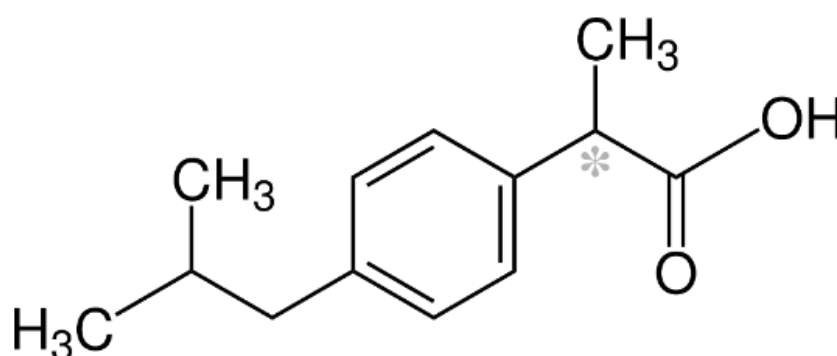


Рис 1.2.1. Хімічна формула Ібупрофену

(<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.3544.html>)

Ібупрофен пригнічує циклооксигеназу, яка перетворює арахідонову кислоту в циклічні ендопероксиди з подальшим утворенням простагландинів і

тромбоксанів, які є медіаторами запалення (Nesckmann et al., 2008). Загалом ейкозаноїди є важливими регуляторами розмноження, як у хребетних, так і в безхребетних (Hayashi et al., 2008), а високий ступінь ліпофільності та низька біодеградація сприяють біоаккумуляції ібупрофену в навколишньому середовищі (Jan-Roblero and Cruz-Maya, 2023).

Токсичність ібупрофену сприяла високій смертності, порушенню розвитку, поведінки та швидкості розмноження, що спостерігалось у багатьох водних організмів (David and Pancharatna, 2009). Щодо впливу ібупрофену на водних безхребетних, варто зазначити, що він є потенційним генератором радикалів та викликає окисний стрес зокрема, у двостулкових молюсків за впливу різних концентрацій ібупрофену в діапазоні від 1 до 10 000 мкг/л, та у *Daphnia magna* під впливом 2,9 мг/л протягом 48 годин (Gómez-Oliván et al., 2014). У молюска *Scrobicularia plana* вплив екологічно реальної концентрації ібупрофену протягом 21 дня викликав біохімічні зміни активності супреоксиддисмутази (SOD) та каталази у зябрах та травній залозі, що вказує на окислювальний стрес та ушкодження ліпідів (Jan-Roblero and Cruz-Maya, 2023)

У *Dreissena polymorpha*, вплив ібупрофену на гемоцити *in vitro* (45, 450 та 900 мкг/л) спричиняв дестабілізацію лізосомальної мембрани та збільшував відсоток апоптичних клітин (Parolini and Binelli, 2012), тоді як за впливу *in vivo* (0,2, 2 та 8 мкг/л) спостерігалась змінена антиоксидантна та детоксикаційна активність ензимів, таких як SOD, глутатіонпероксидаза та глутатіонтрансфераза. Також спостерігали зміни у складі гемолімфи, у двостулкових молюсків *D. polymorpha* і *Ruditapes philippinarum* (Quinn et al., 2011; Aguirre-Martínez et al., 2013). Вплив ібупрофену в концентраціях 2 мкг/л та 4 мкг/л на *D. magna* викликав зміни у морфометричних показниках та репродуктивній здатності організму, а його дія протягом усього життєвого циклу викликала сповільнення росту та розвитку (Wang et al., 2018; Gomez-Oliván et al., 2014). Вплив ібупрофену в концентраціях 1-100 нг/л протягом 7 днів знижував поведінкову активність *Gammarus pulex* (De Lange et al., 2006).

Токсичність ібупрофену поширюється на інших водних тварин, які не є моделями токсичності препарату; наприклад, у африканського сома *Clarias gariepinus*, у якого після впливу концентрації ібупрофену 3 мг/л спостерігалися гістопатологічні деформації зябер, печінки та нирок (Ogunwole et al., 2021).

Слід відзначити, що всі наведені результати вивчення впливу ібупрофену на безхребетні водні організми стосуються здебільшого гостротоксичного впливу препарату без врахування ймовірних взаємодій з іншими несприятливими чинниками середовища. Разом з тим, дослідження сорбції ібупрофену та низки інших фармацевтичних препаратів на МР різної маси у морській та прісній воді показало, що за екологічно реальної концентрації пластику < 1 мг/л ібупрофен зв'язувався з МР з вищою ефективністю у річковій воді з частинками із високою молекулярною масою (коефіцієнт розподілу Ленгмюра 16.0 л/кг завдяки π - π взаємодіям) (Elizalde-Velázquez et al., 2020; Atugoda et al., 2021).

Інша група фармацевтичних препаратів, що набуває дедалі більшого поширення у водоймах – це антибіотики, які широко використовуються у медицині та ветеринарії. Незалежно від виду препарату, та початкової дози, антибіотики надходять у навколишнє середовище з продуктами метаболізму у вигляді вихідної сполуки або у вигляді метаболітів, що призводить до набуття резистентності водних організмів до їх впливу (Bottoni et al., 2010; Kolodziejaska et al., 2013). Зокрема, до них відносять ветеринарні антибіотики-іонофори саліноміцин та його похідне монензин.

Саліноміцин (Рис. 1.2.2.) монокарбоновий поліефірний антибіотик, є важливим представником іонофорних антикокцидних препаратів, що використовують як препарат широкого діпазону дії проти грампозитивних бактерій, грибів та кокцидій, його використовують у ветеринарії в усьому світі, для боротьби зі згубним впливом найпростіших паразитів, особливо кокцидіозу домашньої птиці (Zhou et al., 2019). Саліноміцин діє на різні біологічні мембрани, включаючи цитоплазматичні та мітохондріальні, як моновалентний катіонний іонофор із високою селективністю до лужних іонів та сильною

перевагою для K^+ (Kim et al., 2012), таким чином сприяючи мітохондріальному та цитоплазматичному інгібуванню окисного фосфорилування (Dewangan et al., 2017; Jang et al., 2018). Подібно до нього діє й монокарбоновий поліетерний антибіотик монензин, який демонструє складні серцево-судинні ефекти завдяки транспортуванню Na^+ через біологічні мембрани.

Іонофори також викликають накопичення внутрішньоклітинного Ca^{2+} , що збільшує здатність мітохондрій та плазматичного ретикулуму ефективно секвеструвати кальцій, та, зрештою, також спричиняє загибель клітин (Hajnoczky et al., 2006; Zhivotovsky and Orrenius, 2011). Ці зміни особливо згубні для збудливих клітин нервової тканини, серцевих та скелетних м'язів, а за гостротоксичної дії іонофорів виявляються неврологічні або нервово-м'язові дисфункції у організмі (Story et al., 2004; Zhivotovsky and Orrenius, 2011; Hickey et al., 2020). Гістопатологічні ураження у ссавців та курей включають набряк периферичних нервів, первинну та вторинну дегенерацію аксонів і мієлінових оболонок (фрагментація та втрата аксонів і мієліну), утворення травних камер, заповнених пінистими макрофагами, набряклі клітини Шванна, колапс оболонки аксонів (Boehmerle and Endres, 2011).

Концентрація 0,4 мкМ саліноміцину вивільняє K^+ з мітохондрій, виділених із печінки щура, за умови попереднього стимулювання завантаження K^+ . Таким чином, він може пригнічувати окиснення глутамату, α -кетоглутарату, малату та пірувату. Саліноміцин усуває набряк клітин, що викликаний K^+ стимуляторами, пригнічуючи окисне фосфорилування в мітохондріях без субстратної специфічності. Попередня обробка саліноміцином може запобігти поглинанню K^+ у мітохондріях. Примітно, що саліноміцин блокує мітохондріальну затримку K^+ ефективніше, ніж Na^+ (Hickey et al., 2020).

Саліноміцин також реагує з багатьма іонами двовалентних металів, утворюючи нові похідні, які виявляють підвищену біоактивність:, протигрибкову, антибактеріальну, гербіцидну та протизапальну. Саліноміцин натрію утворив нове похідне з $Co(II)$, $Cu(II)$, $Ni(II)$ або $Zn(II)$, з покращенням антибактеріальної активності, особливо проти грампозитивних бактерій *Bacillus*

cereus. Більш виражену цитотоксичну дію виявляли комплекси з Co(II) та Cu(II) (Dewangan et al., 2017).

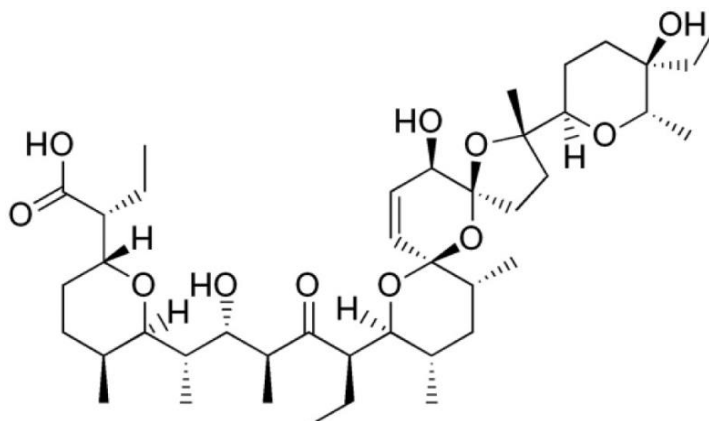


Рис. 1.2.2. Будова саліноміцину (<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.2342058.html>)

Окрім лікувальних цілей поліетерні антибіотики часто використовуються для підвищення ефективності та продуктивності кормів (Vinh et al., 2018), що призводить до збільшення концентрацій у середовищі, а відповідно виявлення цих фармацевтиків у підстилці (0,3–4,5 мг/л) (Varel et al., 2012), ґрунті (0,0004 мкг/кг) (Bak et al., 2013), поверхневих водах (0,01–0,05 мкг/л) (Kim et al., 2006), ґрунтових водах (0,04–0,39 мкг/л) (Watanabe et al., 2008) та седиментах (1,5–31,5 мкг/кг). Вони також транспортуються дощовими стоками з удобрених полів до інших частин навколишнього середовища. У стоковій воді з удобрених полів виявлено до 9022 нг/л саліноміцину (Sun et al., 2013). Також він був виявлений і в річкових водах, прилеглих до сільськогосподарських полів у концентрації 17 нг/л та 7 нг/л у п'яти місцях відбору проб вздовж річки Кеш-ла-Пудр у Північному Колорадо (Kim and Carlson, 2006).

Зважаючи на значну токсичність для тварин, саліноміцин використовували лише як антикоксидний препарат, та стимулятор росту худоби (Vinh et al., 2018; Zhou et al., 2019), у розробці ліків для людини його не застосовували.

У останні роки саліноміцин викликав інтерес у якості протиракового препарату, що посилює ймовірність його використання (Qi et al., 2022).

Зокрема, при лейкемії вплив досить невеликої концентрації саліноміцину на клітини провокував сильну цитотоксичність та апоптичний ефект. Спільна дія тамоксифену та саліноміцину на клітини раку молочної залози викликала додатковий цитотоксичний ефект, та підвищила внутрішньоклітинний рівень кальцію, передчасне злиття ендосом і лізосом, що спонукало до деградації рецепторів естрогену (Sommer et al. 2016). Крім того, залежний від В-клітинної лімфоми 2(Vcl-2) асоційований X-протеїн апоптозу був індукований у мишачих ембріональних фібробластах. Мезенхімальні стромальні клітини послабили апоптотичний ефект саліноміцину в клітинах лімфоми. Змінений потенціал мітохондріальної мембрани спостерігався відразу після лікування саліноміцином (1 мкМ) (Lu et al., 2011; Qi et al., 2022). Проте стосовно людських первинних фібробластів, мезенхімальних стромальних клітин і здорових В-клітин, саліноміцин показав незначну токсичність після збільшення дози. Це дослідження підтверджує прямий вплив саліноміцину на мітохондрії як K^+/H^+ антипортера, що частково пояснює різні ефекти саліноміцину на різні типи ракових клітин, можливо, через особливі метаболічні стани (Qi et al., 2022).

Дослідження *in vitro* показали, що 11 природних поліетерних іонофорів знижують життєздатність клітин у клітинних лініях, індукованих вірусом SARS-CoV-2 (Svenningsen et al., 2021). Досліджено також активність іонофорів при вірусних інфекціях, було виявлено, що *in vitro* саліноміцин пригнічує інфекцію вірусу грипу. Оскільки саліноміцин відповідає за транспорт іонів і викликає зміну рН у клітинах, він також блокує міграцію протеїну вірусу грипу (Jang et al., 2018).

Ця нова сфера використання саліноміцину може сприяти підвищенню його рівня в навколишньому середовищі. Однак його вплив на водні організми майже невідомий, у літературі наявна інформація лише про його присутність у концентрації 14,5 нг/г у двостулкового молюска *Meretrix lusoria*, зібраного поблизу острова Хайлінг у Південному Китаї (Chen et al., 2015).

Взаємодія МР з антибіотиками на прикладі саліноміцину також невідома. Загалом, МР адсорбує різноманітні антибіотики шляхом фізичних взаємодій, наприклад, адсорбуючи ципрофлоксацин через електростатичну та гідрофобну взаємодію (Atugoda et al., 2021), а також тетрацилін, хлортетрацилін та гігроміцин без хімічної взаємодії (Xu et al., 2019; Chen et al., 2021). Також виявлено, що адсорбція тирозину на ПС, в основному, контролюється електростатичними взаємодіями, утворенням поверхневих комплексів і гідрофобними взаємодіями. Крім того, хімічна адсорбція бере участь у взаємодії антибіотиків і МР, таких як офлоксацин і ПВХ, тетрацилін і ПЕ, у яких іонний обмін був основним механізмом, що контролює процес адсорбції (Guo et al. 2019; Yu et al. 2020, Chen et al. 2021). Тому припускають ймовірний синергетичний ефект за поєднаного впливу МР та фармацевтика.

Відтак, враховуючи відносно високу питому поверхню і здатність до проникнення, присутність МР може сприяти інтерналізації фармацевтиків водними організмами через т.з. ефект «троянського коня», який викликає посилення токсичності (Rochman et al., 2014; Brennecke et al., 2016). Загалом, розглядаються різні сценарії спільного впливу МР та ксенобіотиків, потенціюючи (синергізм) або пригнічуючи (антагонізм) їх дію на організм (Lúcia et al., 2021). Значна кількість наявної інформації стосується посилення токсичності. Так, повідомляється про посилений фізіологічний стрес, морфологічні аномалії, іммобілізацію, нейротоксичність, окисне пошкодження, ензимну дисрегуляцію, зниження швидкості росту, генотоксичність та смертність організму за спільного впливу ксенобіотиків у *D. labrax* та *D. magna* (Batel et al., 2016; Kim et al. 2017; Guilhermino et al., 2018; Barboza et al., 2018). За поєднаного впливу МР та фармацевтичного препарату флорфеніколу було виявлено пригнічення харчової активності двостулкового молюска *Corbicula fluminea*, який був більш вираженим за присутності МР. За поодинокого впливу ксенобіотиків такої відповіді організму не спостерігали (Guilhermino et al., 2018).

Спільна дія фармацевтичного препарату сертраліну та МР двох розмірів (діаметр 500 нм і 3 мкм), значно пригнічували імунну відповідь *Tegillarca granosa*, що проявлялася як низка фізіологічних та молекулярних змін (Santos et al., 2020). Спільна дія венлафаксину, або його метаболіту Одесметилвенлафаксину з МР збільшував активність SOD у в'юна *Misgurnus anguillicaudatus*, у 3 рази та вище, схожий ефект спостерігали і за спільного впливу рокситроміцину та частинок ПС на *D. magna*. (Zhou, et al., 2019; Qu et al., 2019).

Токсичність суміші МР та фармацевтиків залежить від розмірів частинок. Так, за спільної дії токсикантів спостерігався очевидний синергетичний імунотоксичний ефект як сертраліну так і МР, що вказує на залежну від розміру взаємодію між ксенобіотиками. Як повідомляється, більшість МР великого розміру можна вилучити з організму, тоді як менші за розміром триваліше зберігаються у тканинах (Kim et al. 2017; Wen et al. 2018; Santos et al., 2020). При цьому, МР малих розмірів має значно більшу питому поверхню та може переносити більшу кількість забруднюючих речовин і, таким чином, призводить до вищої токсичності. (Zhou, et al., 2019; Qu et al., 2019).

Крім того, МР у навколишньому середовищі зазнає низки перетворень, що призводить до можливого вивільнення у навколишнє середовище пластикових доданків із біотоксичністю та утворення вторинних забруднювачів (Li et al., 2022). Така деградація частинок МР доповнює токсичність впливу комплексів МР – забруднювач. Оскільки водні забруднювачі, головним чином, поглинаються водними тваринами через пасивний трансмембранний транспорт зябрами під час дихання та фільтраційного харчування (Stott et al., 2015), будь-яке пошкодження зябрової мембрани полегшує забруднювачам проникнення у м'які тканини організму. Таким чином, накопичення антибіотиків може бути результатом посиленого надходження за поєднання з МР (Kraemer et al., 2019).

Отже, обидва типи розглянутих нами поширених у водоймах фармацевтичних препаратів, нестероїдні протизапальні препарати та антибіотики, становлять загрозу для водних тварин. Разом з тим, результати

лабораторних експериментів за їх окремого впливу не дають уявлення про їх екотоксичність у реальній водоймі, зокрема внаслідок взаємодії з присутнім в ній МР. Тому, актуальним є створення модельних схем дослідження поєданого впливу таких пріоритетних фармацевтиків – забруднювачів, як ібупрофен та саліноміцин з МР та пошук чутливих реакцій організму-біоіндикатора, які дозволять оцінити наявність взаємного впливу фармацевтиків та МР і його характер.

1.3. Біохімічні маркери двостулкових молюсків

Біомоніторинг водного середовища та оцінка стану екосистеми відіграють важливу роль у розробці ефективних стратегій захисту навколишнього середовища. Двостулкові молюски використовуються, як біоіндикатори для оцінки стану навколишнього середовища. Вони є фільтруючими організмами з широким географічним поширенням та обмеженою здатністю до пересування (Li et al., 2018b; Khoma et al., 2020; Cho et al., 2021). Організми молюсків можуть реагувати на вплив великої кількості різноманітних хімічних забруднювачів, навіть, якщо вони присутні у досить малих концентраціях. Вони також здатні концентрувати ксенобіотики (Oliver et al., 2001). Крім того, молюски поширені у значній кількості в морях, річках та озерах, де відбувається значний контакт людини з водним середовищем (Pain-Devin et al., 2014; Breitwieser et al., 2016; Khoma et al., 2020).

Біомаркери експозиції (тобто рівні акумульованого ксенобіотика), ефекту (ранні, або хронічні зміни в організмі) та чутливості (особливостей реакції залежно від преадаптації організму) широко використовуються в останні кілька десятиліть для оцінки стану навколишнього середовища (Nordberg, 2010; Campos et al., 2012). Зокрема спостерігається значний інтерес до використання біохімічних біомаркерів двостулкових молюсків, які можуть забезпечити інформацію про те, як ці організми взаємодіють із ксенобіотиками, що знаходяться у навколишньому середовищі (Breitwieser et al., 2016).

Відповідно до типу відповіді організму на конкретні класи забруднювачів, вирізняють специфічні біохімічні маркери детоксикації, до яких належать молекули, що забезпечують зв'язування ксенобіотиків у менш токсичні сполуки, зокрема хелатування токсичних металів металотіонеїнами (Столяр та ін., 2016), біотрансформації органічних гідрофобних молекул, таких як поліароматичні вуглеводні та поліхлоровані біфеніли з утворенням частково окиснених похідних та їх кон'югація та елімінація. Особливий інтерес у цьому відношенні становить активність ензимів, які беруть участь у детоксикації ксенобіотиків, таких як система цитохрому P-450 і глутатіон-S-трансферази (Anacleto et al., 2015). Ступінь ураження організму характеризують за показниками гено- та цитотоксичності, до яких відносяться розриви ланцюгів ДНК, інгібування ацетилхолінестерази, перекисне окиснення ліпідів, пов'язане з окислювальними порушеннями, особливо в клітинних мембранах, багатих поліненасиченими ліпідами (Turja et al., 2014).

Разом з тим, аналіз реакцій біомаркерів на комплексне забруднення виявляє, що їх специфічна реакція проявляється у певному діапазоні впливу пошкоджуючого чинника або залежно від адаптивної здатності організму, сформованої у природному біотопі, тобто залежить від здатності організму до сприйняття пошкоджуючого впливу (Столяр та ін., 2016; Khoma et al., 2020; Gnatyshyna et al., 2020).

Цю тезу ілюструють результати дослідження металотіонеїнів як поліфункціональних внутрішньоклітинних протеїнів за впливу їх специфічних індукторів та низки інших пошкоджуючих факторів середовища. Металотіонеїни – це група металопропротеїнів, що характеризуються малим розміром, високим вмістом цистеїну та відсутністю дисульфідних зв'язків і ароматичних амінокислот. Вони були виділені та вивчені в багатьох організмах, включаючи прокаріоти, рослини та тварини (Coyle et al., 2002; Duncan and Stillman 2007; Torreggiani et al., 2010; Carpenè, et al., 2011). Металотіонеїни відіграють важливу роль у процесах клітинного захисту від дії шкідливих агентів (метали, вільні радикали тощо), а також у механізмах контролю

диференціації, росту та проліферації клітин, відповідно до їх ядерної чи цитоплазматичної локалізації (Dziegiel, 2004).

Будова металотіонеїнів висококонсервативна. Здебільшого молекула складається з 61–68 амінокислот (Vasak, 2005), що укладають специфічний поліпептидний ланцюг, у якому залишки Cys організовані в послідовності Cys-X-Cys, Cys-X-X-Cys і Cys-Cys, де «X» – амінокислота, що відрізняється від Cys (Isani et al., 2003; Dziegiel et al., 2016). Залишки Cys утворюють металозв'язуючі домени молекули металотіонеїну в яких вони розташовані поруч з аргініном (Arg) та лізином (Lys) і розміщені у двох сайтах, багатих на тіоли – α і β домени (Рис. 1.3.1). Два домени, які зв'язують метал, розділені послідовністю, яка не містить цистеїн (спейсер або лінкер) (Zangger et al., 2001; Vabula et al., 2012) α -домен складається з 11 залишків цистеїну і розташований на С-кінцевому краю, тоді як N-кінцевий β -домен містить дев'ять залишків цистеїну (Zangger et al., 2001; Dziegiel, 2004).

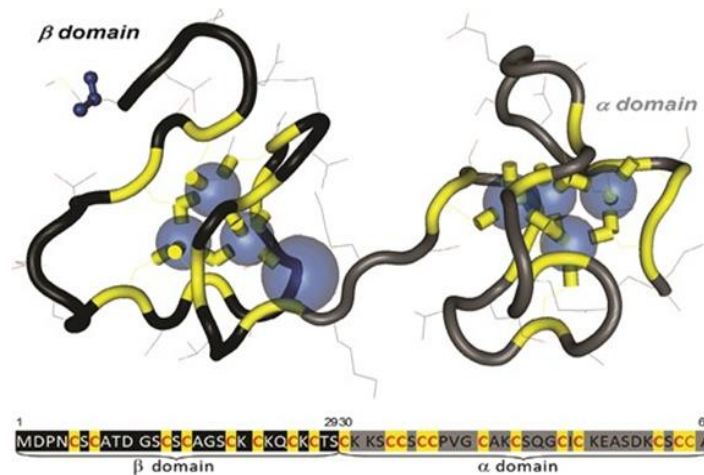


Рис. 1.3.1. Схема структури α і β домену металотіонеїну на основі даних бази даних ExPASy (www.expasy.ch).

Кожен домен містить «ядро», оточене двома великими спіральними витками поліпептидного ланцюга. N-кінцевий β -домен зв'язує три іони двовалентних металів. С-кінцевий домен α зв'язує чотири двовалентні іони, цинк переважно розташований у β -домени, а кадмій – у α -домени. Таким чином, β -домен регулює гомеостаз цинку та міді, тоді як α домен може відігравати центральну роль у детоксикації важких металів. Вільно структурований β -

домен відповідає за димеризацію металевих містків, тоді як α -домен бере участь в окислювальній димеризації. (Zhou et al., 2000; Coyle et al., 2002; Duncan et al., 2007).

Металотіонеїни молюсків належать до I класу разом із металотіонеїнами хребетних і ракоподібних. В середньому металотіонеїни молюсків містять приблизно 70 амінокислотних залишків. У порівнянні з ссавцями, металотіонеїни молюсків зазвичай мають вищий вміст гліцину ($\approx 15\%$), розподіленого по всій послідовності. Попри відмінності, металотіонеїни молюсків, ймовірно, більш тісно пов'язані з металотіонеїнами хребетних ніж безхребетних (Isani et al., 2003; Vergani, 2009).

Дві основні групи металотіонеїнів, MT-10 і MT-20, були ідентифіковані в родині *Mytilidae* (Soazig and Marc, 2003; Aceto et al., 2011). Металотіонеїни мідій *D. polymorpha* і *Mytilus edulis* демонструють канонічну α , β -доменну структуру, типову для більшості металотіонеїнів (Soazig and Marc, 2003). Прісноводний молюск *D. polymorpha* експресує лише одну ізоформу, тоді як в морських мідій *M. edulis* було знайдено до дев'яти ізоформ металотіонеїнів, що були класифіковані за двома багатоконпонентними сімействами генів (Dondero et al., 2005; Grattarola et al., 2006), які демонструють різну експресію за впливу важких металів (Aceto et al., 2011). Ці металотіонеїни, названі MT-10 і MT-20, містять 72 і 71 амінокислоту (21 та 23 залишків цистеїну відповідно). Додатковий цистеїн у MT-20 може брати участь у міжмолекулярному містку між двома мономерними субодинацями. Повідомляється про додатковий короткий ген MT-10 у *M. edulis* і *M. galloprovincialis* (Leignel et al., 2005). MT-10 експресується конститутивно, тоді як MT-20 присутній у дуже низькій концентрації у фізіологічних умовах (Serra et al., 1999; Isani et al., 2003).

MT-20 містить два додаткових Cys і ще один Lys порівняно з MT-10. Більша кількість заряджених залишків у MT-20 порівняно з MT-10 (12 проти 9) пояснює вищу ізоелектричну точку першого. MT-20 має вищий гідропатичний індекс порівняно з MT-10 (0,250 проти 0,199), що свідчить про жорсткішу структуру (Isani et al., 2003; Vergani, 2009). Як зазначалося вище, гідропатичний

індекс зазвичай позитивний у металотіонеїнів ссавців, тоді як є негативним у металотіонеїнів риб. Позитивний гідропатичний індекс означає, що металотіонеїни мідій більше гідрофобні та менш гнучкі ніж аналоги риб тому більше нагадують металотіонеїни ссавців, ніж риб (Vergani, 2009). Важливою особливістю обох ізоформ мідій є відсутність сегмента подвійного лізину, що з'єднує α з β -доменом, що характерно для металотіонеїнів хребетних, включаючи риб.

У *Mytilus spp.* у фізіологічних умовах транскрипти MT-10 є більш поширеними, ніж транскрипти MT-20, а транскрипція цих двох ізоформ диференційовано регулюється металами. У той час, як MT-10 індукується як есенціальними, так і токсичними іонами металів, MT-20 в основному реагує на кадмій і ртуть. У прісноводних і морських мідіях вплив мікромольних концентрацій цинку призводить до підвищення його рівня в різних тканинах, що не супроводжується відповідною індукцією експресії гена металотіонеїну (Isani et al., 2003; Maret et al., 2008; Aceto et al., 2011). Разом з тим, металотіонеїни молюсків також мають нетрадиційні особливості. Докази зв'язування металів протеїнами з низькою молекулярною масою у молюсків були зареєстровані у черевоногих *Patella vulgata* (Isani and Carpenè, 2014), у двостулкових молюсків *M. edulis* (Gupta and Singh, 2011), *M. Galloprovincialis*, *Crassostrea virginica* (Jenny et al., 2016). На відміну від хребетних, механізми експресії гена металотіонеїнів у безхребетних є недостатньо вивчені. З отриманих даних можна зробити висновок, що металотіонеїни молюсків демонструють різноманітність структур, зокрема можуть мати як α - β -доменну, так і β - α -доменну послідовність у структурі (Isani and Carpenè, 2014).

Маючи високу спорідненість з перехідними металами, металотіонеїни можуть зв'язувати їх для забезпечення захисту від токсичності (Klaassen et al., 2009). Вони вибірково зв'язують іони металів: необхідні для життєдіяльності мікроелементи Цинк (Zn) і Купрум (Cu) та потенційно токсичні елементи Кадмій (Cd) і Ртуть (Hg) (Colvin et al. 2010). Більше того, відомо про індукцію металотіонеїнів в мідіях після впливу металу, зокрема у *P. viridis* (Nicholson et

al., 2003) та м'яких тканинах, зябрах та травній залозі моллюска *R. decussatus* (Bebiano et al., 2004).

З огляду на високий вміст цистеїну у складі металотіонеїнів припускають, що ці унікальні протеїни відіграють важливу роль у окисно-відновному клітинному метаболізмі завдяки окисно-відновній активності їх цинк-тіолатних груп та вільних тіолів у апо-формі (Isani and Carpenè, 2014; Krężel and Maret, 2021). Протеїни локалізовані в цитоплазмі та деяких органелах, переважно в мітохондріях, де їх присутність чутливо регулюється окисним станом, індукованим мітохондріальним диханням та регуляцією виробництва АФК у мітохондріях (Futakawa et al., 2006; Lindeque et al., 2010). Крім того, вони беруть участь у регуляції проникності внутрішньої мітохондріальної мембрани. Металотіонеїни через пори у зовнішньої мембрани мітохондрій, які пропускають молекули до 10 кДа, можуть транспортуватися до цитоплазми та інших цільових органел – лізосом. Наявність металотіонеїнів також пов'язана з лізосомальними змінами та загибеллю клітин у нейронах під час окисного стресу (Lee et al., 2010). Залежно від стану клітини, особливо за наявності окисного стресу, металотіонеїни швидко переміщуються до ядра через ядерно-порові комплекси, окиснюються там та транспортуються у цитозоль (Lindeque et al., 2010).

Така легка здатність до окиснення у різних клітинних компартментах дозволяє висловити припущення, що металотіонеїни захищають клітини від вільних радикалів кисню, що пов'язано з функціонуванням клітини, особливо мітохондріальною системою транспорту електронів і НАДФН-оксидазою в лейкоцитах та макрофагах. Відтак, ймовірно, вони захищають від вільних радикалів біомолекули, включно з ДНК, протеїнами та поліненасиченими жирнокислотними радикалами клітинних мембран (Chiaverini et al., 2010; Kadota et al., 2010).

На користь таких припущень свідчить, що у водних організмів, які піддаються впливу забруднення, відмінного від токсичних металів, спостерігалася індукція біосинтезу металотіонеїнів у певних тканинах,

особливо в тканині травної залози. Ймовірно, цей факт пов'язаний з активацією ролі металотіонеїнів у водних організмах у захисті від про-оксидантів (Atif et al., 2006; Peyrot et al., 2009).

Металотіонеїни та глутатіон є переносниками цинку до апопротеїнів для утворення функціональних протеїнів цинку, тим самим регулюючи клітинні процеси за участю цинку (Nathout et al., 2001). Цинк входить до складу активного центру ензимів, є інгібітором деяких ензимів, таких як: гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа, каспаза-3, фруктозо-1,6-дифосфатаза, альдегіддегідрогеназа, тирозинфосфатаза та дріжджова енолаза. Додавання апотіонеїнів може відновити їхню ензиматичну активність, тим самим діючи, як хелатуючий агент, який видаляє та секвеструє цинк з інгібованих ензимів (Maret et al., 1999; Zalewska, Trefon, and Milnerowicz, 2014). У процесі транспорту іонів цинку металотіонеїни взаємодіють з окисненою формою глутатіону (GSSG) для вивільнення цинку. Зв'язані з металом тіолати кожного домену беруть участь у тіол/дисульфідному обміні з GSSG, у якому початкова взаємодія призводить до руйнування кластерів і вивільнення цинку. Оскільки GSSG та відновлена форма глутатіону (GSH), представляють близько 90% клітинного, непротеїнового сульфур, пара GSH/GSSG є головним визначальним фактором тіолатної буферної системи. У реакціях перенесення цинку металотіонеїнами сім атомів цинку нерівноцінні, принаймні один із них має більшу ймовірність перенесення ніж інші атоми (Maret et al., 1999; Bashir et al., 2015; Sasoni et al., 2022).

Наведена інформація свідчить про поліфункціональність металотіонеїнів, що робить їх перспективними біомаркерами не лише у традиційному аспекті, як індукцйбельні токсичними металами протеїни, але і як складники низькомолекулярного тіолому, що спільно з глутатіоном забезпечують редокс-потенціал у клітинах. Більше того, аналіз функціональної активності металотіонеїнів є перспективним у оцінці ефективності системи антиоксидантного захисту, клітинних протеаз, таких як каспаза-3, та функціонування клітинних органел, зокрема лізосом.

Підсумок до розділу

Відтак, наявна інформація про вплив МР на водні організми стосується переважно досліджень на морських організмах та за поодинокого впливу, тоді як прогноз екологічно реального впливу на прісноводні організми-біоіндикатори вимагає створення схем комбінованої дії з іншими складниками забруднення. Завдяки гідрофобній природі, фармацевтичні препарати водного середовища становлять інтерес для оцінки впливу МР як гіпотетичного вектора ксенобіотиків водного середовища. Серед ймовірних біоіндикаторів впливу, вартими особливої уваги видаються характеристики метаболізму цинку як поліфункціонального регулятора біологічних функцій, опосередкованого зв'язуванням зі специфічними клітинними тілами. Відсутність відомостей про ці аспекти впливу МР на водні організми посилює аргументацію такого дослідження.

РОЗДІЛ II МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Відбір дослідних груп тварин та хімічний аналіз води

Для проведення досліджень з природних водойм відбирали двостулкових молюсків родини *Unionidae*, перлівницю *U. tumidus* (Philipson et al., 1788) із середньою довжиною мушлі 9,2-9,4 см та масою 67-84 г. Для відбору організмів використовували дві місцевості, референтну (Pr) та антропогенно навантажену (St), які визначали за характеристиками розташування.

У лабораторних умовах було проведено три серії експериментальних досліджень:

I. Дослідження акумуляції МР в організмі двостулкового молюска *U. tumidus* за впливу частинок ПЕТ розміром 0,1-0,5 мм.

II. Дослідження впливу на організм двостулкового молюска мікропластику, ПЕТ розміром 0,1 – 0,5 мм, фармацевтичного препарату ібупрофену та їх суміші. Для оцінки залежності реакції організму від стадії загального адаптаційного синдрому, сформованого у певній популяції, із порівнянням відповіді організмів із двох популяцій.

III. Дослідження впливу на організм двостулкового молюска мікропластику полістиролу розміром 2 мкм та саліноміцину поліетерного іоноформного антибіотику окремо та у суміші за двох температурних режимів (18°C та 25°C).

Для усіх серій дослідження, молюсків відбирали в кінці літа з ділянок, розташованих в басейнах двох окремих річок на Заході України (Рис.2.1.1).

Ділянка на р. Случ (басейн р. Прип'ять) була класифікована, як референтна через своє розташування у верхів'ї річки (с. Червоний Случ, близько 100 жителів, 49 41' 53" пн.ш., 26°20' 45"E), де немає промислових чи побутових забруднень через малу площу дренажу. Відрізок в середній частині р. Нічлава, басейн р. Дністер (с. Чорнокінці, близько 1000 жителів, 48 58'12" пн.ш. 26°01'48" E), було ідентифіковано як антропогенно навантажене місце, що знаходиться у частині річки порівняно великою площею водозбору близько 50 населених пунктів з добре розвиненою сільськогосподарською діяльністю.

Зазначена річка – одна з найбільш забруднених приток р. Дністра в середній течії за даними в регіонального управління Держводгоспу (водгосп, 2005 <https://www.vodgosp.te.ua/water-resources.html>).

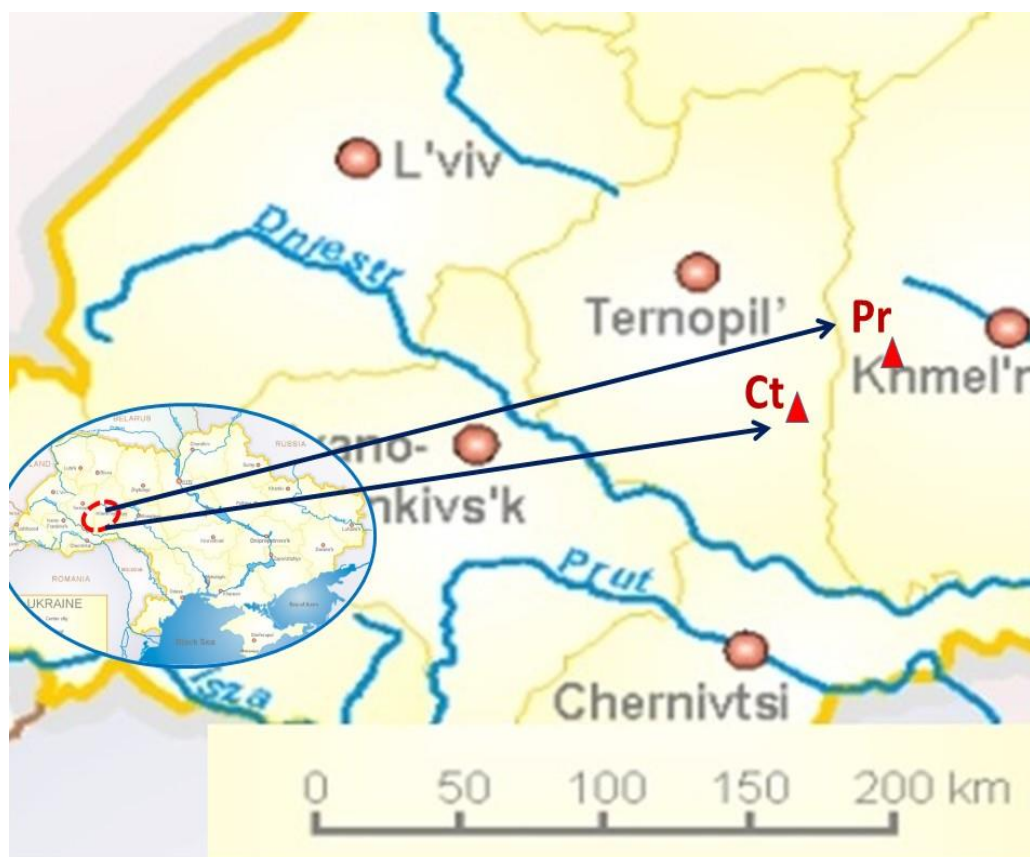


Рис. 2.1.1. Розташування місць відбору проб: референтна ділянка, р. Случ (Pr); антропогенно навантажена ділянка, р. Нічлава (Ct) Західна Україна. Використовувалися карти: <https://gameo.org/index.php?title=File:Map-of-Ukraine-political-enwiki.jpg> та <https://www.mapsland.com/maps/europe/ukraine/detailed-rivers-map-of-ukraine-in-ukrainian.jpg>.

Моллюсків відбирали траловим методом на глибині ≈ 1 м. З місць відбору екземпляри транспортували у лабораторію в резервуарах об'ємом 25 л, з аерованою нативною водою та акліматизували до лабораторних умов протягом 7 днів у резервуарах заповненими аерованою дехлорованою пом'якшеною водопровідною водою (температура $18 \pm 1^\circ\text{C}$, рівень CaCO_3 $86,8 \pm 1,0$ мг/л, рівень розчиненого кисню $8,67 \pm 0,51$ мг/л, рН $7,3 \pm 0,2$, $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ та NO_2^- нижче 0,1 мг/л) із заміною води щодобово.

Експозиція тривала 14 діб, зміна води та поновлення вмісту у ній речовин відбувалося кожні дві доби.

У першій серії досліджень визначали здатність організму двостулкового молюска акумулювати частинки ПЕТ з середовища. Для цього двостулкових молюсків з антропогенно навантаженої території після адаптаційного періоду поміщали у резервуари, наповненні водою об'ємом 25 л, та додавали МР у вигляді порошку ПЕТ концентрацією 1 мг/л розміром 0,1-0,5 мм. Контрольними були організми які були дослідженими після адаптаційного періоду (0 день експерименту).

У другій серії досліджень вивчали вплив МР та ібупрофену окремо та у суміші на перлівницю з двох популяцій, що відрізнялись за якістю середовища існування. Для цього двостулкових молюсків з двох місцевостей, референтної ділянки, р. Случ та антропогенно навантаженої ділянки, р. Нічлава після адаптаційного періоду рівномірно розділяли на групи по 12 особин у резервуари наповненні водою об'ємом 25 л, та додавали у воду наступні речовини: мікропластик (МР) (ПЕТ 1 мг/л розміром 0,1-0,5 мм, що відповідає \approx 850 частинок у 1 л води), ібупрофен (ІВУ) (фармацевтичної якості концентрацією 8 мкг/л (3,9 нМ), Борщагівський ХФЗ) окремо та у суміші (Міх), одну групу залишали без впливу ксенобіотиків та вважали контрольною (С). Згідно з новою класифікацією за розміром обрані частинки 0,1-0,5 мм належать до мезопластику (Bermúdez and Swarzenski, 2021). Саме такий розмір частинок та його концентрація властиві для прісних вод. Зокрема, у Туреччині концентрація МР становить від 0,01 - 28,21 часток/м³, р. Дунай – 4,8 - 24,8 мг на 1000 м³ (розмір частинок < 500 мкм). у р. Сена – від 0,28 до 0,47 часток/м³ (розмір менше 330 мкм) (Barnes et al., 2009; Gündoğdu et al., 2023). Аналіз частинок пластику з одинадцяти очисних споруд Китаю показав, що домінантними видами полімерів була віскоза та ПЕТ з найвищою кількістю МР розміром < 0,5 і < 2 мм, із діапазоном концентрацій від $911,57 \pm 199,73$ до $3395,27 \pm 707,22$ часток/м³ (Xu et al., 2019; Zhou et al., 2020). Фармацевтичний препарат ібупрофен виявлений у прісних водах Іспанії у концентрації 12 - 17

нг/л, а у р. Дністер його концентрація становить ≈ 155 нг/л¹. (Boleda et al., 2014; Zhou et al., 2019; Diamanti et al., 2020).

У третій дослідній серії вивчали дію МР полістиролу (Sigma Aldrich) розміром 2 мкм та саліноміцину окремо та у суміші за двох температурних режимів на двостулкових молюсків *U. tumidus* з антропогенно модифікованої популяції. Для цього, молюсків після періоду адаптації до лабораторних умов розділили на п'ять груп по 12 особин у резервуари об'ємом 25 л, наповнених аерованою водою (показники води підтримувались у вищевказаних межах), та додавали наступні речовини: мікрокульки полістиролу (МР) розміром 2 мкм концентрацією 1 мг/л, що відповідає $2,4 \cdot 10^8$ частинок/л, саліноміцин (Sal) концентрацією 6 мкг/л, що відповідає 0,11 нМ, поодинокі та у суміші за двох температурних режимів 18°C (Міх) та 25°C (МіхТ) (температуру підвищували поступово протягом 24 год). Одну групу не піддавали впливу ксенобіотиків та вважали контрольною (С).

Обрана концентрація МР малого розміру була вищою, ніж у природних водах. За даними літератури, вміст МР полістиролу розміром 2-20 мкм у водоймах Кореї становив 33,61-202,07 частинок/л, а у питній воді Фландрії вміст частинок розміром 1– 50 мкм становили в 3,76 - 5,59 частинок/л (Lee et al., 2019; Semmougi et al., 2022;). Загалом МР малого розміру у природних водах не ідентифікується у зв'язку з технічними складнощами, проте можна очікувати, що його вміст за кількістю частинок є значно вищим, ніж вміст мезопластику (Beiras and Schönemann, 2020). Обрання концентрації саліноміцину було зумовлено інформацією про його вміст у природних водах. Так, високий рівень саліноміцину було виявлено в Аргентині у колекторах з низьким тиском води, які є прямими реципієнтами фекалій та стоків - 1150 нг/л¹, а його рівень у регіональних притоках сягав 187 нг/л (Alonso et al., 2019). У підземних водах Ірландії концентрація саліноміцину становить $\approx 9,8$ нг/л (Mooney et al., 2020).

Відтак, концентрації ксенобіотиків та розмір частинок МР у всіх дослідних серіях відповідали їх характеристикам у природних водоймах. Температурний режим 25°C відповідав встановленим екстремальним

показникам для прісних водойм у досліджуваній місцевості у літній час (<https://ukr.seatemperature.net/zaraz/ukraine/dnestrovskiiy-kanon-ukraine-sea-temperature>).

У всіх дослідних серіях протягом експозиції смертність молюсків не спостерігалась. Після інкубації тварин умертвляли, з подальшим відбором тканин для аналізу. Тканину для подальших досліджень зберігали у морозильній камері при температурі -40°C .

Показники вивчали у тканині травної залози, оскільки вона виконує ключову роль у метаболізмі та накопичені токсикантів (Kostić et al., 2017; Faggio et al., 2018). Тканину подрібнювали за допомогою електричного гомогенізатора Поттера. Для всіх досліджень тканину травної залози гомогенізували з фенілметилсульфонілфторидом (ФМСФ) (0,1 мМ) для попередження протеолізу. Відбір зразків тканини та проведення досліджень відбувалося на холоді. Для кожної дослідної групи кількість зразків становила 8, що забезпечує статично коректні результати.

При проведенні досліджень використовувались реактиви від компаній Sigma-Aldrich (США) або Синбіас (Україна) за ступенем чистоти Reagent (реактивної чистоти) та вище. Світлопоглинання вимірювали за допомогою спектрофотометра UV/Vis ULAB 102UV.

Хімічний аналіз води

У воді із водойм визначали наступні характеристики: окиснюваність, рН, твердість, вміст фенолів, фосфатів, аміаку, використовуючи загальноприйняті методики.

Порівняння хімічного складу води за стандартним набором показників у різних досліджуваних ділянках водойм показало певні відмінності між ділянками з двох місцевостей що пов'язано із географічними параметрами та не відбивають особливостей антропогенного навантаження і не перевищують (за виключенням вмісту сульфатів) встановлені норми для захисту життя водних організмів (Табл. 2.1.1).

Таблиця 2.1.1.

Хімічний аналіз води, $M \pm SD$, $n=3$

<i>Показники</i>	<i>р. Нічлава (St)</i>	<i>р. Случ (Pr)</i>
рН	8,10±0,05	8,22±0,05
Амоній, мг/л	1,71±0,18 ^a	0,76±0,14
Нітрит-йон, мг/л	0,01±0,00 ^a	0,03±0,01
Нітрат-йон, мг/л	12,14±0,38	14,03±0,74
Фосфати, мкМ	1,83±0,01 ^a	3,49±0,03
Хлорид-йон, мг/л	47,51±5,01 ^a	24,82±3,01
Фенол, мкг/л	0,10±0,01 ^a	0,18±0,02
Сульфати, мг/л	456,0±16,9 [*]	407,4±26,5 [*]
Загальна твердість води, мМ	14,0±0,1 ^a	7,50±0,35
Розчинений кисень, мг O ₂ /л	6,63±0,13	5,67±0,15
Окиснюваність, мг O ₂ /л	7,24±0,06	8,44±0,06
Сухий залишок, мг/л	593±20,2 ^a	339±32,5

Примітка: ^a – статистично значущі відмінності між ділянками, $p < 0,05$; *, середнє значення яке перевищує максимально допустиму концентрацію, дозволена для оптимальної життєдіяльності прісноводних організмів (http://water.epa.gov/scitech/swguidance/standards/criteria/current/upload/2009_01_13_criteria)

2.2. Аналіз акумуляції мікропластику в організмі молюска

Для проведення дослідження МР готували з ПЕТ – пляшок шляхом подрібнення лезом з нержавіючої сталі. Після цього подрібнений пластик просіювали за допомогою сит з розміром пор 0,1 і 0,5 мм. Отриманий порошок розміром 0,1-0,5 мм додавали в акваріуми, концентрацією МР 1,0 мг/л, що відповідало ≈ 850 частинок/л у середньому.

Для оцінки кількості частинок у кожному зразку, використовували модифікований метод з використанням гідроксидом калію та перекисом водню для омилення жирів та розщеплення тканин (Rochman et al., 2015). Додавали 10

мл 1 моль/л КОН і 5 мл додецилсульфату натрію (0,5% мас./об.) на грам м'якої тканини моллюска у склянці потрібного об'єму, накритій алюмінієвою фольгою. Склянку поміщали на водяну баню на 24 години при температурі 50°C, протягом цього часу склянку кілька разів обережно струшували. Після 24-годинної інкубації, вміст фільтрували через мембранний та целюлозний фільтри. Після цього фільтри поміщали назад у вихідний стакан для окислення перекисом за стандартними процедурами (Masura et al., 2015) для перетравлення будь-якого залишку органічного матеріалу. Частинки пластику фарбували барвником Ніл червоний (Nile red) у концентрації 10 мкг/мл, як розчинник використовували 10% диметилсульфоксид (Kaile et al., 2020), із подальшим дослідженням під світловим мікроскопом

2.3. Виділення та визначення вмісту металотіонеїнів

Виділення металотіонеїнів проводили шляхом двоступінчастої хроматографії розчину термостабільних сполук, які отримували з 10% гомогенату в 10 мМ Трис-НСІ буфері рН 8,0, для запобігання окиснення SH-груп (Roesijadi and Fowler, 1991; Coyle et al., 2002), додавали 10 мМ 2-меркаптоетанол та інгібітор протеаз ФМСФ (0,1 мМ). Гомогенат готували з рівних об'єднаних наважок травної залози з восьми тварин групи, з подальшим центрифугуванням - 45 хв, при 16000 об./хв. та 4°C. Надосадову рідину, отриману після центрифугування, піддавали впливу температури 85°C протягом 5 хв із повторним центрифугуванням у вищезазначених умовах.

Отриманий надосад, який містить розчинні термостабільні сполуки, піддавали гель-розподільчій хроматографії на Сефадексі G-50. Хроматографію здійснювали у 0,01 М Трис-НСІ буфері, рН 8,0 на колонці з холодильним кожухом розміром 30×1,5 см зі швидкістю 0,33 мл/хв, з отриманням 20 фракцій об'ємом 5 мл. Для попередження втрат металів, зв'язаних з протеїнами, в елюент не додавали динатрієву сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти (ЕДТА). Оптичну густину отриманих проб вимірювали на спектрофотометрі ULAB 102UV при довжині хвилі 254 і 280 нм (D_{254} і D_{280}). Калібрування

хроматографічної колонки здійснювали з допомогою протеїнів з відомою молекулярною масою – сироваткового альбуміну (66,0 кДа), хемотрипсину (25,8 кДа), цитохрому с (12,3 кДа) та інсуліну (5,8 кДа). Металотіонеїни ідентифікували, як низькомолекулярні термостабільні протеїни з найвищим показником співвідношення світлопоглинання D_{254}/D_{280} (Roesijadi and Fowler, 1991). Об'єднану фракцію об'ємом 10 мл відбирали для реєстрації УФ-спектру із наступним визначенням вмісту цинку.

Вміст протеїну металотіонеїну (MTSH) оцінювали за вмістом тіолових груп за методом Viarengo та ін. (1999). Принцип методу: взаємодія SH-груп з 5,5'-дитіо-біс-2-нітробензойною кислотою (ДТНБ) з утворенням 5-тіо-2-нітробензойної кислоти. Для цього готували 30% гомогенат у 20 мМ Трисахарозному буфері, рН 8,6 з додаванням суміші інгібіторів протеаз 0,01% β -меркаптоетанолу, 0,006 мМ лейпептину 0,5 мМ ФМСФ. Отриману суміш центрифугували 12000 об/хв, 4°C протягом 45 хв. Екстракцію металотіонеїнів з отриманого супернатанта проводили сумішшю охолодженого етанолу та хлороформу з подальшим центрифугуванням. Світлопоглинання вимірювали при 412 нм. Вміст MTSH розраховували з використанням молярного коефіцієнта екстинкції 5-тіо-2-нітробензоату ($\epsilon=14150 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) та враховуючи молекулярні характеристики металотіонеїну *U. tumidus* (<https://www.uniprot.org/uniprot/A4UHT8>), для якого кількість залишків цистеїну становить 21, а молекулярна маса - 7,090 Da, та виражали в нмоль $\cdot \text{г}^{-1}$ та мкг $\cdot \text{г}^{-1}$ вологої маси тканини (Nielsen and Winge, 1985).

2.4. Визначення вмісту металів у тканині та металотіонеїнах

Концентрацію цинку визначали у тканині травної залози та в елюаті, що містить металотіонеїни, отриманому під час хроматографії (об'ємом 10 мл). Концентрацію цинку визначали спектрофотометрично за вимірюванням оптичної густини продукту комплексоутворенням 2-(5-бром)-2-піридилазо)-5-[N-пропіл-N-(3-сульфопропіл) аміно] фенолу динатрієвої солі дигідрату (5-Br-PAPS) з Zn(II) при 550 нм (Karaman and Menek, 2012; Wang et al., 2018). Щоб

перешкодити можливому розкладанні 5-Br-PAPS у розчинах з $\text{pH} \leq 5$ (Karaman and Menek, 2012), кислотність дослідного зразка була в діапазоні pH 5–11. Наважку тканини масою 0,1 г та елюат об'ємом 10 мл висушували при 105°C , після чого розчиняли у нітратній кислоті з подальшим випарюванням до отримання золи. Отриману золу розчиняли в 1 мл 1% розчині трихлороцтової кислоти. До отриманого розчину додавали 5-Br-PAPS у 200 мМ бікарбонатному буфері (pH 8,0) у кінцевій концентрації 36 нМ. Суміш кінцевим об'ємом 2,5 мл інкубували 30 хв при 20°C , з подальшим вимірюванням оптичної густини утвореного комплексу метал-5-Br-PAPS при 550 нм. Концентрацію цинку у тканині та елюаті обчислювали за калібрувальною кривою та виражали як нмоль г^{-1} або мкг г^{-1} тканини.

Аналіз вмісту міді у тканині травної залози проводили спектрофотометрично відповідно до Peterson і Voiler (1955) з використанням купризону (Copper Test. 1.14767 – Merck Millipore). Зразки тканини попередньо обробляли для вивільнення Cu та перетворення Cu(I) на Cu(II) , pH зразків доводили до 8,0. Розрахунок проводився з використанням молярного коефіцієнта екстинкції $16\ 000\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$ при 600 нм (Marczenko and Balcerzak, 2000). Концентрацію металу виражали як $\text{нмоль} \cdot \text{г}^{-1}$ тканини або $\text{мкг} \cdot \text{г}^{-1}$ тканини.

2.5. Визначення концентрації глутатіону

Концентрацію відновленого та окисненого глутатіону (GSH, GSSG відповідно) визначали за методом, який ґрунтується на спектрофотометричному визначенні взаємодії реактиву Елмана (ДТНБ) з тіоловою групою, з використанням НАДФН та глутатіонредуктази, що відновлюють GSSG (Griffith et al., 1980). Для отримання безпротеїнового екстракту додавали сульфосаліцилову кислоту у пропорції 1:3 до 20 % (мас/об) гомогенату тканини у калій-фосфатному буфері 0,1 М pH 7,4, з додаванням 1 мМ ЕДТА, 100 мМ KCl , та 0,1 мМ ФМСФ; одержану суміш центрифугували (3000 об/хв, 4°C , 5 хв). До 2,3 мл 0,4 М Tris-HCl буфера pH 8,9, що містив 1

мМ ДТНБ та 200 мкМ β -НАДФН додали супернатант об'ємом 0,2 мл. Після цього зразки ресуспендували та піддавали дії температури 30 °C протягом 5 хв. Ініціювали реакцію додаванням ензиму глутатіонредуктази (50 одиниць/мл, 38 мкл) та реєстрували спектрофотометрично швидкість утворення 5-тіонітробензойної кислоти при 412 нм кожні 30 с протягом 2 хв. Вміст GSH визначали за калібрувальною кривою в нмоль·г⁻¹ вологої тканини. Для виміру концентрації GSSG 0,6 мл депротейнізований зразок інкубували з 2-вінілпіридином (2-VP) протягом 1 год, перед аналізом у концентрації 2%. Концентрацію GSSG у еквівалентах GSH визначали за калібрувальною кривою та виражали в нмоль·г⁻¹ вологої тканини. Редокс-індекс глутатіону (RI GSH) обчислювали як співвідношення концентрацій GSH/GSSG.

2.6. Електрофорез термостабільних протеїнів

Електрофорез термостабільних протеїнів у поліакриламідному гелі здійснювали згідно з протоколом для низькомолекулярних протеїнів (Haider et al., 2012). Для отримання розчину термостабільних протеїнів готували 33 % гомогенат тканини в 10 мМ буфері Трис-НСІ рН 8,0 з додаванням 2-меркаптоетанолу (10 мМ) та (0,1 мМ) ФМСФ для запобігання окислення SH-груп (Roesijadi and Fowler, 1991).

Для приготування гомогенату використовували рівні наважки зразків тканини від всіх організмів дослідної групи (\approx 45 мг) та центрифугували при 10000 об/хв протягом 45 хв. Одержаний супернатант інкубували протягом 5 хв при 85°C і знову центрифугували у попередніх умовах. Для подальшого дослідження використовували 2,5 М Трис-НСІ буфер, рН 8,8, розчин акриламідів : біс-акриламід 29:1, розчин поліакриламідного гелю (30% мас./об.), буфер для концентрування, що містить: 1% (мас./об.) SDS, 100 мМ Трис-НСІ (рН 6,8), 4% 2-меркаптоетанолу, 24% (мас./об.) гліцерину, 0,02% Coomassie Brilliant Blue та розчин персульфату калію 3%.

Для концентрування та розділення використовували 15% та 4% (мас/об) гелі відповідно. Після застигання пластинок заповнювали лунки зразками (10

мкл) та завантажували касети у прилад для електрофорезу. Електрофорез проводили при напрузі 100 В та силі струму 20 А. Фарбування та фіксацію пластин здійснювали за протоколом (Otsuka та ін., 1988). Електрофореграми опрацьовували кількісно за допомогою програмного забезпечення GelAnalyzer 19.1.

2.7. Оцінка активності ензимів антиоксидантного захисту

Характеризували активність ензимів першої та другої фаз знешкодження АФК супероксиддисмутази (SOD) та каталазу (Cat). Показники визначали у розчинній фазі гомогенату, отриманій під час його центрифугування при 6000 об/хв протягом 10 хв.

2.7.1. Активність супероксиддисмутази

Методика вимірювання SOD (КФ 1.15.1.1) ґрунтується на зниженню швидкості відновлення нітротетразолію синього (НТЗС) у присутності відновленого 3 мМ метіоніну, рибофлавіну 6,3 мкМ та 30 мкМ ЕДТА. Для визначення використовували 10% гомогенат в 50 мМ К-фосфатному буфері, рН 7,4 з подальшим центрифугуванням при 6000 об./хв протягом 10 хв, і використанням надосаду (50 мкл). Останнім додавали рибофлавін, після чого пробірки струшували й опромінювали контроль (містив усі компоненти, окрім НТЗС), стандарт (містив усі компоненти, окрім надосаду) та дослідні зразки флуоресцентною лампою (400 люкс, 15 В) 20 хв. Світлопоглинання вимірювали при 560 нм проти холостої проби, яка не містила надосаду і НТЗС та не була опромінена.

Для визначення активності Mn-SOD супернатант витримували попередньо при 0°C протягом 60 хв в присутності ацетонціангідрину 15%, досягаючи цим повного пригнічення активності Cu,Zn-SOD. Для визначення активності Cu,Zn-SOD обчислювали різницю активності у відсутності та присутності ацетонціангідрину. Активність ензиму розраховували за формулою: $A = (D_c - (D_d - D_k)) \times d/C$ протеїну, де D_c – світлопоглинання

стандартної проби, $(D_d - D_k)$ – різниця світлопоглинання між дослідною та контрольною пробами, d – розведення біологічного матеріалу C – вміст протеїну у дослідній пробі. Активність ензиму виражали в умовних одиницях (у.о. мг^{-1} протеїнів). За у.о. приймали активність ензиму, що викликає зменшення оптичної густини в процесі відновлення НТЗС у дослідному зразку на 50% в розрахунку на 1 мг протеїнів надосаду.

2.7.2 Активність каталази

Активність каталази (КФ 1.11.1.6) визначали спектрофотометричним методом який базується на зменшенні оптичної густини при розкладі H_2O_2 за впливу ензиму, вимірювали при 240 нм. Досліджувана суміш містила 50 мМ К-фосфатний буфер, рН 7,0, 15 мМ H_2O_2 , та 50 мкг протеїну (ініціація реакції), загальний об'єм 3,0 мл. Вимірювали поглинання при 240 нм з 60-секундним інтервалом. Активність ензиму обчислювали за мілімолярним коефіцієнтом світлопоглинання пероксиду ($\epsilon = 0,04 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) і виражали в мкмоль $\text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ розчинного протеїну.

2.7.3. Визначення вмісту та співвідношення концентрацій нікотинамідних коензимів

NADH і NAD^+ визначали у тканині травної залози, як це було описано у Yang та ін. (2015). Зразки гомогенізували в 0,1 М HCl (NAD^+) або 0,1 М NaOH (NADH), нагрівали, після чого охолоджували та центрифугували при 10000 об./хв, нейтралізували та знову центрифугували у попередньому режимі. Отримані надосадові рідини використовували згідно принципу ензимного циклу за Lowry та ін., (1961), модифікованого Zhu та ін., (2012). Він заснований на окисненні етанолу до ацетальдегіду, що каталізується алкогольдегідрогеназою (Е.С. 1.1.1.1) з відновленням NAD^+ до NADH і, як наслідок, перенесенням електронів від NADH до 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолію броміду у реакції з феназинетасульфатом, що призводить до утворення фіолетового формазанового продукту, який можна кількісно

виміряти при 570 нм. Концентрацію формазану вимірювали з використанням молярного коефіцієнта поглинання $13000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, та виражали у $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ тканини.

2.7.4. Утворення продуктів окисної деструкції ліпідів та протеїнів

Для визначення продуктів окисної деструкції використовували 10 % гомогенат об'ємом 0,5 мл в 50 мМ К-фосфатному буфері, рН 7,4 та додавали 1 мл 20% сульфосаліцилової кислоти, після чого реакційну суміш центрифугували (15 хв, 4000 об/хв). Осад використовували для визначення окисних модифікацій протеїнів (Protein Carbonyls, PC), а надосад - для визначення продуктів перекисного окиснення ліпідів (Thiobarbituric Acid Reactive Substances, TBARS).

Для визначення TBARS вимірювали утворення ТБК-активних продуктів в реакції з 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК) для чого до 1,5 мл надосаду додавали по 1,5 мл розчину ТБК 0,7 мМ у 0,1 М НСІ і поміщали проби на 20 хв в киплячу водяну баню. Як контроль використовували пробу, що містила замість супернатанту буферний розчин (50 мМ К-Р буферний розчин рН 7,4). Утворення ТБК-АП обчислювали за інтенсивністю поглинання забарвленого комплексу при 532 нм за молярним коефіцієнтом екстинції комплексу $\varepsilon = 1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ та виражали у $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ тканини (Ohkawa et al., 1979).

Окисні модифікації протеїнів (PC) визначали за їх здатністю утворювати 2,4-динітрофенілгідрозони з інкубацією проб в присутності 0,1 М 2,4-динітрофенілгідрозину (ДНФГ) у 2 М НСІ (Reznick and Packer, 1994). До одержаного осаду додавали 1 мл 0,1 М ДНФГ у 2 М НСІ, (попередньо профільтрованого), а в контроль - 1 мл 2 М НСІ. Проби інкубували протягом 1 год при 37°C, з подальшим центрифугуванням 10 хв, 3000 об/хв. Отриманий осад промивають тричі 5% трихлороцтовою кислотою (по 3 мл), кожний раз осад ретельно ресуспендували скляною паличкою. Одержаний осад витримували 15-20 хв на киплячій водяній бані з додаванням 5 мл 8 М розчину сечовини, до повного розчинення реакційної суміші. Після інкубації розчин

центрифугують в попередньому режимі для позбавлення нерозчинних часток. Оптичну густину утворених карбонілів реєстрували при 370 нм проти контролю. Вміст фенілгідразонів знаходили на основі молярного коефіцієнта екстинції ($2,1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) при 370 нм. Вміст карбонілів виражали в $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ тканини.

2.8. Визначення активності протеаз

2.8.1. Визначення активності катепсину Д

Катепсин Д (CtD) –одна з лізосомальних протеаз (катепсинів), що містить аспаратат у активному центрі, активна за рН 4,5-5, проте активна і поза лізосомами та, зокрема, у позаклітинному просторі, особливо за патологічних станів, за нейтральних значень рН (Yadati et al., 2020). Принцип методу ґрунтується на спектрофотометричному визначенні кислоторозчинних продуктів ензиматичного гідролізу гемоглобіну (Dingle et al., 1971). Наважку травної залози масою 250 мг подрібнюють та гомогенізують у 0,5 мл 0,25 М розчині сахарози. Після чого, гомогенат розділяли для визначення загальної та вільної активності катепсину Д.

Визначення вільної (позалізосомної) активності катепсину Д

Для визначення вільної (позалізосомної) активності катепсину Д (CtDe) до 0,15 мл гомогенату додавали 0,15 мл насиченого розчину гемоглобіну, після чого одержану суміш перемішували та інкубували при 37°C – 30 хв, з наступним додаванням 10%-го розчину трихлороцтової кислоти об'ємом 0,6 мл та 3,1 мл дистильованої води. Отриманий розчин центрифугували при 6000 об/хв протягом 10 хв та вимірювали оптичну густину при 280 нм проти контролю.

Визначення загальної активності катепсину Д

Для визначення загальної активності катепсину Д (CtDt) до 0,15 мл гомогенату додавали 0,1 мл розчину тритону X-100, суміш перемішували та інкубували при 37°C протягом 10 хв після чого, додавали насичений розчин гемоглобіну об'ємом 0,15 мл, перемішували з подальшим інкубуванням при

37°C протягом 30 хв. До суміші додавали 0,6 мл 10 % розчину трихлороцтової кислоти та 3 мл дистильованої води, з наступним центрифугуванням при 6000 об/хв протягом 10 хв. Оптичну густину вимірювали при 280 нм проти відповідного контролю. Активність виражали у $\text{нмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ протеїну.

2.8.2. Активність каспази-3

Для визначення активності каспази-3 [КФ 3.4.22] готували гомогенат із тканини травної залози у співвідношенні 1:3 m/v з сумішшю, що містить 5 мМ дитіотриітолу, 5 мМ ЕДТА, 4% Тритон X-100 5 мМ MgCl_2 та 350 мкг/мл ФМСФ. Суміш витримували упродовж 10 хв при низькій температурі, після чого центрифугували 5 хв при 12 000 об/хв. Аліквоту супернатанту, що містила 100 мкг протеїну, додавали до 10 мкл 2 мМ розчину тетрапептиду ацетил-Асп-Глу-Вал-Асп-п-нітроаніліду у 50 мкл буфера з подальшою інкубацією протягом 2 год. Інтенсивність світлопоглинання вимірювали при 405 нм, проти контролю (містив усі компоненти що і дослідна проба, окрім супернатанту). Активність каспази-3 обчислювали за допомогою мілімолярного коефіцієнту екстинції п-нітроаніліну ($10,5 \text{ ммоль}^{-1} \text{ см}^{-1}$) та виражали в $\text{пмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ протеїну (Du et al., 1997).

2.9. Визначення вмісту протеїнів

Вміст протеїнів визначали у рідинній фазі гомогенату за методом Лоурі та співавторів (Lowry et al., 1951), який ґрунтується на здатності мідних похідних протеїну відновлюватись реактивом Фоліна з утворенням інтенсивно забарвлених продуктів реакції, обчислювали за калібрувальною кривою побудованою на бичачому альбуміні та виражали в мг протеїну на грам маси тканини.

2.10. Статистичні методи оцінки експериментальних даних

Результати досліджень виражені як $M \pm SD$, розмір вибірки становив 8 організмів за виключенням аналізу металів у складі металотіонеїнів, який

здійснювали для двох повторностей в об'єднаних наважках тканини з восьми екземплярів групи. Оцінку нормальності оцінювали з використанням тесту Шапіро-Вілка. Аналізували дані за допомогою t-критерію Стьюдента, значущого при $p < 0,05$. Вірогідною вважали відмінність між рядами даних за $p < 0,05$. За допомогою кореляційного аналізу оцінювали взаємозв'язок між біохімічними показниками (коефіцієнт кореляції Пірсона r за вірогідності значення $p < 0,01$ ($\alpha > 0,325$) і $p < 0,05$ ($\alpha > 0,304$) (2-хвостий), $N=64$. Для оцінки взаємозалежностей реакцій досліджуваних параметрів здійснювали також аналіз головних компонентів (PCA) з використанням ротаційного методу Varimax, а для ідентифікації ступеня специфічності реакції експериментальних груп застосували канонічний дискримінантний аналіз. Адекватність даних оцінювали на основі значення КМО та критерію сферичності Бартлетта. Для розрахунків було використано програмне забезпечення IBM SPSS Statistics версії 26 для Windows. Графічні зображення були виконані з використанням програми GraphPad Prism 6.

РОЗДІЛ III РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Накопичення мікропластику в організмі двостулкового молюска за експериментальних та польових умов існування

Щорічно у середовище потрапляє велика кількість МР. МР міститься майже у всіх морських і прісноводних середовищах, навіть у віддалених від антропогенної активності місцевостях (Eriksen et al., 2014), що робить його потенційно згубний вплив глобальною проблемою. Важливо, що 70–80% загальної кількості МР, який міститься в морському середовищі потрапляє в навколишнє середовище з прісних водойм (Mofijur et al., 2021). Тому актуальним завданням є аналіз здатності прісноводних молюсків акумулювати МР.

Результати експозиції молюсків у присутності МР показали, що кількість частинок, як у тканинах молюсків, так і у воді змінювалася узгоджено з протилежною закономірністю (Рис. 3.1.1, 3.1.2). Кількість частинок у тканинах була незначною на 0 день інкубації (без додавання МР) і різко зростала до 2-ї доби. Максимальне накопичення МР виявлено на 8–10 добу порівняно з початком впливу, та залишалось значно підвищеним на 14-й день.

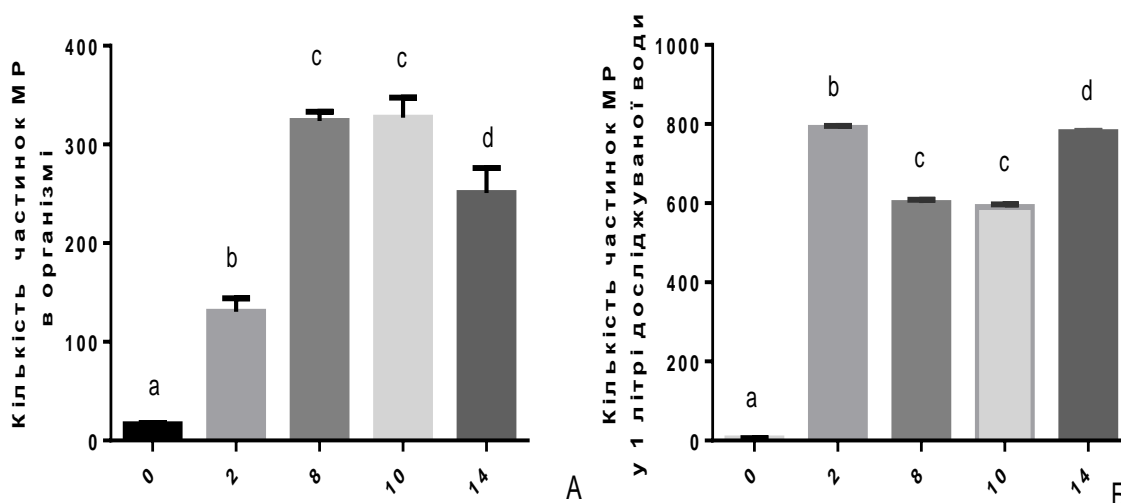


Рис. 3.1.1. Загальна кількість МР у тканинах молюсків (А) та у воді (Б) за експериментальної дії 1 мг/л протягом 14 діб. Дані представлені як середнє значення \pm SD (N=4). Тут і далі: різні літери над стовпцями вказують на істотно відмінні значення (P<0,05).

Кількість частинок у воді змінювалася протягом 2-14-ї доби експозиції у діапазоні від 590 до 790 часток/л та зменшувалась від найвищого рівня на 2-у добу до найнижчого рівня на 10-у добу експозиції, але зросла знову на 14 день. Отже, найбільш помітне накопичення МР на 10 добу експозиції узгоджувалось з максимальним вилученням пластика з води. Динаміка накопичення МР у м'яких тканинах (загальний вміст у тканинах) та у воді мали значну негативну кореляцію ($r = -0,799$, $P < 0,05$).

Морфологічний аналіз молюсків (Табл. 3.1.1) засвідчив подібність у розмірах між перлівницями у лабораторному експерименті та у польових умовах.

Таблиця 3.1.1.

Морфологічні характеристики молюсків, які зазнали впливу МР у лабораторних та польових умовах, $M \pm SD$, $N=4$.

День експозиції	Довжина, см	Маса м'яких тканин, г	СІ, %
Лабораторний дослід			
0 (контроль)	9,63±0,22	26,98±0,82	3,03±0,14
2	9,73±0,22	26,30±2,05	2,86±0,17
4	9,85±0,26	25,78±0,88	2,71±0,29
6	9,65±0,24	25,55±1,80	2,85±0,21
8	9,08±0,13*	26,83±0,31	3,59±0,12*
10	8,60±0,18*	20,93±0,41*	3,29±0,16
12	8,58±0,17*	21,33±0,88*	3,38±0,08*
14	9,55±0,21	26,35±0,71	3,04±0,28
Польове дослідження			
р. Нічлава	9,65±0,24	26,28±0,84	2,93±0,16

Примітка: * – різниця порівняно з днем 0 достовірна, $P < 0,05$

Концентрація МР у м'яких тканинах польових зразків з антропогенно навантаженої території була вищою, ніж у молюсків, що витримувались у басейні з чистою водою протягом 7 діб, а рівень МР у річковій воді становив

близько 103 частинок/л (Табл. 3.1.2). Порівнюючи здатність молюсків до накопичення МР з води (кількість частинок на г тканин/кількість частинок на л води), його вища ефективність була вказана для польової групи ($\approx 75\%$). У експериментальній експозиції молюсків з контрольної ділянки ця функція також була досить високою ($\approx 55\%$ після 10 днів впливу).

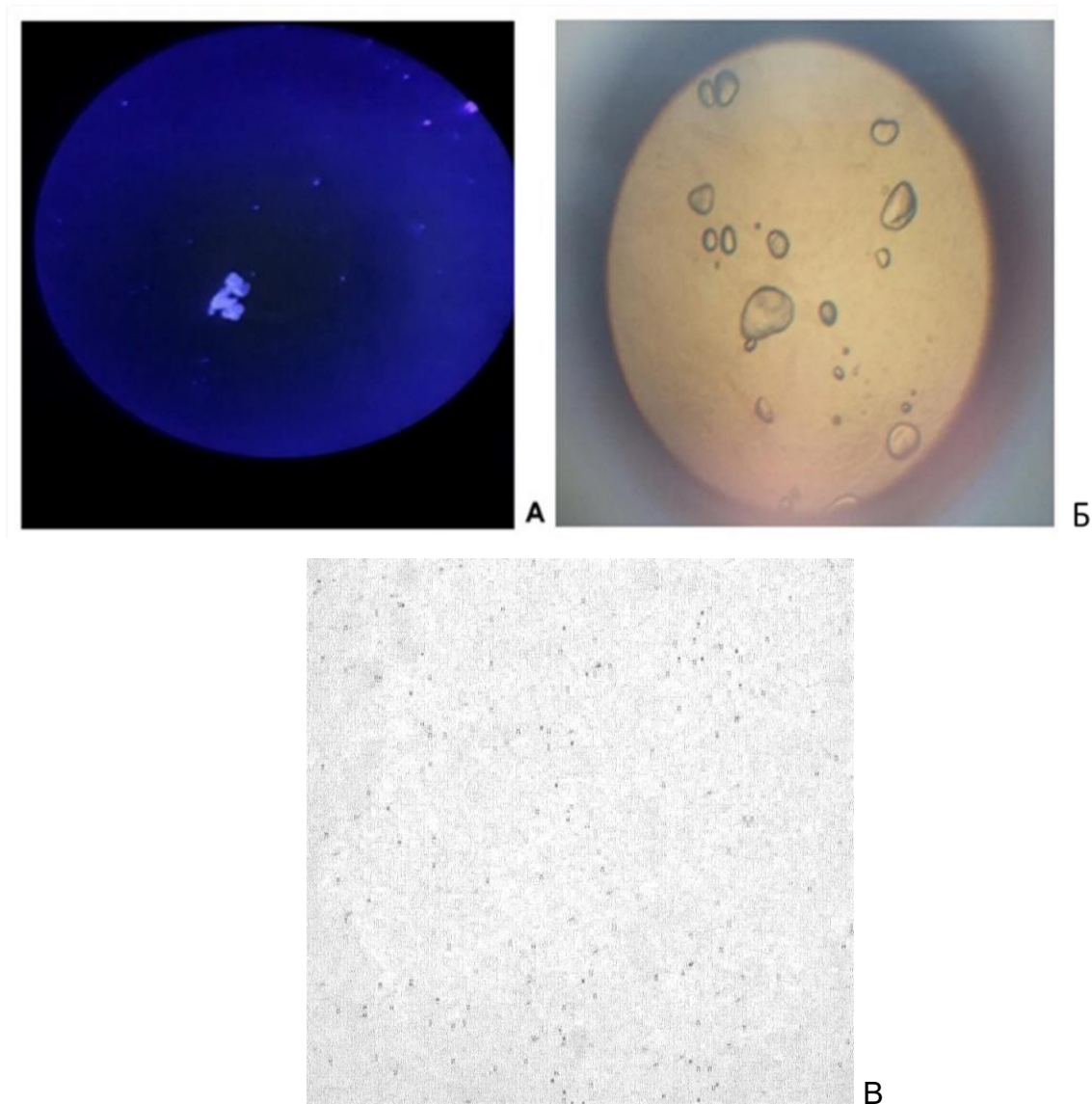


Рис. 3.1.2. Виявлення мікропластику в експериментальній середовищі (1 мг/л), А – за допомогою оптичного мікроскопа з флуоресцентною лампою (збільшення $40\times$), частинки пластику розміром 0,1-0,5 мм, пофарбовані Нілом червоним, видно як яскраву структуру; Б – частинки пластику розміром 0,1-0,5 мм під металографічним мікроскопом (при збільшенні $125\times$); В – частинки пластику розміром 2 мкм під металографічним мікроскопом (при збільшенні $125\times$);

Крім того, молюски з референтної території після періоду депурації не були повністю очищені від МР і містили такі частинки в організмі на 0-й день експозиції попри їхню майже повну відсутність у воді.

Таблиця 3.1.2

Вміст МР в організмі молюсків та в дослідному середовищі, $M \pm SD$, $N=4$.

День експозиції	Кількість частинок в організмі	Кількість частинок на г тканини	Кількість частинок на довжину (см ⁻¹)	Кількість частинок у воді /л	Інтенсивність накопичення тканина/частинки /л), %
Лабораторний дослід					
0 (контроль)	9,5±0,6 ^a	0,4±0,1 ^a	1±0,1 ^a	5,2±0,9 ^a	184,6±27,7 ^a
2	130,5±13,5 ^b	5,0±0,9 ^b	13,4±1,4 ^b	790,7±4,6 ^b	16,5±1,7 ^b
4	208,3±16,2 ^c	8,1±0,8 ^c	21,1±1,5 ^c	670,7±4,3 ^c	31,0±2,4 ^c
6	265,0±41,4 ^d	10,4±1,3 ^d	27,4±3,6 ^d	630,5 ±4,2 ^d	42,0±6,6 ^d
8	323,6±9,4 ^e	12,1±0,3 ^f	35,7 ±0,8 ^g	600,7±8,3 ^e	53,9 ±1,6 ^e
10	327,0±20,5 ^e	15,6±0,7 ^e	38,0±1,7 ^e	590,2±6,5 ^e	55,4±3,4 ^e
12	270,0±10,0 ^f	12,7±0,7 ^f	31,5±1,5 ^f	661,5±8,5 ^c	40,8±1,6 ^f
14	250,8±25,4 ^g	9,5±1,0 ^d	26,3±2,8 ^d	779,5±3,4 ^f	32,2±3,3 ^c
Польове дослідження					
р. Нічлава	76,5±4,0	2,9±0,1	7,9±0,2	103,0±0,8	74,3±4,5

Примітка: У кожному стовпчику різні літери вказують на вірогідно відмінні значення між днями експозиції ($P < 0,05$).

Порівнюючи отримані результати з наявною інформацією про присутність частинок пластику у морських організмів, здатність прісноводних молюсків накопичувати МР мала вищий рівень і відповідала, та навіть перевищувала рівень МР у тканинах молюсків з максимально забрудненої ділянки морського середовища (11,0±8,2 шт./г), виявлений в Ірані серед 22 проаналізованих країн (Ding et al., 2018). Загалом, порівняння польових і

експериментальних груп молюсків показало вищу здатність молюсків накопичувати МР у лабораторному експерименті.

Щодо відомої інформації про наслідки накопичення МР для стану здоров'я молюсків було показано, що фізичне поглинання МР організмом призводить до блокування кишкового тракту, пригнічення секреції шлункових ензимів, зменшення стимулів годування, зниження рівня стероїдних гормонів, затримка овуляції та відсутність репродукції (Wright et al., 2013; Guilhermino et al., 2018). У молюсків спостерігалися гістологічні зміни та сильна запальна реакція після впливу надзвичайно високих концентрацій МР, наприклад, в експозиції до 2,5 г/л (von Moos et al., 2012) або 0,1 г/л. (Wegner et al., 2012). Як видно з наших результатів, навіть відносно низька концентрація МР - 1,0 мг/л - викликала морфологічні ознаки токсичності, а саме підвищення морфологічного показника СІ у період найбільшого накопичення МР.

Отже, отримані результати підтверджують високу здатність накопичувати частинки пластику в організмі двостулкових молюсків, що створює перспективи їх використання для індикації забруднення води МР.

Представлені у підрозділі 3.1. результати опубліковано у статті (Martyniuk, 2023).

3.2 Характеристика металотіонеїнів *U. tumidus* за впливу на організм мікропластику різного розміру та фармацевтичних препаратів

3.2.1. Реакція металотіонеїнів за впливу на організм мікропластику розміром 0,1-0,5 мм окремо та спільно з ібупрофеном

З огляду на поліфункціональність металотіонеїнів та чутливість їх реакцій у молюсків до впливу відмінних від токсичних металів чинників (Gnatyshyna et al., 2020; Khoma et al., 2021, 2022), являло інтерес дослідити відповідь металотіонеїнів на дію мікрочастинок ПЕТ та фармацевтичного препарату ібупрофену. Певні чинники можуть впливати на металодепонувальну та антиоксидантну здатність металотіонеїнів прямо чи опосередковано, визначаючи хроматографічні та відновні властивості металотіонеїнів (Contardo-

Jara et al., 2011). У результаті гелі-розподільної хроматографії термостабільних протеїнів травної залози двостулкових молюсків (Рис. 3.2.1.1) виявлено дві фракції: високомолекулярну (Mг близько 66 кДа), як наслідок неповного видалення високомолекулярних протеїнів при пробопідготовці, та низькомолекулярну металотіонеїн-вмісну (Mг близько 8 кДа).

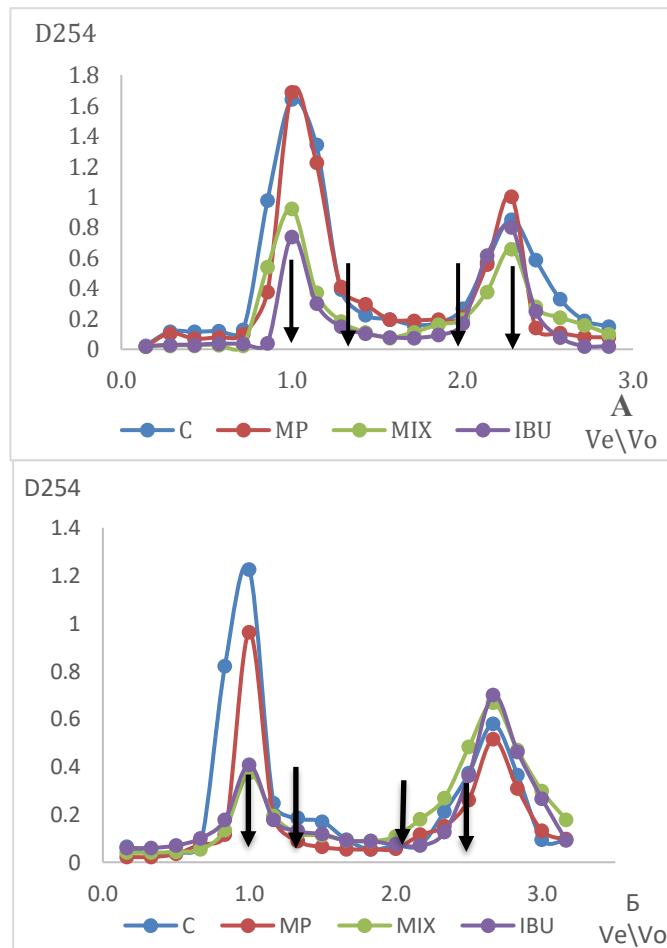


Рис. 3.2.1.1. Профілі елюції термостабільного супернатанту із травної залози двостулкового молюска *U. tumidus* з р. Нічлава (А) та Случ (Б), одержані при гелі-розподільчій хроматографії на сефадексі G-50

Примітка: на рисунках А, Б: стрілками вказано об'єм елюції маркерів: 1,0 V_e/V_0 – альбумін (66 кДа), 1,33 V_e/V_0 – хемотрипсин (25 кДа), 2,0 V_e/V_0 – цитохром с (12 кДа), 2,33 V_e/V_0 – інсулін (5,8 кДа); V_e – об'єм елюції, V_0 – зовнішній об'єм гелю.

Протеїни з молекулярною масою близько 8 кДа мали відносно високий індекс поглинання світла D_{254}/D_{280} , $2,3 \pm 0,1$, порівняно з $1,0 \pm 0,1$ для протеїнів

з високою молекулярною масою. Це свідчить про наявність метал-тіолатних кластерів з максимумом поглинання близько 254 нм та відсутність їх у складі ароматичних груп, що вирізняє ці унікальні протеїни (Isani and Carpenè, 2014). Наведені характеристики: низька молекулярна маса, термостабільність, характеристики УФ-спектру, відповідають ознакам металотіонеїнів.

Порівняння профілів елюції та спектрів поглинання протеїнів із різних експериментальних груп не виявило принципових відмінностей, які би свідчили про димеризацію чи появу МТ-20 та втрату кластерної структури (Рис. 3.2.1.2.).

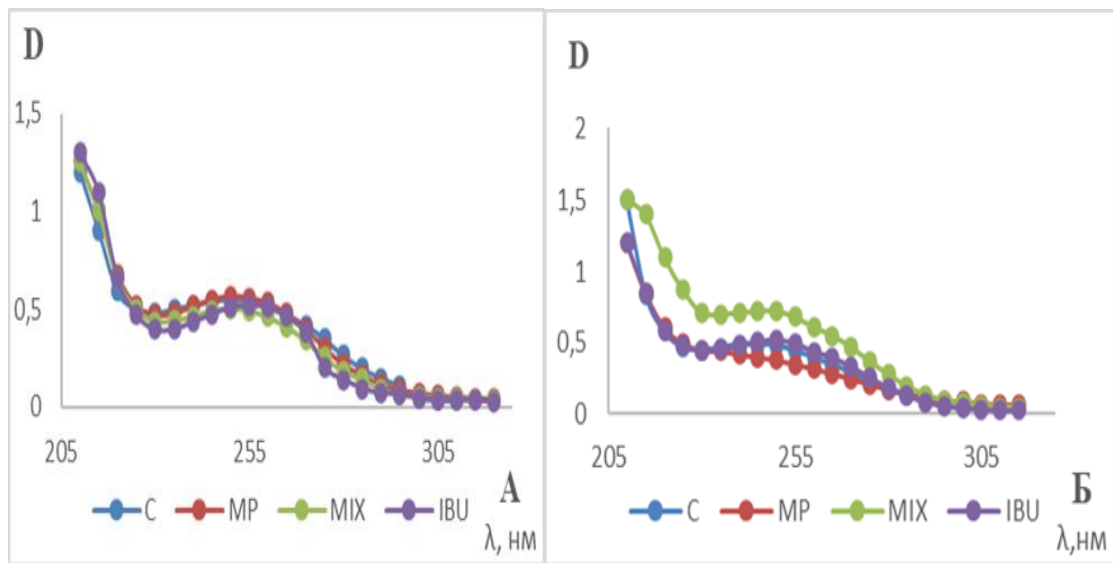


Рис. 3.2.1.2. УФ-спектри отриманих при розподільчій гель-хроматографії термостабільних протеїнів травної залози *U. tumidus*, з р. Нічлава (А) та Случ (Б) за впливу мікропластику (MP), ібупрофену (IBU) та їх поєднання (MIX).

Разом з тим, у молюсків із референтної водойми дія на організм MP (переважно) та їх суміші викликає певні зміни спектра в далекому ультрафіолеті (225-240 нм), така змінна може бути пов'язана з перерозподілом металів у складі метал-тіолатних кластерів (Wilhelmsen et al., 2002). Таким чином, вплив досліджуваних речовин на живий організм не призводить до утворення дисульфідних зшивок у молекулах металотіонеїнів за умов гель-хроматографії та втрат здатності металювання протеїну.

Електрофорез термостабільних протеїнів (Рис. 3.2.1.3) показав, що у всіх групах експозиції відбулось недостатнє очищення низькомолекулярних протеїнів, про що свідчить присутність високомолекулярних смуг. Металотіонеїни з молекулярною масою близько 7-8 кДа ідентифіковані в усіх випадках.

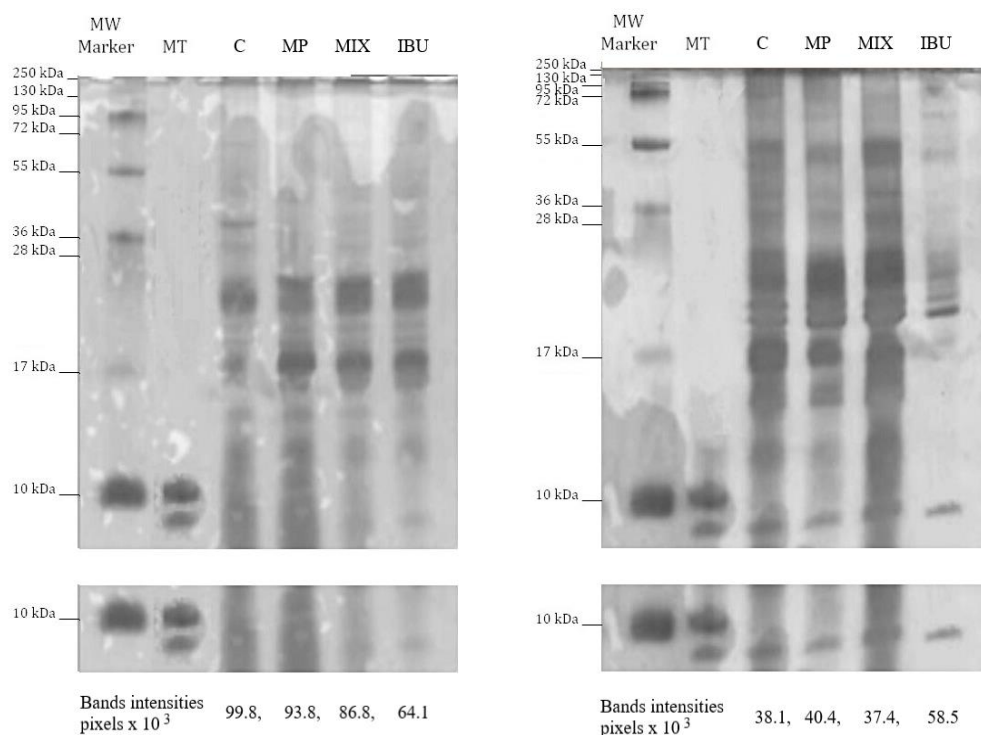


Рис. 3.2.1.3. Результати електрофорезу у системі трицин SDS-PAGE термостабільного екстракту у денатуруючих умовах тканини травної залози молюска *U. tumidus* з референтної популяції (Pr) – А та антропогенно навантаженої (St) популяцій– Б: колонки відповідають 1 - маркерні протеїни, 2 – стандартні металотіонеїни кролика, 3 -С, 4 -MP, 5 – Міх, 6 -IBU. Позначено інтенсивність поглинання смуг, що відповідають низькомолекулярній фракції.

На електрофореграмах спостерігаються ознаки часткової полімеризації металотіонеїнів, які проявляються не зважаючи на денатуруючі умови, що зумовлено високим вмістом тіолів (близько 30 % амінокислотного складу) у металотіонеїнах.

Між двома контрольними групами молюсків спостерігали відмінності у вмісті металотіонеїнів (Рис. 3.2.1.4) – вищу у 3,5 рази концентрацію металотіонеїнів у контрольній групі з референтної місцевості порівняно з

контрольною групою з антропогенно навантаженої місцевості. Порівняння електрофореграм (Рис. 3.2.1.3) також свідчить про таку різницю між популяціями. Можна припустити, що в організмів із референтної місцевості наявні кращі умови для біосинтезу металотіонеїнів ніж в організмів, які перебувають під хронічним впливом токсикантів. Такі закономірності ми спостерігали й раніше порівнюючи дві популяції із різним рівнем забруднення (Falfushynska et al., 2015; Khoma et al., 2020).

Вплив ксенобіотиків на концентрацію металотіонеїнів (Рис. 3.2.1.4) проявлявся майже уніфіковано у двох популяціях за виключенням впливу МР. За впливу МР у St-моллюсків проявлялась типова реакція зростання рівня металотіонеїну як стрес-реакційних протеїнів, тоді як у Pr-моллюсків їх вміст зменшувався. Вплив ібупрофену та суміші в обох популяціях призводив до зменшення вмісту металотіонеїну на 34-57% порівняно з відповідним контролем.

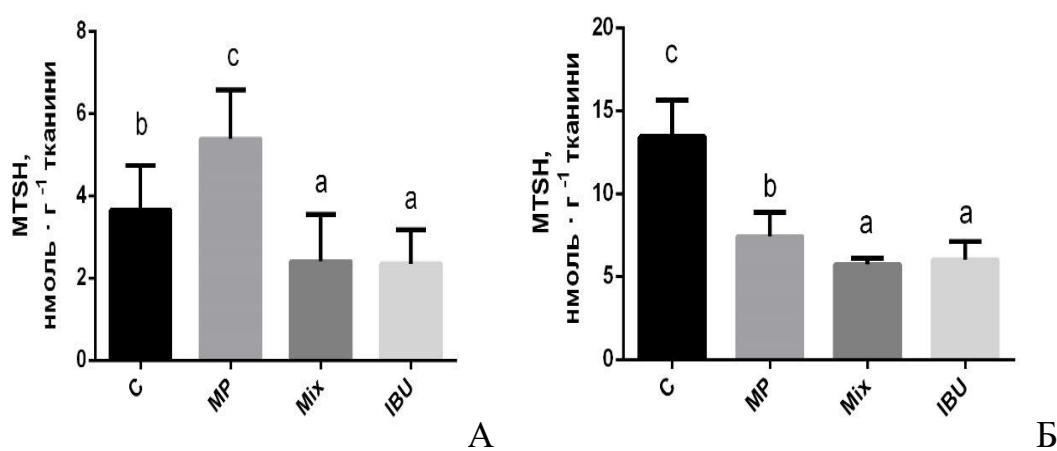


Рис. 3.2.1.4. Вміст металотіонеїнів у травній залозі моллюсків із р. Нічлава (А), та р. Слuch (Б), за впливу на організм мікропластику (MP), ібупрофену (IBU) та їх суміші (Mix), $M \pm SD$, $n=8$.

Схожі результати отримували і в попередніх дослідженнях нашої лабораторії за впливу значно нижчої концентрації ібупрофену в аналогічних умовах (Falfushynska et al., 2015).

Завдяки високому вмісту цистеїну металотіонеїни акумулюють есенціальний метал цинк та беруть участь у його розподілі між клітинними

мішенями, зокрема цинк-вмісними ензимами та регуляторними протеїнами (Calvo et al., 2017). Аналіз вмісту металу у складі металотіонеїнів (Рис. 3.2.1.5.) виявив різницю між двома контрольними групами і у цьому випадку. Проте вона була протилежною до відмінностей у вмісті загального металотіонеїну: більша концентрація цинку містилася в металотіонеїнах організмів з антропогенно навантаженої території. Отримані результати відповідають інформації про вищий рівень промислового забруднення в даному регіоні, а, відповідно, і цинку як промислового металу (Diamanti et al., 2020). Тому, у травній залозі молюсків цієї групи може накопичуватися більше цинку. Важливим є те, що такі відмінності залишалися стабільними навіть після 21-го дня перебування у лабораторії.

Разом з тим, вміст металованої форми металотіонеїну у перлівниці з Ст-популяції залишався незмінним порівняно з відповідним контролем за всіх експозицій, а у молюсків з Pr-популяції він зростав у групі Pr-Mix та зменшувався за впливу ібупрофену (Рис. 3.2.1.5).

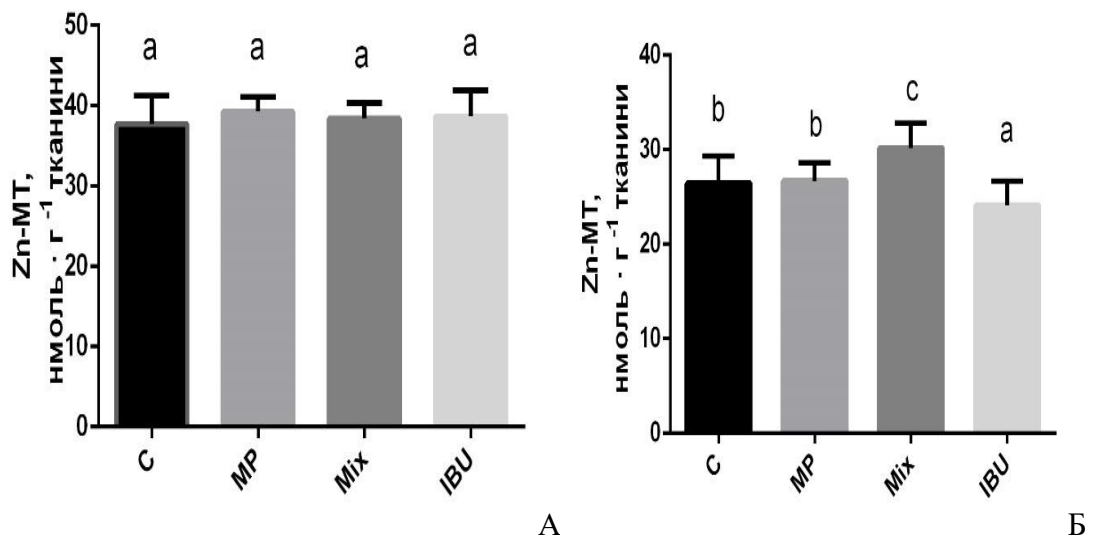


Рис. 3.2.1.5. Вміст цинку у складі металотіонеїнів у клітинах травної залози *U. tumidus* з р. Нічлава (А), р. Случ (Б) за впливу мікропластику (MP), ібупрофену (IBU) окремо та у комбінації (Mix), $M \pm SD$, $n=8$.

Також спостерігали відмінності у концентрації цинку у тканині травної залози між двома популяціями молюсків (Рис. 3.2.1.6.). Вміст цинку був вищим

у організмів з антропогенно навантаженої зони, що узгоджується з інформацією про стан комплексного забруднення р. Нічлава по всій довжині сільськогосподарськими та індустріальними стоками, які можуть бути джерелом надходження цинку у воду. Вплив ібупрофену (Pr-популяція), МР та суміші (Сt-популяція) викликав збільшення вмісту цинку у тканині, відтак дисбаланс цинку у тканині у різних популяціях був викликаний різними чинниками (ібупрофен або МР та суміш).

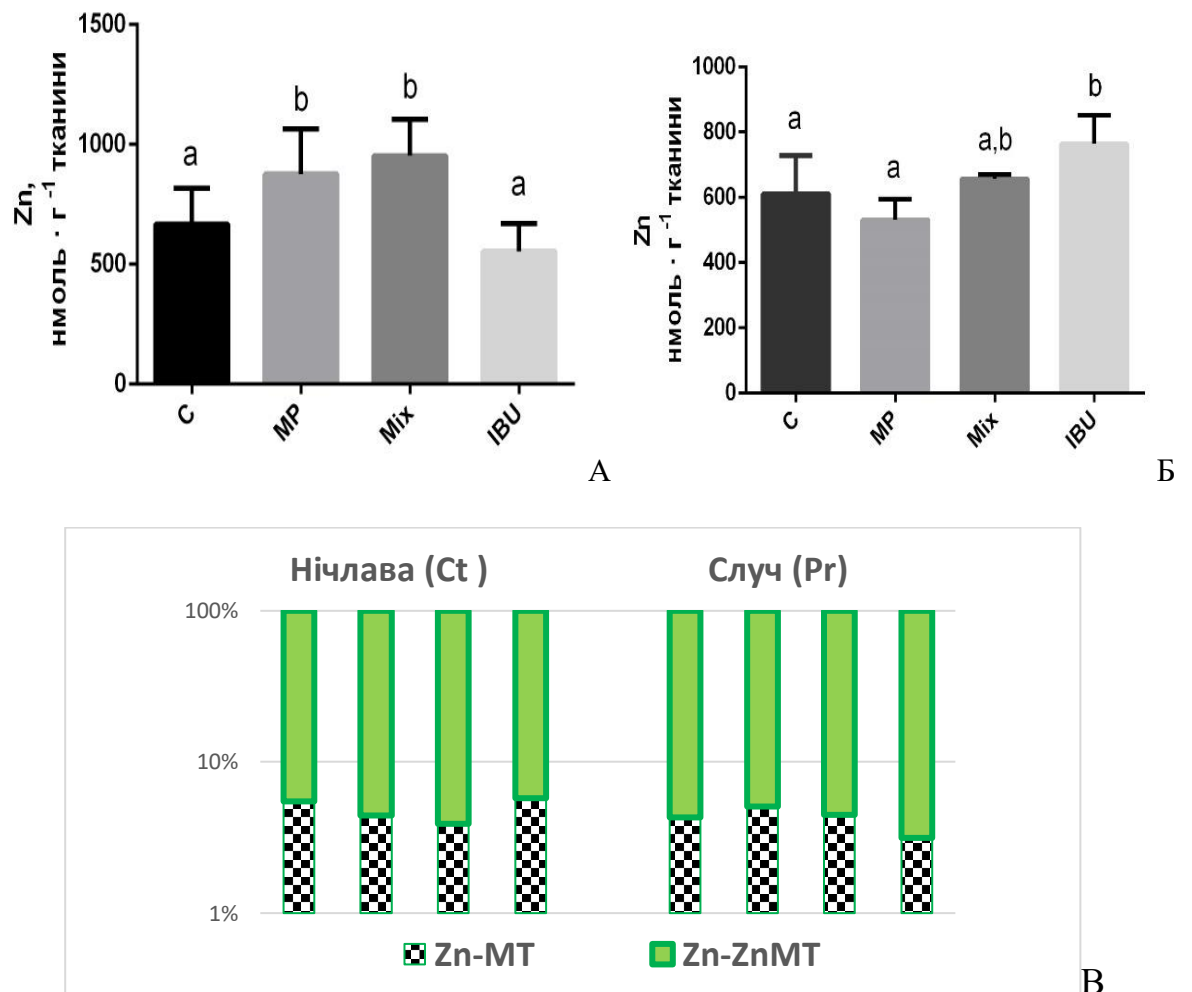


Рис. 3.2.1.6. Концентрація цинку у тканині травної залози *U. tumidus* із р. Нічлава (А), р. Слuch (Б) та частка цинку у складі металотіонеїнів до загального вмісту цинку (В) за впливу на організм мікропластику (МР), ібупрофену (IBU) окремо та у комбінації, $M \pm SD$, $n=8$.

Порівняння вмісту металу у тканині та у металотіонеїнах свідчить (Рис. 3.2.1.6.В), що депонована форма цинку становить менш ніж 10% від загального

вмісту цинку, що узгоджується з результатами інших досліджень перлівниці у цьому ж регіоні (Khoma et al., 2021)

Проте, співвідношення депонованої форми цинку до вмісту інших його форм у тканині змінювалося під впливом експериментальних факторів, причому у молюсків з антропогенно навантаженого сайту вміст недепонованого цинку збільшувався під впливом суміші та МР, а у молюсків з референтної місцевості – під впливом ібупрофену.

Відтак забезпечувався стабільний рівень депонування цинку у складі металотіонеїнів, не зважаючи на зміни його загального вмісту у тканині (збільшення у St-MP та Міх та Pr-IBU групах). При цьому, лише за впливу МР у St-популяції зростав вміст неметальованої (апо-) форми металотіонеїну, що характеризується високою активністю тіолових груп. Відмінність у показниках метаболізму цинку між популяціями за впливу чинників середовища відображає особливості рівня адаптації організмів до забруднення МР, або фармацевтиками в залежності від умов їх преадаптації у популяції.

3.2.2. Реакція металотіонеїнів за впливу на організм мікропластику розміром 2 мкм окремо та у суміші з саліноміцином за двох температурних режимів

Оскільки вплив МР розміром 0,1-0,5 мм викликав зміни у функціонуванні металотіонеїнів, особливо у St-популяції, важливо було дослідити вплив МР значно меншого розміру частинок (2 мкм) у тій самій концентрації на металодепонувальну здатність та антиоксидантний потенціал металотіонеїнів перлівниці з цієї популяції окремо та у поєднанні з фармацевтичним препаратом з гідрофобними властивостями. Для цього дослідження ми обрали саліноміцин, поліетерний антибіотик, який діє, як високоселективний іонофор Калію та двовалентних металів та, відповідно, може впливати на розподіл цинку у тканині.

При розподільчій хроматографії термостабільних протеїнів травної залози молюсків було виявлено класичний розподіл цих протеїнів за молекулярною

масою та ідентифіковано металотіонеїн-вмісну низькомолекулярну фракцію у всіх експериментальних групах (Рис. 3.2.2.1.)

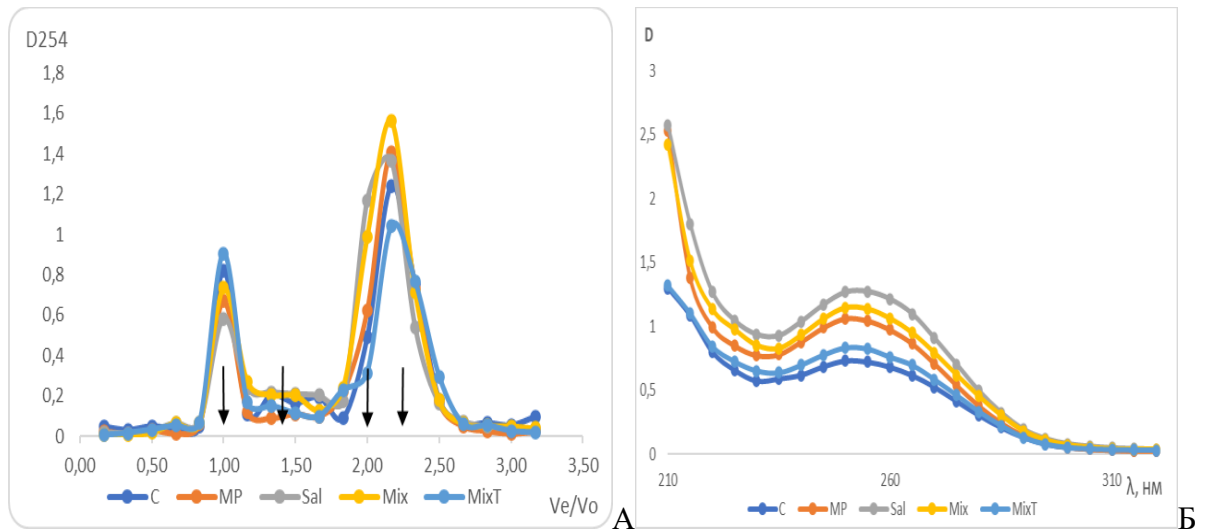


Рис. 3.2.2.1 Хроматографічні характеристики термостабільних протеїнів молюска *U. tumidus* за впливу мікропластику (MP), саліноміцину (Sal), суміші (Mix) 18°C та за впливу температури 25°C (MixT) профіль елюції на сефадексі G-50 (А) та УФ-спектри низькомолекулярних фракцій (Б).

Примітка: на рисунках А, Б: стрілками вказано об'єм елюції маркерів: 1,0 Ve/V_0 – альбумін (66 кДа), 1,33 Ve/V_0 – хемотрипсин (25 кДа), 2,0 Ve/V_0 – цитохром с (12 кДа), 2,33 Ve/V_0 – інсулін (5,8 кДа); Ve – об'єм елюції, V_0 – зовнішній об'єм гелю;

У цьому експерименті, як і у II серії, ми не виявили утворення різних форм металотіонеїнів за молекулярною масою, що могли бути продуктом експресії генів (MT-20), або результатом посттрансляційної модифікації протеїнів шляхом гідролізу або часткового окиснення структури.

Разом з тим, вплив експериментальних чинників призвів до змін загального вмісту металотіонеїну та їх металовмісної форми. Результати нашого дослідження показали, що концентрація загального протеїну металотіонеїну збільшувалася у групах, на які діяли MP та саліноміцином (Рис. 3.2.2.2.А). Проте за комбінованого впливу рівень металотіонеїнів не змінювався порівняно з контролем та навіть знизився у групі, на яку діяли комбінацією ксенобіотиків та за підвищеної температури.

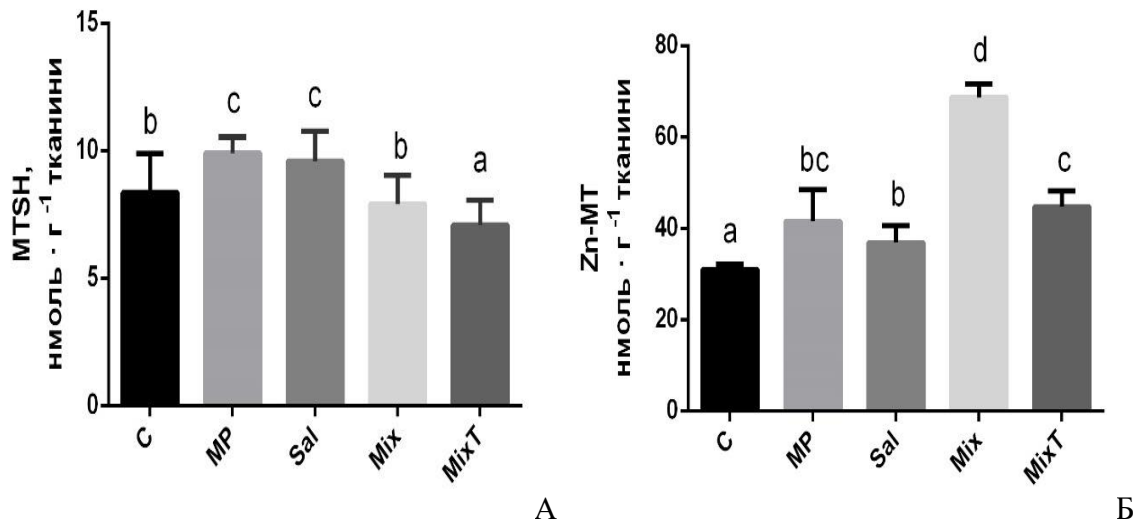


Рис. 3.2.2.2. Загальний вміст металотіонеїнів (А) та вміст цинку у складі металотіонеїнів (Б) у тканині травної залози двостулкового молюска *U. tumidus* за впливу на організм мікропластику (MP), саліноміцину (Sal) та їх суміші при температурах 18°C (Mix) та 25°C (MixT), $M \pm SD$, $n=8$.

Вміст цинку в металотіонеїнах (Рис. 3.2.2.2 Б) зростав у всіх експозиціях, найбільше за комбінованої дії за двох температурних режимів (Mix- і MixT у 4,4 і 2,9 раза відповідно).

При вимірюванні цинку у тканині травної залози (Рис. 3.2.2.3) спостерігали іншу залежність ніж у складі металотіонеїнів зниження його вмісту у групах, на які впливали MP та сумішшю за теплового впливу, тоді як у групі, на яку діяли сумішшю ксенобіотиків за температури 18 °C, спостерігали протилежні зміни рівня цього металу. Відтак, не зважаючи на нестабільність рівню загального вмісту цинку у тканині, і у цій серії спостерігалась здатність металотіонеїнів забезпечувати певний резерв цинку, особливо у групах MP (21% загального вмісту цинку у тканині порівняно з 11% у контролі) та MixT.

Найбільш помітні зміни у концентрації металу у тканині були зазначені для купруму (Рис. 3.2.2.3 Б). Його рівень підвищувався у всіх експозиціях, а особливо в групі, на яку впливали саліноміцином. Співвідношення вмісту Zn/Cu вважають одним із діагностичних показників патологій (Arini et al., 2014).

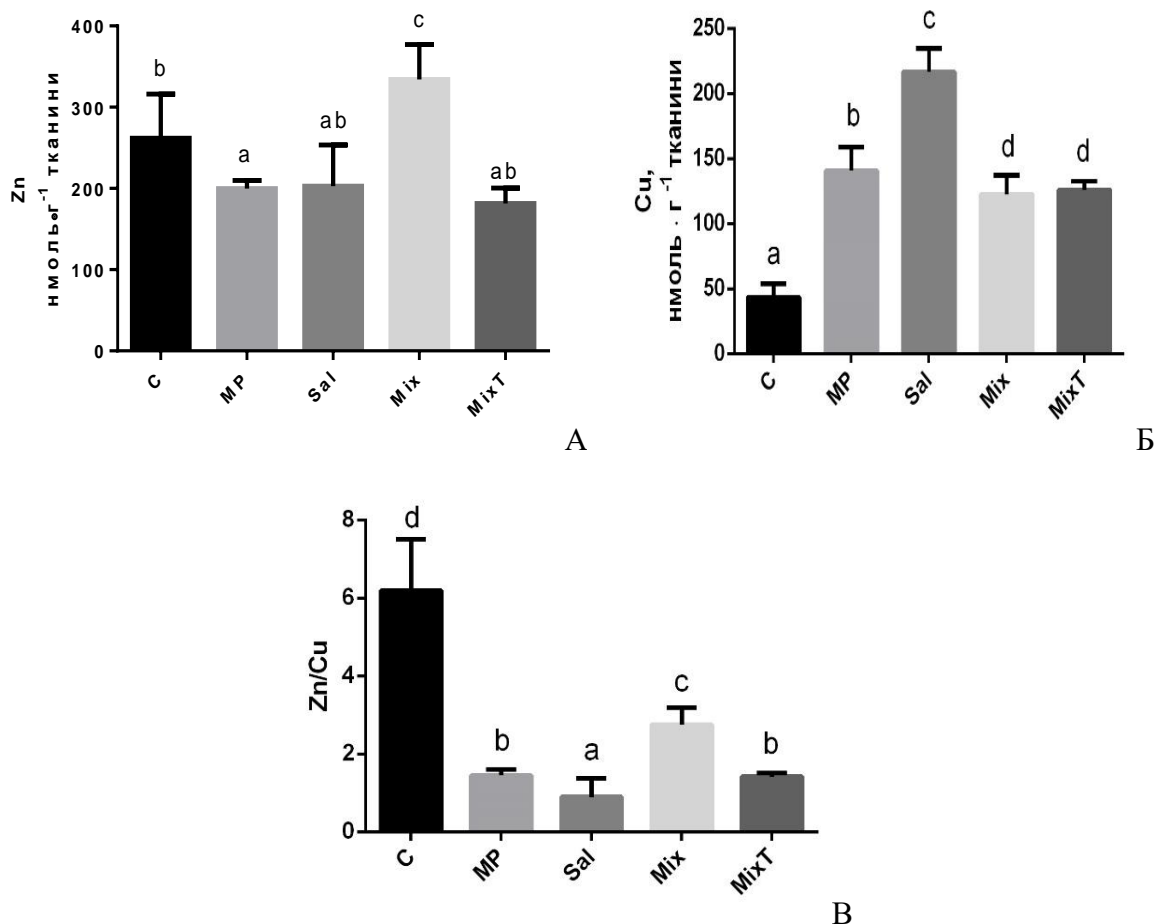


Рис 3.2.2.3. Вміст металів у тканині травної залози двостулкового молюска *U. tumidus* А – цинку, Б – купруму, та В – їх співвідношення за дії на організм мікропластику (MP), саліноміцину (Sal) та, їх суміші при температурах 18°C (Mix) та 25°C (MixT), $M \pm SD$, $n=8$.

Відповідно до змін вмісту цинку та купруму у тканині, співвідношення Zn/Cu зменшилось у 2,3 і більше разів (Рис. 3.2.2.3. В), а в експозиції з саліноміцином воно зменшувалося у 6,9 рази, що може бути ознакою впливу саліноміцину як іонофору. Такі зміни можуть вказувати на порушення метаболізму металів та окисно – відновного стану у клітинах.

Висновок до підрозділу

Відтак, металотіонеїни відіграють важливу роль у депонуванні Цинку у тканині травної залози за порушень його акумуляції та дисбалансу з Купрумом, викликаних мікропластиком обох розмірів та фармацевтичними препаратами. У молюсків з референтної популяції та за теплового навантаження стрес-реакція

металотіонеїнів на вплив ксенобіотиків послаблена. Дослідження вмісту цинк-депонуваної ємності металотіонеїнів двостулкового молюска продемонструвало високе інформативне значення цих показників для оцінки впливу адаптації у природному середовищі. Зміни у концентрації та рівні металювання металотіонеїнів та дисбаланс цинку та купруму в експериментальних групах дозволяють припустити порушення у редокс балансі за участю тіолів за впливу на організм молюска МР та супутніх чинників.

Представлені у підрозділі 3.2. результати опубліковано у статтях (Martyniuk et al., 2022, Martyniuk et al., 2023).

3.3 Дослідження реакції окисного/редуктивного стресу у травній залозі молюсків *U. tumidus* за впливу на організм мікропластику різного розміру та фармацевтичних препаратів

3.3.1 Вплив мікропластику розміром 0,1-0,5 мм окремо та спільно з ібупрофеном на стан системи антиоксидантного захисту у молюсків з двох популяцій

Одним з найбільш верифікованих ефектів МР на живі організми, зокрема на двостулкових молюсків, є генерація АФК. Відповідно, прогнозується реакція системи антиоксидантного захисту як відповідь на цю дію (Lushchak et al., 2009; Jeyavani et al., 2023).

Ензими антиоксидантного захисту, такі як SOD, універсальні у живому світі антиоксиданти, що каталізують перетворення супероксиду на кисень і перекис водню. Каталаза, в свою чергу, значною мірою пом'якшує окислювальний стрес шляхом руйнування клітинного перекису водню з утворенням води та кисню. Спільною дією вони визначають важливу роль у захисті тканин від пошкодження АФК. Їх активності часто використовуються як біомаркери опосередкованого ксенобіотиками окисного стресу (Livingstone, 2001; Jeyavani et al., 2023).

Отримані результати свідчать (Рис. 3.3.1.1 А), що у контрольних групах молюсків з умовно чистої місцевості вища активність ензимів

антиоксидантного захисту та нижчий рівень утворення продуктів окисної деструкції (Рис. 3.3.1.1, 3.3.1.2.) порівняно з контрольною групою з антропогенно навантаженої місцевості, що свідчить про ефективний антиоксидантний захист у молюсків.

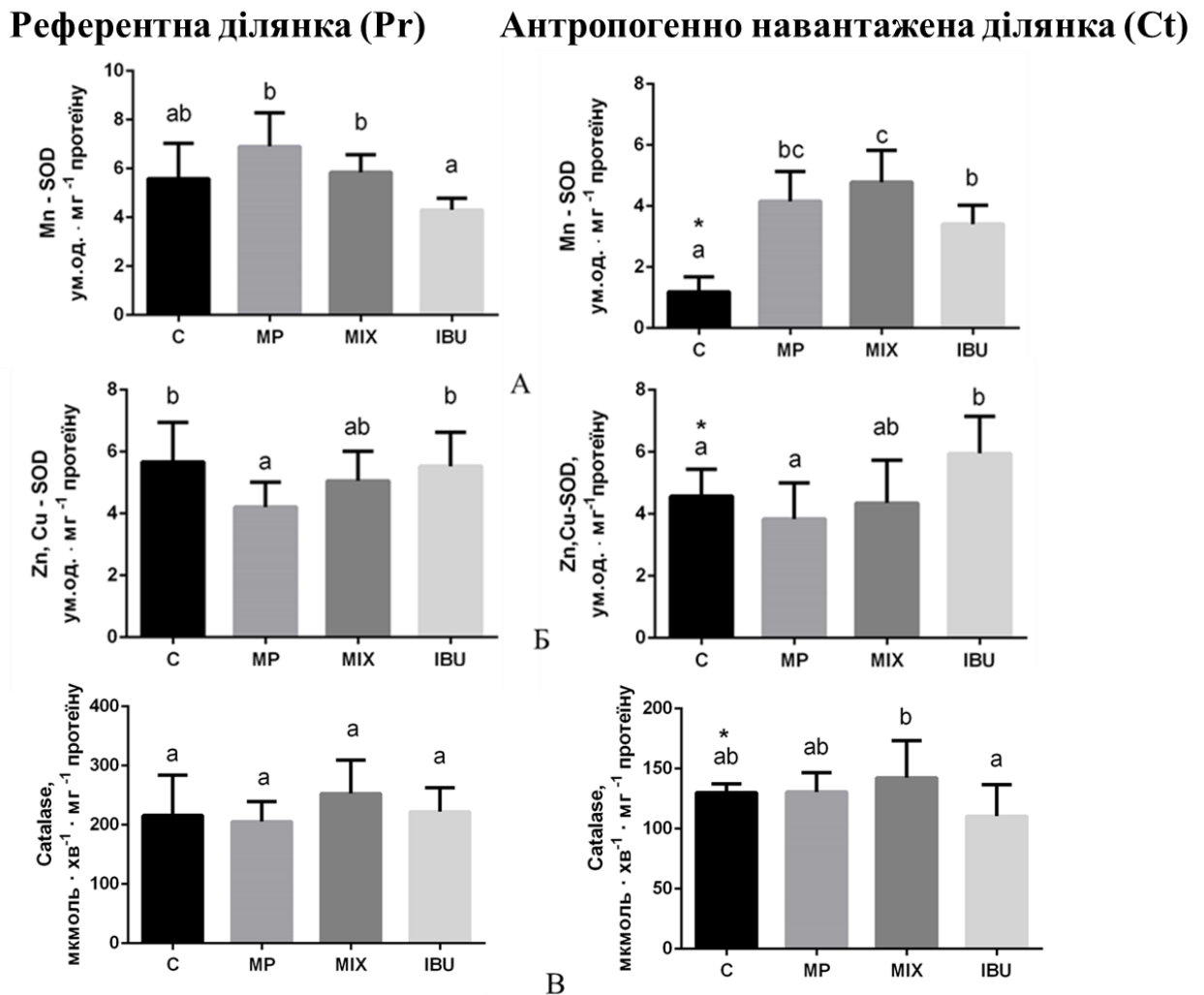


Рис. 3.3.1.1. Антиоксидантна активність у травній залозі *U. tumidus* із чистих та забруднених ділянок після експериментального впливу мікропластику (MP), ібупрофену (IBU) та їх суміші (Mіx): А – активність Mn-SOD; Б – активність Cu, Zn-SOD; В – активність каталази, $M \pm SD$, $n=8$

За впливу MP, ібупрофену та їх суміші молюски з двох популяцій проявляли різну здатність до реакції окисного стресу. Найпомітнішими змінами в активності Mn-SOD було зростання (на 23,4%), у групі із референтної місцевості за впливу MP, та у всіх експонованих групах з

антропогенно навантаженої території (на 185-300%). У групі із референтної місцевості за дії МР спостерігали також зменшення активності Cu,Zn-SOD, що була специфічною реакцією лише у цій групі. Активність каталази знижувалася лише в групі з антропогенно навантаженої місцевості за впливу ібупрофену (на 15,1%).

Вплив ксенобіотиків не викликав значних змін у рівні TBARS, але концентрація карбонілів протеїнів зазнавала протилежних змін у групах з антропогенно навантаженої місцевості, як для спільної дії ксенобіотиків, так і за впливу ібупрофену (зниження на 26 і 37% відповідно) та у групі з умовно чистої місцевості на яку діяли сумішшю (зростаючи на 50%) і не змінювалася в експозиціях до МР (Рис. 3.3.1.2).

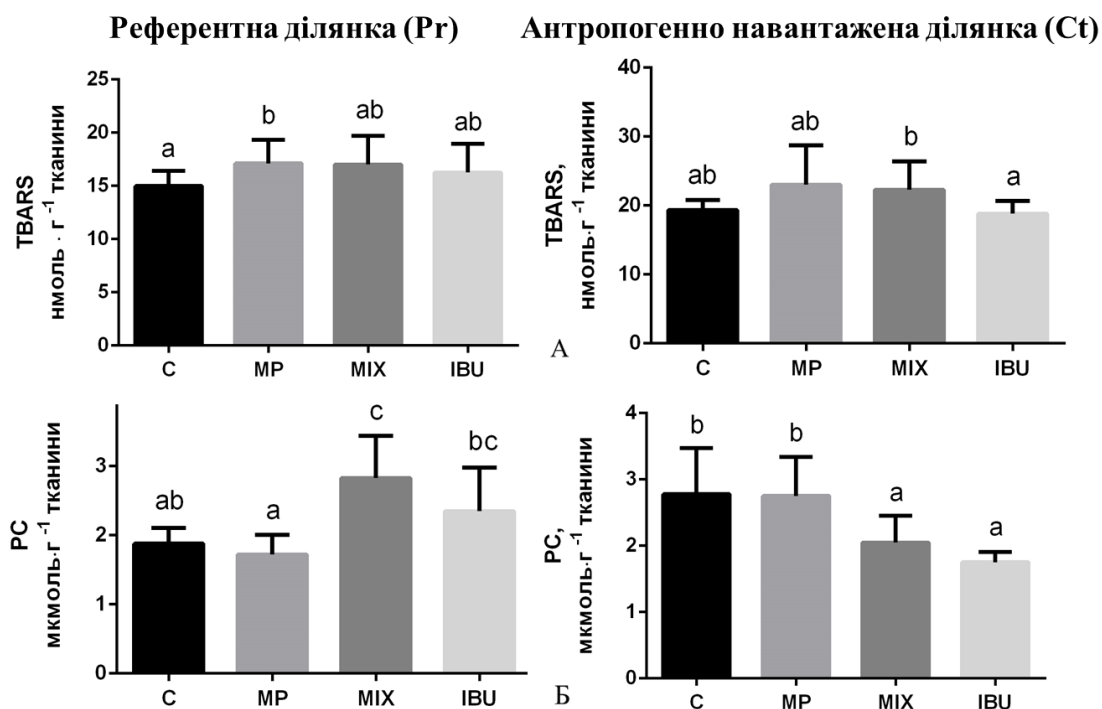


Рис. 3.3.1.2. Окисне ураження травної залози *U. tumidus* з антропогенно навантаженої та референтної ділянок за експериментального впливу мікропластику (MP), ібупрофену (IBU), та їх суміші (Mix): А - рівень перекисного окиснення ліпідів (TBARS); Б - концентрація білкових карбонілів (PC), $M \pm SD$, $n=8$.

Відтак, залежно від популяції, у молюсків проявлялись ознаки пригнічення (Pr-популяція), або активації (St-популяція) антиоксидантного

захисту, які були найбільше виражені за впливу МР, або ібупрофену відповідно. Ці результати не дають можливості виокремити індикаторні показники впливу МР окремо та у суміші.

Концентрація GSH, а також співвідношення GSH/GSSG є маркером окислювального стресу та окисно-відновного гомеостазу клітини. У контрольній групі з антропогенно навантаженої території рівні GSSG та GSH були приблизно у два рази вище (Рис. 3.3.1.3) ніж у групі із референтної місцевості.

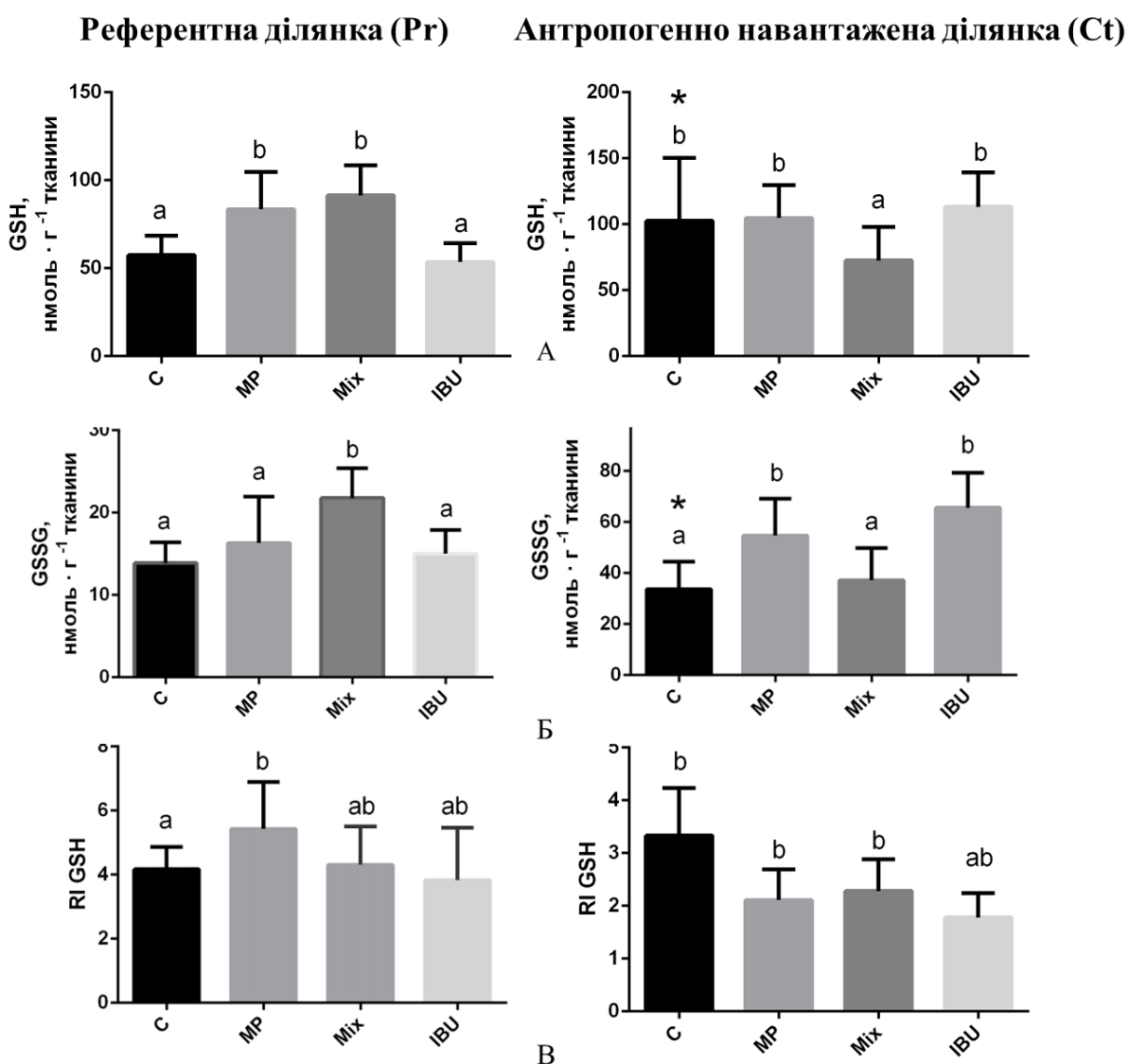


Рис. 3.3.1.3. Концентрація глутатіону А – відновленого (GSH); Б – окисненого (GSSG), В – редокс-індекс глутатіону (RI GSH) у травній залозі *U. tumidus* з двох популяцій за впливу, мікропластику (MP), ібупрофену (IBU) та їх суміші (Mix), $M \pm SD$, $n=8$.

Проте рівень RI GSH у контрольних групах не відрізнявся. У молюсків з референтної території за дії МР та суміші концентрація GSH та GSSG зростала зі збільшенням RI GSH за впливу МР. У групах з антропогенно навантаженої території, навпаки, вміст GSH зменшувався за впливу суміші, а вміст GSSG зростав за впливу МР та ібупрофену. Проте вірогідних змін RI GSH не було відзначено.

Дія експериментальних чинників за показниками відновного статусу (Рис. 3.3.1.4) тканини проявився по-різному щодо окисненої та відновленої форм нікотинамідного коензиму у двох популяціях.

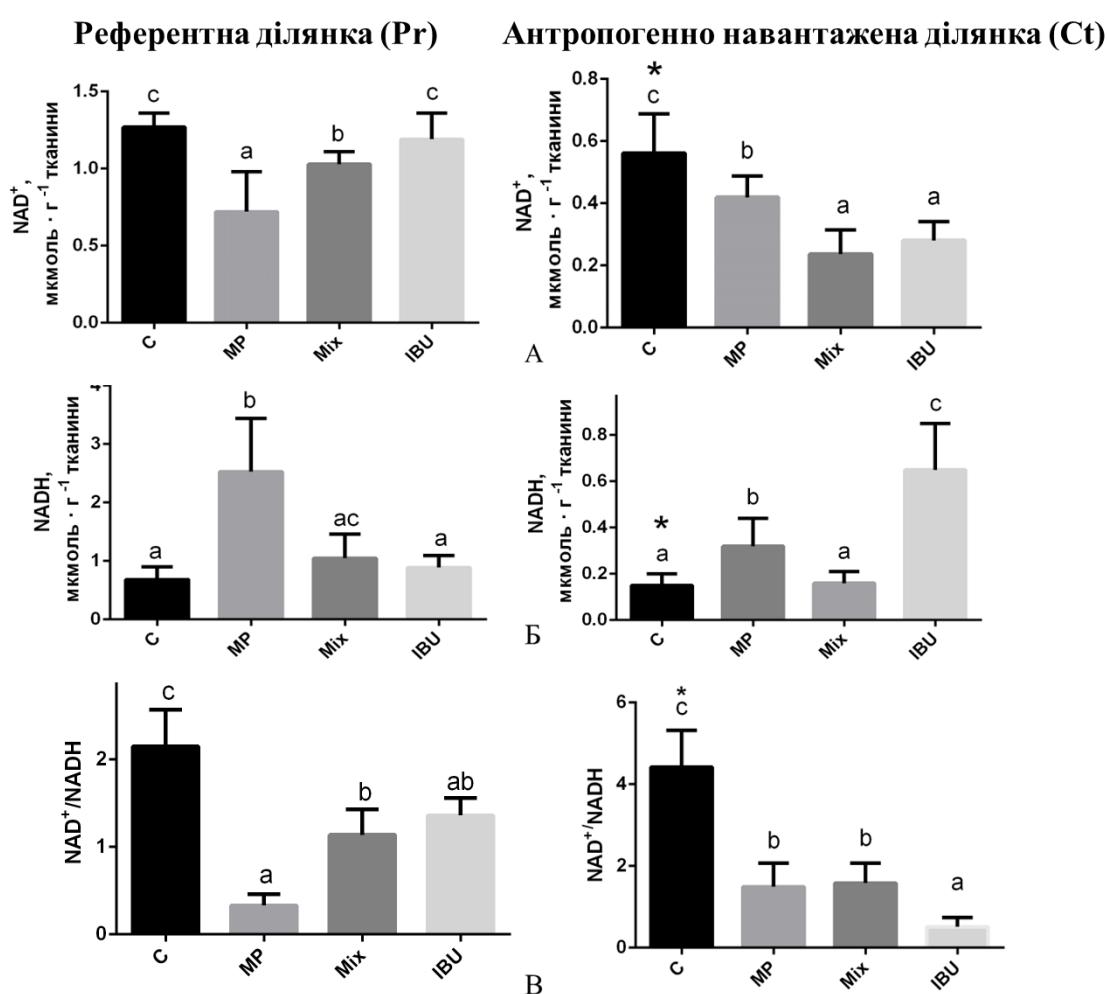


Рис. 3.3.1.4 Вміст коензиму нікотинамідаденіндинуклеотиду в організмі *U. tumidus* з двох популяцій за впливу на організм мікропластику окремо (MP), у поєднанні з ібупрофеном (Mix), та ібупрофену окремо (IBU): А – окисненого (NAD⁺) Б – відновленого (NADH) В – баланс окисненого та відновленого NAD (NAD⁺/NADH), M±SD, n=8.

Так, у організмів із референтної місцевості МР та суміш викликали зменшення вмісту NAD^+ , тоді як у молюсків з антропогенно навантаженої території дія усіх чинників знижувала вміст окисненої форми коензиму. Концентрація $NADH$ в організмів з антропогенно навантаженої території зростав за впливу МР та ібупрофену, а у молюсків із референтної збільшувалась вдвічі за впливу суміші та ібупрофену. Відповідно, в організмів з антропогенно навантаженої зони відновний статус NAD^+ зростав удвічі та більше в обох популяціях за впливу всіх експериментальних чинників.

Перебування у забрудненому середовищі викликає в організмі стрес, який може проявлятися по-різному в залежності від тривалості та інтенсивності чинника (Stoliar and Lushchak, 2012). Отримані результати свідчать, про те, що система метаболічного контролю у травній залозі двостулкових молюсків чутливо реагує на мінливі фактори зовнішнього середовища, зокрема, забруднення води ксенобіотиками, забезпечуючи відновний потенціал у тканині (Столяр та ін., 2016). Дані щодо здатності підтримувати відновний баланс у двостулкового молюска залежно від преадаптації у популяції отримано вперше.

3.3.2 Вплив мікропластику розміром 2 мкм окремо та спільно з саліноміцином за двох температурних режимів на стан системи антиоксидантного захисту

Оцінка стану системи антиоксидантного захисту молюсків (*Рис. 3.3.2.1*) не виявила помітних змін в активності SOD та рівні утворення продуктів окисного ураження ліпідів за впливу як МР, так і саліноміцину. Разом з тим, за впливу сумішей активність мітохондріальної Mn-SOD була значно вища за активність цитозольної, тоді як активність Cu,Zn-SOD пригнічувалася за впливу суміші.

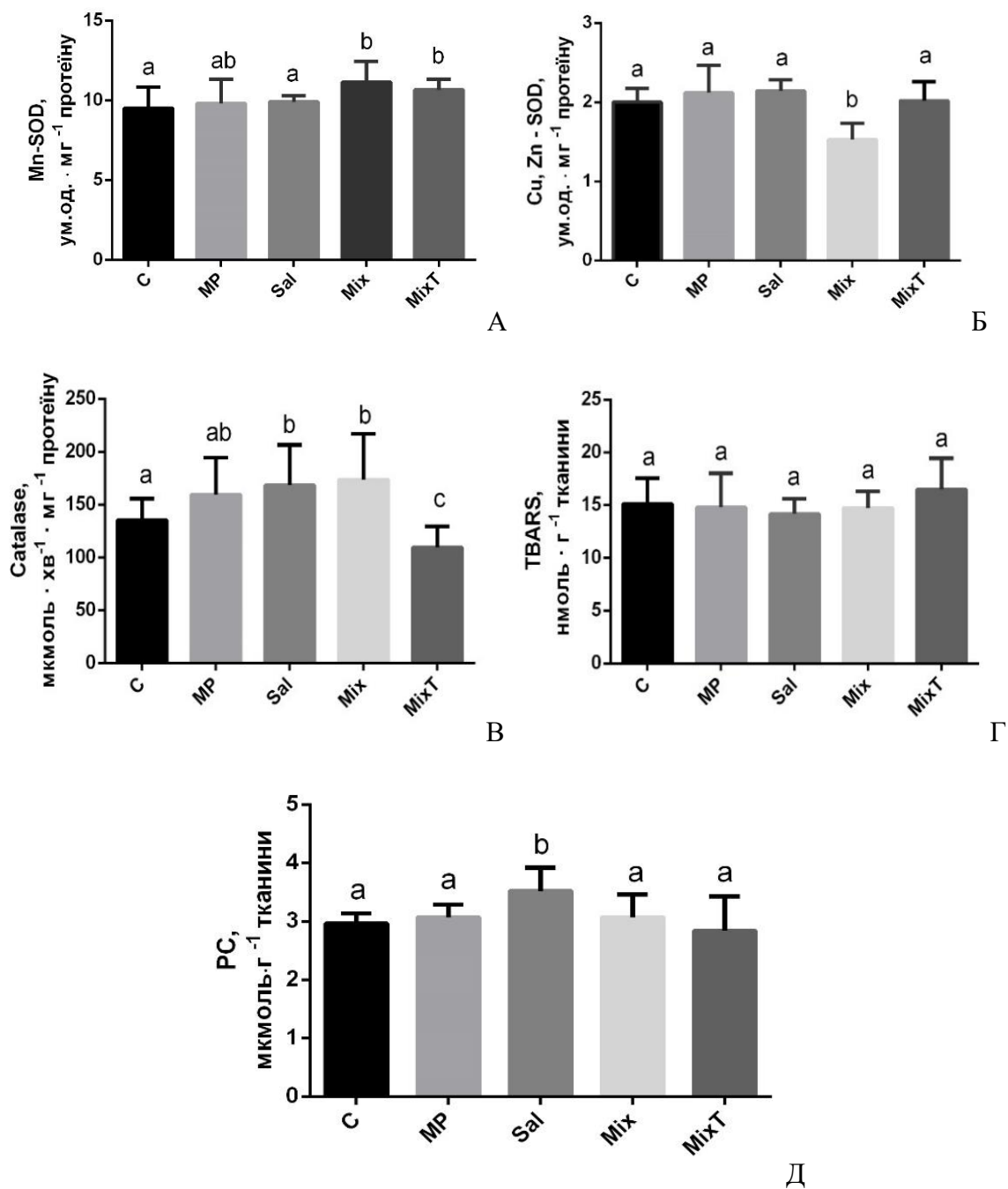


Рис. 3.3.2.1 Характеристика реакції окисного стресу у травній залозі молюска *U. tumidus* за впливу на організм мікропластику (MP), саліноміцину (Sal), їх суміші за температури 18°C (Mix) та (MixT) 25°C. Ензимна активність Mn-SOD (A), Cu,Zn-SOD (Б), каталазна (В), рівень окисних ушкоджень ліпідів (TBARS) (Г) та протеїнів(PC) (Д), $M \pm SD$, $n=8$.

Активність каталази зростала за впливу саліноміцину та суміші за температури 18°C, проте зменшувалась порівняно з контролем за температури 25°C, а рівень окисних модифікацій протеїнів зростав лише за впливу

саліноміцину. Збільшення PC на 19% (Рис. 3.3.2.1 Д), як необоротна окислювальна модифікація, виявлена специфічно за впливу саліноміцину, може бути проявом пригнічення аутофагії та лізосомальної деградації.

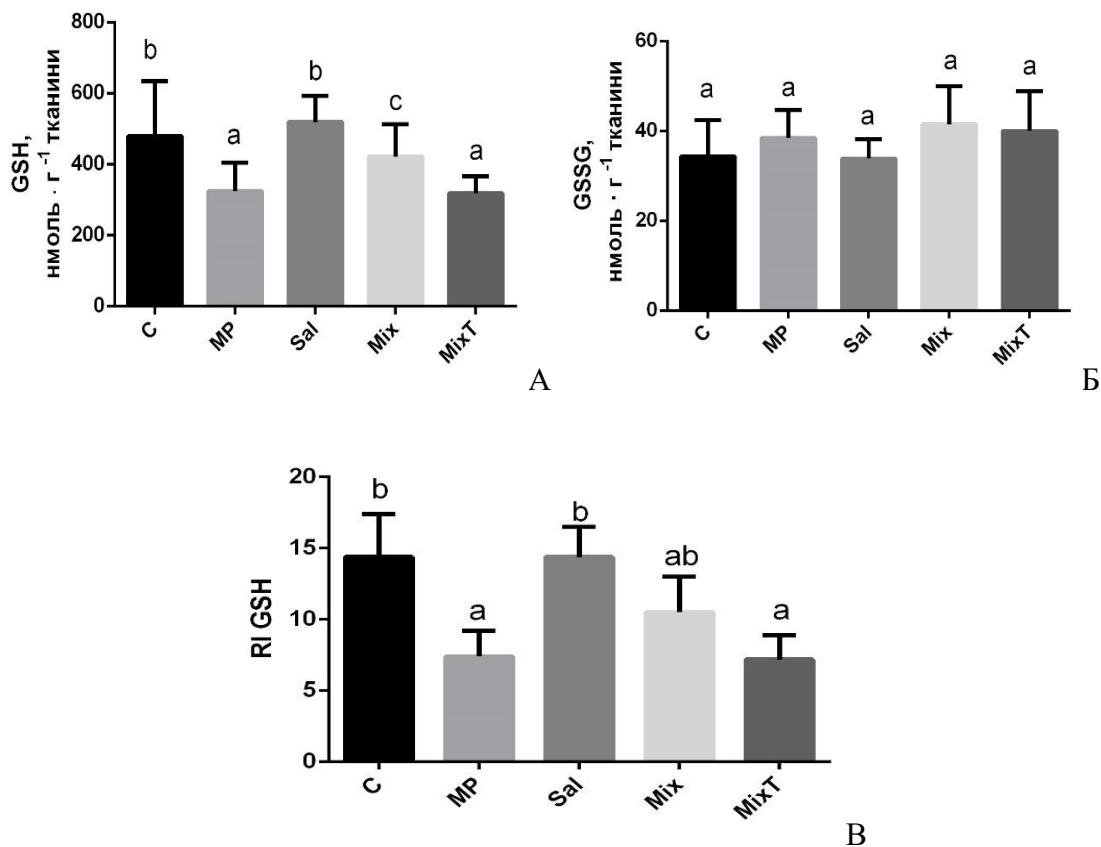


Рис. 3.3.2.2. Характеристика стану системи глутатіону у травній залозі *U. tumidus* після 14 днів експериментального впливу мікропластику (MP), саліноміцину (Sal) та їх сумішей при температурах 18° C (Mix) та 25° C (MixT): А – GSH; Б – GSSG; В – RI GSH, $M \pm SD$, $n=8$.

Характеристика стану глутатіону в травній залозі (Рис. 3.3.2.2 А, Б, В) показала, що рівень GSH не змінювався при дії саліноміцину і знижувався порівняно з контролем на $\approx 36-37\%$ у групах на які діяли сумішшю та за підвищеної температури. Однак концентрація GSSG залишалась в межах контрольного рівня у всіх групах. Відповідно RI GSH знижувався за дії MP та спільній дії ксенобіотиків та за підвищеної температури (до 50%).

Реакція нікотинамідних коензимів за впливу MP малого розміру, саліноміцину окремо та у поєднанні виявилась такою ж як і за впливу MP

великого розміру, ібупрофену та їх суміші – це зменшення співвідношення $NAD^+/NADH$, а відтак, зростання відновного стану у тканині (Рис. 3.3.2.3). Причому, за підвищеної температури вплив суміші викликав різке зменшення обох форм коензиму порівняно з контролем, демонструючи виснаження системи енергетичного забезпечення тканини.

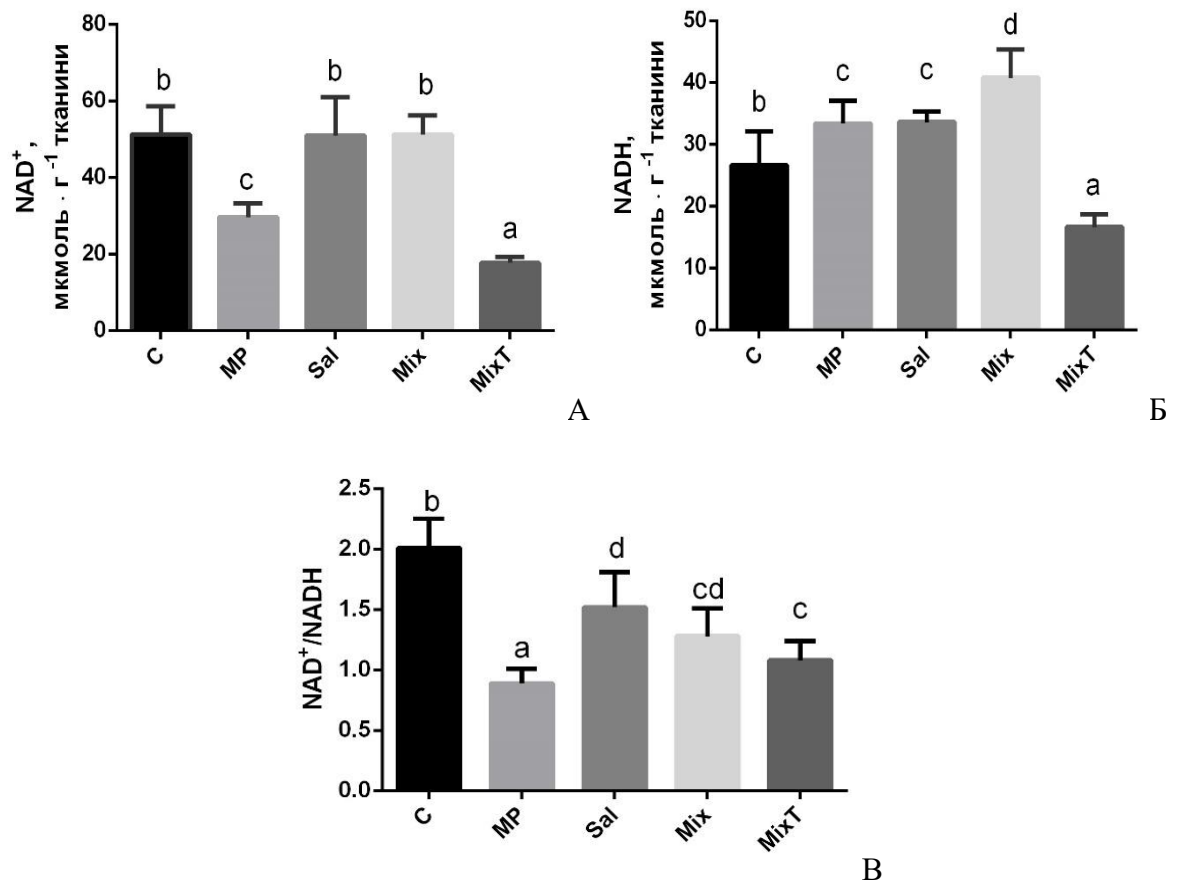


Рис. 3.3.2.3. Концентрація окисненого та відновленого коензиму нікотинамідаденіндинуклеотиду (NAD^+ та $NADH$) та баланс окисненого та відновленого NAD^+ ($NAD^+/NADH$) в організмі *U. tumidus* за впливу на організм мікропластику (MP), саліноміцину (Sal) та їх суміші при температурах 18° C (Mix) та 25° C (MixT), $M \pm SD$, $n=8$.

Висновок до підрозділу

Відтак, реакція системи окисного/відновного стресу на вплив мікропластику та ібупрофену окремо та у комбінації більше залежала від адаптивного потенціалу, сформованого у популяції ніж від природи діючого чинника. При цьому популяція із референтної місцевості виявилась менш

стресостійкою (за ознаками пригнічення Cu,Zn-SOD та зростанням рівня TBARS). У групах з антропогенно навантаженої території проявлялась малоспецифічна до природи діючого чинника активація SOD та зменшення окисного ураження протеїнів.

MP розміром частинок 2 мкм окремо не викликав змін системи окисного стресу у молюсків. Проте його суміш з саліноміцином, особливо за температури 18°C активувала ензими антиоксидантного захисту Mn-SOD та каталазу, що забезпечувало ефективний захист від окисного ураження біомолекул. Показники системи глутатіону зазнавали більшого ураження за впливу на організм MP меншого, ніж великого розміру. Препарати ібупрофен та саліноміцин за одним виключенням не впливали на стан системи глутатіону. Пригнічення антиоксидантного та відновного захисту за комбінованого впливу (MP+ібупрофен у молюсків з референтної популяції та MP+саліноміцин+теплова дія) в обох експериментах свідчить про перевищення адаптивного потенціалу організму.

Зміщення до відновного стану у тканині характеризує неспецифічну реакцію двостулкового молюска на дію пошкоджуючих чинників, спільну для двох популяцій та всіх розглянутих експериментальних впливів.

Представлені у підрозділі 3.3. результати опубліковано у статтях (Martyniuk et al., 2022; Martyniuk et al., 2023).

3.4. Оцінка токсичності впливу на організм *U. tumidus* мікропластику та фармацевтичних препаратів окремо та у комбінаціях за ознаками апоптозу та лізосомальної функціональності

Показники апоптозу можуть бути корисними як біомаркери токсичності, оскільки апоптоз служить механізмом молекулярного контролю, а отже, забезпечує інформацією про вплив забруднювачів навколишнього середовища та ксенобіотиків на організм (Kiss, 2010).

Отримані результати показали, що існують популяційні особливості активності апоптозу причому у популяції з антропогенно навантаженої ділянки

активність каспази-3, як ключового виконавчого ензиму апоптозу вища ніж в екземплярів з референтної популяції (Рис 3.4.1.). Дія на організм МР (0,1-0,5 мм) у референтній популяції та всіх чинників, досліджених у цій серії у антропогенно навантаженої популяції, не викликає активації каспази-3, проте дія суміші та ібупрофену у референтній популяції істотно зменшила активність цього ензиму.

У експериментальній серії з дослідження МР розміром 2 мкм та супутніх чинників всі експозиції при температурі 18°C викликали збільшення активності каспази-3, максимально за впливу суміші (більше як удвічі), тоді як тепловий вплив нівелював цей ефект суміші (Рис. 3.4.1.).

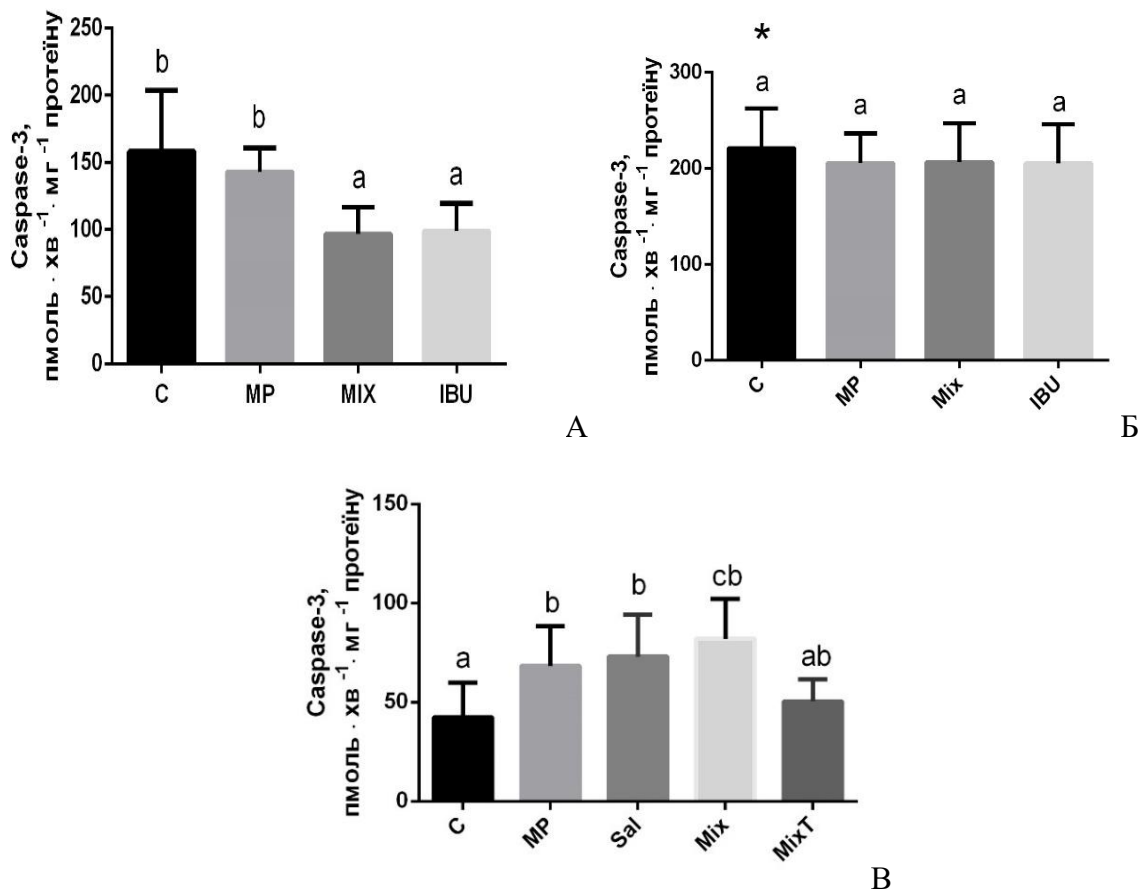


Рис 3.4.1. Активність каспази-3 у травній залозі *U. tumidus* з двох популяцій (А – р. Случ, Б, В – р. Нічлава) за впливу мікропластику розміром 0,1-0,5 мм (MP), ібупрофену (IBU) та їх суміші (Mix) (А, Б) та мікропластику розміром 2 нм (MP), саліноміцину (Sal) та їх сумішей при температурах 18°C (Mix) та 25°C (MixT) (В), $M \pm SD$, $n=8$.

Відтак, активність каспази-3 у травній залозі молюска визначається розміром МР та природою фармацевтичного препарату: МР 2 мкм та саліноміцин окремо та у суміші активує каспазу-3, ібупрофен окремо та за спільної дії з МР пригнічує її активність, а тепловий вплив нівелює ефект суміші МР та саліноміцину.

Інший напрямок керування загибеллю клітин пов'язаний з активністю лізосомальних протеаз. Для аналізу їх внеску у регуляцію клітинного циклу ми дослідили загальну активність катепсину Д (CtD) та активність вивільненого у цитозоль. Результати показали, що у молюсків з двох популяцій вона різна. Так, у референтній місцевості загальна активність катепсину Д (CtDt) молюсків нижча, а її рівень поза лізосомами (CtDe) вищий, ніж у представників з антропогенно навантаженої території (Рис. 3.4.2.).

Референтна ділянка (Pr)

Антропогенно навантажена ділянка (St)

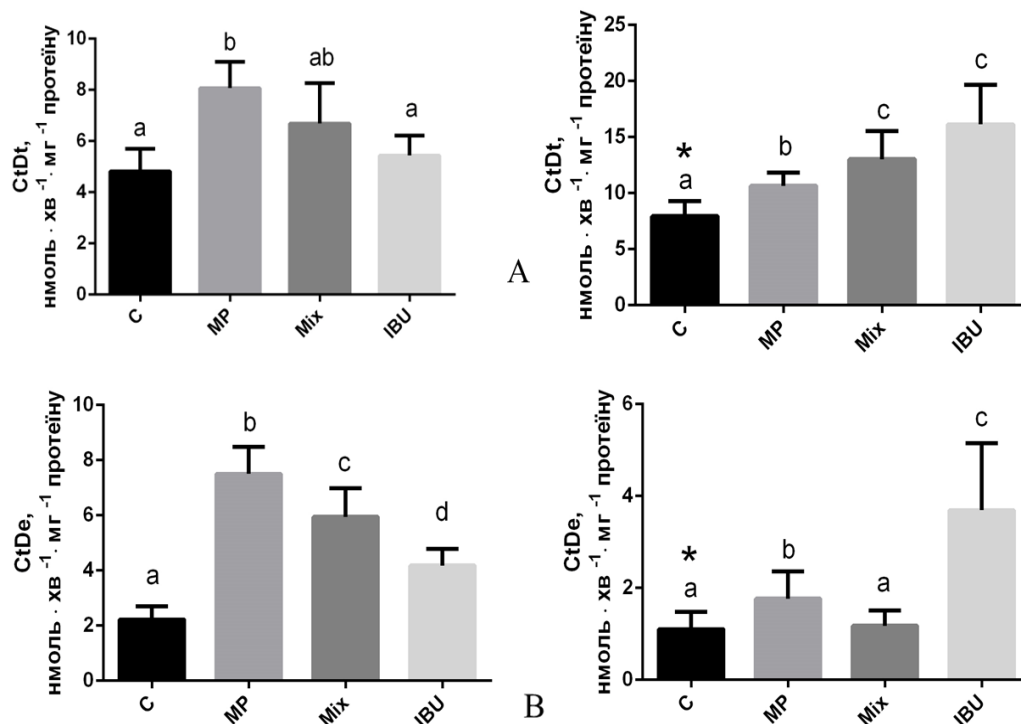


Рис. 3.4.2. Апоптозна активність у травній залозі двостулкового молюска *U. tumidus* з двох популяцій за впливу мікропластику (MP), ібупрофену (IBU) та їх суміші (Mix): А – загальна активність катепсину Д (CtDt); Б – вільна (позалізосомальна) катепсину Д (CtDe), $M \pm SD$, $n=8$.

За впливу МР у референтній популяції та у всіх експериментальних групах з антропогенно навантаженої території активність CtDt зростає. Разом з тим, вихід катепсину у цитоплазму (CtDe) посилюється у всіх експериментальних групах, особливо у МР з референтної популяції (майже у чотири рази) та МР та ібупрофену у популяції із забрудненої ділянки (втричі та більше).

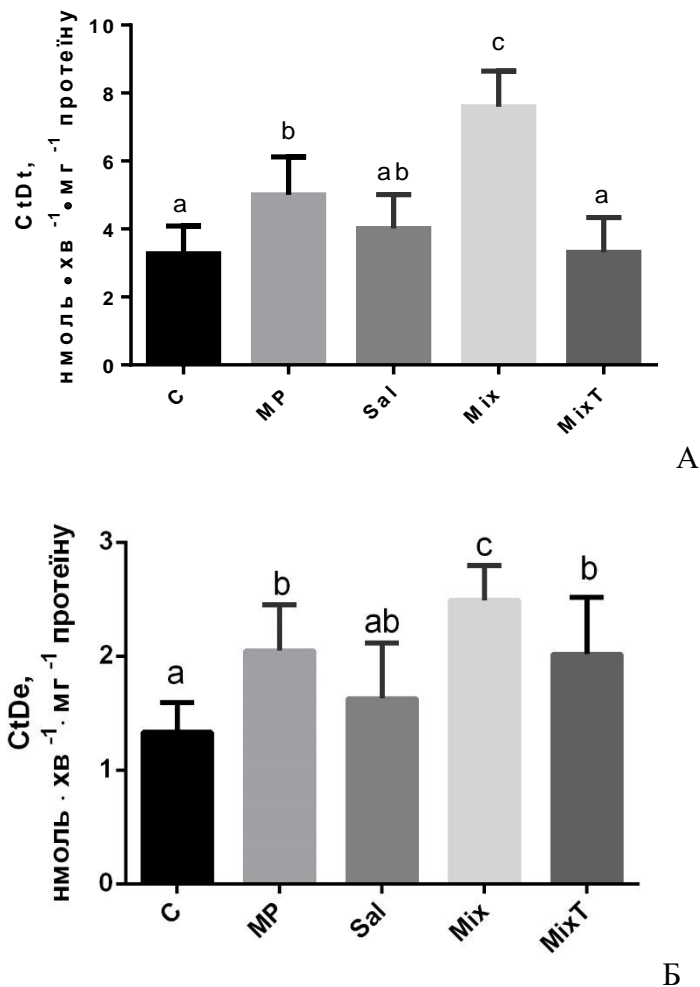


Рис. 3.4.3. Активність катепсину Д загальна (CtDt) (А) та вільна (позалізосомальна) (CtDe) (Б) у травній залозі молюска *U. tumidus* за впливу на організм мікропластику (MP), та саліноміцину (Sal) окремо та у поєднанні за двох температурних режимів 18°C (Mix) та 25°C (MixT), $M \pm SD$, $n=8$.

Порівняння CtDt та CtDe виявило різке зниження лізосомальної активності CtD у всіх експонованих групах (на 52-78%) з референтної

місцевості, тоді як у групах з антропогенно навантаженої ділянки, навпаки, активність лізосомальної форми зростає на 30-82%.

Отже, дія МР розміром 0,1-0,5 мкм посилює активність CtD та його вихід з лізосом, особливо у молюсків із референтної території, тоді як у молюсків адаптованих до антропогенного навантаження, найбільші зміни активності викликав ібупрофен. Варто зазначити, що ці молюски виявили вищу здатність до мобілізації ензиму у лізосомах, тоді як у референтній популяції проявився сценарій пошкодження лізосомальних мембран, що призводить до виходу у цитоплазму гідролаз та руйнування вмісту клітини.

За впливу МР розміром 2 мкм та його поєднання з саліноміцином, як і за впливу МР розміром 0,1-0,5 мкм відзначено активацію катепсину Д та його вихід з лізосом, тоді як саліноміцин окремо не викликає такої реакції (Рис. 3.4.3.).

За підвищеної температури ця закономірність порушується, а посилений вихід ензиму у цитоплазму не поєднується зі зростанням його загальної активності.

Відтак, здатність МР активувати каспазу-3 залежить від його розміру та посилюється лише за впливу МР розміром 2 мкм. Активація катепсину Д та його виходу з лізосом ініціюється МР обох розмірів.

Висновок до підрозділу

Виявлено, що за впливу мікропластику та фармацевтичних препаратів у травній залозі молюска відбуваються значні зміни в активності клітинних систем апоптозу/аутофагії, що визначаються адаптаціями, сформованими у популяції (узгоджена активація каспази-3 та катепсину Д у популяції із забрудненої місцевості) та розміром МР (активація каспази-3 МР розміром 2 мкм). Вплив МР проявляється окремо та у суміші. Ібупрофен активує лізосомальний шлях загибелі клітин, а саліноміцин – узгоджену активацію цитоплазматичного та лізосомального шляхів. Тепловий вплив нівелює реакцію ензимів апоптозу/аутофагії на дію суміші ксенобіотиків.

Представлені у підрозділі 3.4. результати опубліковано у статтях (Martyniuk et al., 2022; Martyniuk et al., 2023).

РОЗДІЛ IV АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

У роботі було досліджено вплив МР як новітнього пріоритетного забруднювача водного середовища, який потрапляє у водойми з побутовими та техногенними стоками (Matozzo et al., 2019). Для дослідження було створено умови, які відповідають екологічно реальним субхронічним експозиціям у навколишньому середовищі, зокрема за розміром частинок, та з урахуванням його поєднання у водоймах з іншими мало прогнозованими за поведінкою ксенобіотиками, такими як фармацевтичні препарати, для яких ймовірний векторний ефект МР, а також екстремальним температурним режимом, та з урахуванням особливостей адаптивного потенціалу, сформованого у певній природній популяції. Для аналізу ми обрали показники окисного/редукційного стресу із залученням аналізу низькомолекулярного тіолому з огляду на належність моллюсків до факультативних анаеробів, для яких властиві пластичні зміни відновного стану (Yang et al., 2015). Разом з тим, редукційний стрес є порушенням окислювально-відновного стану, який пов'язаний із підвищенням рівня відновних еквівалентів і пригніченням знешкодження АФК, що може порушувати процеси сигналювання, викликати мітохондріальну дисфункцію, посилювати апоптоз та зменшувати виживання клітин (Maity et al., 2016; Handy and Loscalzo, 2017). При цьому, власне низькомолекулярні тіоли глутатіон та металотіонеїни поєднують каталітичну активність в унікально великому діапазоні можливостей дисоціації тіолової групи цистеїну, завдяки чому виступають транспортерами есенціального цинку та регуляторами його розподілу у клітинах, гасниками радикалів та стабілізаторами просторової структури макромолекул протеїнів, діючи таким чином як редокс-перемикачі (Bozhkov et al., 2021). Для оцінки наслідків впливу модельних чинників на організм моллюска було також залучено дослідження ензимів апоптозу/аутофагії.

4.1. Спільні реакції стресу та цитотоксичності молюсків за експериментальних умов

Не зважаючи на створення у нашому експерименті умов, що за концентрацією ксенобіотиків, температурним режимом, субхронічною тривалістю та залученням організмів, адаптованих до різних умов антропогенного тиску у природних популяціях, було виявлено низку реакцій організму, спільних для всіх або більшості модельних схем (Табл. 4.1.1).

Зокрема, у всіх дослідних групах відзначалось від однієї до трьох (максимальна кількість) ознак збільшення відновного балансу нікотинамідних коефіцієнтів. Лише у трьох з 10 моделей, дві з яких стосуються впливу ібупрофену та його суміші у референтній популяції, не було виявлено вірогідного зменшення балансу NAD^+/NADH у тканині. Відтак, ця реакція чутливо відбиває здатність факультативного анаероба забезпечувати відновний статус у тканині.

Водні безхребетні використовують різні схеми метаболічних реакцій для підтримки окисно-відновного балансу та забезпечення енергією (de Zwaan, 1983). Окисно-відновне співвідношення (NAD^+/NADH) у двостулкових молюсків може регулюватися концентрацією лактату, малату або октопіну, і було виявлено, що воно зменшується в міру накопичення цих продуктів (Fields and Quinn, 1981). Традиційно його оцінюють за співвідношенням вмісту лактату і пірувату. Наприклад, було показано, що підвищене співвідношення лактат/піруват є загальною реакцією двостулкових молюсків на вплив низьких концентрацій ібупрофену (0,25 мкг/л), триклозану (500 нг/л) або естрону (100 нг) протягом 14 днів (Falfushynska et al., 2014). Проте така характеристика не вважається достатньо адекватною для оцінки відновного потенціалу у тканинах (Zhu et al., 2012). Натомість безпосередні дані про стан відновного балансу нікотинамідних коензимів у безхребетних тварин обмежені. Зокрема повідомлялося про зниження співвідношення NAD^+/NADH приблизно з 2,5 до 1,1 для прісноводного краба *Sinopotamon henanense*, який протягом 10 днів піддавався впливу різних концентрацій CdCl_2 (Yang et al., 2015). Аналогічно,

окислювально-відновне співвідношення NAD^+/NADH ситої мухи *Drosophila melanogaster* становило приблизно 8 і знизилося після 10 годин голодування приблизно до 4 (Zhu et al., 2012).

Вміст і співвідношення нуклеотидних коензимів у тканині (NAD^+/NADH) вказують на її метаболічну активність, зокрема функціонування окисного фосфорилування у мітохондріях. Відомо, що рівень NAD^+ є критичним для мітохондріальних функцій. Цитоплазматичне співвідношення NAD^+/NADH у еукаріотичних клітинах відповідає межам 60-700, рівень мітохондріального NAD^+ повинно бути значно вищим, ніж цитоплазматичний рівень, проте, в клітинах у загальному співвідношення NAD^+/NADH має значення 7-8. Відзначене нами зменшення концентрації NAD^+ свідчить про пригнічення аеробних процесів з використанням цього головного окисника клітинного дихання та, відповідно, про редукційний стрес. Така закономірність особливо виражена при несприятливих ефектах у ссавців (Xiao and Loscalzo, 2020). У людини відновлювальний стрес, викликаний надмірними рівнями NADH і GSH , може бути таким же шкідливим, як і окислювальний стрес, та може спричинити несприятливі наслідки для клітинних молекул (Kültz, 2003; Xiao and Loscalzo, 2020), наприклад, у нейродегенеративних захворюваннях, старінні та пухлиногенез (Stein and Imai, 2013; Caudal et al., 2019; Amjad et al., 2021). Зокрема, відновлення тіолів у складі протеїнів породжує таке явище як стрес ендоплазматичного ретикулуму (Ellgard et al., 2018), за якого відновлюються дисульфідні групи у протеїнах, порушуючи їх тривимірну укладку, функції шаперонів, транспортування в інші компартменти, а відтак, запускаючи екстрену програму під назвою «Відповідь розгорнутого протеїна». Було доведено, що підтримання відновного балансу NAD^+/NADH у клітинах опосередковано глутатіоном (Zhang et al., 2012). Проте у ектотермних тварин зміни редокс потенціалу можуть мати адаптивний характер.

Щодо адаптивного спрямування редокс-балансу за впливу несприятливих чинників у нашій роботі, ми не виявили зв'язку зі змінами у концентрації та редокс статусі глутатіону або карбонілюванні протеїнів та NAD^+/NADH

співвідношенням. Проте, у більшості груп спостерігалось збільшення кількості цинку, акумульованого металотіонеїнами, що, в свою чергу, свідчить про посилення редокс-потенціалу їх тіолових груп, які утримують іони металу у тіолатних кластерах (Krężel and Maret, 2021). Крім того, важливою видається наявність залежності між $NAD^+/NADH$ потенціалом та проявами активності позалізосомального катепсину Д, вихід якого посилюється у більшості модельних груп, що свідчить про активацію процесів елімінації ушкоджених клітин.

Загалом, значення вмісту $NAD^+/NADH$ у холоднокровних тварин досліджувалося лише в окремих роботах, тому отримані нами результати є дуже важливими для накопичення наукового досвіду. У проведеному дослідженні саме ці результати дозволяють найбільш чутливо оцінити загальні адаптаційні реакції організму на вплив експозицій.

Іншою ознакою, яка була спільною для всіх досліджених груп у експерименті з МР та саліноміцином, є зменшення співвідношення вмісту Zn/Cu у тканині (Табл. 4.1.1), яке відображає дисбаланс есенціальних металів. Слід відзначити, що вміст есенціальних металів цинку та купруму визначається у тканинах двостулкових молюсків у досить великому колі робіт (Zuikov et al., 2013), проте співвідношення вмісту цих есенціальних металів не обчислюється. Разом з тим така ознака добре відома у діагностиці патологій у людини, коли порушення співвідношення Zn/Cu в сироватці крові вказує на запалення (Kazi Tani et al., 2021). Досвід лабораторії свідчить про доречність таких вимірів і для двостулкових молюсків. Так, для молюсків *U. tumidus* було показано зниження співвідношення Zn/Cu під впливом пестициду Раундапу протягом 14 днів (Khoma et al., 2021), а для *D. polymorpha* – під дією МР, кофеїну, нагрівання та за поєднання цих факторів (Matskiv and Stoliar, 2023). Наслідками цього дисбалансу можуть бути спотворення сигнальних функцій Zn (Atrián-Blasco et al., 2017). Важливо, що цей дисбаланс супроводжувався збільшенням концентрації Zn -МТ, тобто посиленням депонування цинку у тканині. Подібним чином концентрація Zn -МТ зростала у травній залозі морської мідії

M. galloprovincialis під дією на організм МР (1 мг/л, розмір 35-50 мкм) протягом 14 днів (Impellitteri et al., 2023).

Таблиця 4.1.1.

Схема реакцій досліджуваних показників за впливу мікропластику (МР, 0.1–0.5 мм та 2 мкм), фармацевтиків ібупрофену (IBU) та саліноміцину (Sal) та їх комбінацій при температурі 18°C (Mix) та 25°C (MixT) на організм *U. tumidus* з антропогенно навантаженої (Ct) та референтної (Pr) місцевостей за характеристиками травної залози при субхронічному експерименті

Групи/ Показни- ки	МР Pr (0.1– 0.5 мм)	МР Ct (0.1– 0.5 мм)	МР Ct (2 мкм)	MIX Pr (0.1– 0.5 мм)	MIX Ct (0.1– 0.5 мкм)	MIX Ct, (2 мкм)	MixT, Ct (2 мкм)	IBU, Pr	IBU, Ct	Sal Ct
NAD	↓	↓	↓	↓	↓	=	↓	=	↓	=
NADH	↑	↑	↑	↑	=	↑	↓	=	↑	↑
NAD/NA DH	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Mn-SOD	↑	↑	=	↑	↑	↑	↑	=	↑	=
Cu,Zn- SOD	↓	=	=	=	=	↓	=	=	↑	=
Cat	=	=	=	=	=	↑	↓	=	↓	↑
TBARS	↑	=	=	=	↑	=	=	=	=	=
PC	=	=	=	↑	↓	=	=	↑	↓	↑
GSH	↑	=	↓	↑	↓	↓	↓	=	=	=
GSSG	↑	↑	=	↑	=	=	=	=	↑	=
RI GSH	↑	=	↓	=	=	↓	↓	=	=	=
MT-SH	↓	↑	↑	↓	↓	=	↓	↓	↓	↑
Zn-MT	=	=	↑	↑	=	↑	↑	↓	=	↑
Cas-3	=	=	↑	↓	=	↑	=	↓	=	↑

Продовження таблиці 4.1.1

Групи/ Показни- ки	MP Pr (0.1– 0.5 мм)	MP Ct (0.1– 0.5 мм)	MP Ct (2 мкм)	MIX Pr (0.1– 0.5 мм)	MIX Ct (0.1– 0.5 мкм)	MIX Ct, 2 мкм	MixT, Ct 2 мкм	IBU, Pr	IBU, Ct	Sal Ct
CtDe	↑	↑	↑	↑	=	↑	↑	↑	↑	=
CtDt	↑	↑	↑	↑	↑	↑	=	=	↑	=
Zn t	=	↑	↓	↑	↑	↑	↓	↑	=	=
Cu t	x	x	↑	x	x	↑	↑	x	x	↑
Zn/Cu	x	x	↓	x	x	↓	↓	x	x	↓

Примітка.

↑↓	Ознаки редукційного стресу	↑↓	Ознаки окисного стресу	↑↓	Активация апоптозу/ аутофагії	↑↓	Пригнічення апоптозу/ аутофагії
↓, ↑, =				збільшення, зменшення, або відсутність змін порівняно з відповідним контролем			

Як відомо, іони металів перемінної валентності, зокрема і купруму, знаходяться у фізіологічних умовах у клітинах у максимально відновленому стані, що забезпечується внутрішньоклітинним редокс потенціалом та, у свою чергу, зумовлює їх хелатування та реалізацію біологічних функцій. Проте ми не виявили залежності між станом характеристик антиоксидантного захисту, зокрема активністю Cu,Zn-SOD, що забезпечується, та балансом Zn/Cu у дослідних групах. Отже, збільшений вміст купруму не мав прооксидантного впливу у цьому дослідженні молюсків, що і відповідає високому відновному потенціалу, виявленому нами у тканині перлівниці.

Купрум є важливим есенціальним металом у більшості молюсків та ракоподібних у складі дихальних пігментів (гемоціанін) та ензимів імунореактивності (фенолоксидаза) (Kato et al., 2018). Відповідно, зростання

його концентрації та зменшення співвідношення Zn/Cu у травній залозі як депонувальній тканині свідчить про залучення цього механізму у реалізацію загального адаптаційного синдрому перлівниці.

Аналогічний механізм гомеостатичної регуляції вмісту купруму був продемонстрований і у хребетних тварин, причому багаторазове збільшення іонів міді в мітохондріях і ендоплазматичному ретикулумі клітин печінки не супроводжувалося значними змінами в антиоксидантному захисті, але поєднувалося з акумуляцією купруму у складі металотіонеїнів. При цьому, спостерігались вікові відмінності в резистентності, адаптивності та довгостроковій дії іонів купруму (Vozhkov et al., 2021).

Відтак, нами були виявлені неспецифічні біохімічні зміни у функціонуванні травної залози моллюска, які характеризують його чутливість до змін середовища і здатність пластично пристосовуватись до них.

4.2. Залежність біохімічних реакцій організму на вплив мікропластику залежно від його розмірів

Порівняльні дослідження впливу МР різного розміру на організм свідчать, що МР найменшого розміру або нанопластик є більш руйнівним, ніж більші частинки (Lu et al., 2022). Зокрема, було показано, що клітини мають тенденцію поглинати переважно полістерен меншого розміру (20 порівняно з 200 нм), і ці частинки локалізуються у лізосомах і мітохондріях. Проте частинки обох розмірів посилюють цитотоксичність метилртуті (MeHg) (Lu et al., 2022). Відповідно, для частинок малого розміру ймовірність контактів з живими тканинами набагато більш ймовірна, а, завдяки малому розміру вони можуть легше проникати через біологічні бар'єри у м'які тканини (Ward et al., 2019; Beiras and Schönemann, 2020). Така закономірність була підтверджена, наприклад, у дослідженнях нематоди *C. elegans* під впливом МР розміром 1 і 5 мкм (107 та 1010 часток/м² відповідно) за фізіологічними характеристиками (Shang et al., 2020). Переважне поглинання МР меншого розміру, що сприяє більшому потенціалу утримання, також було виявлено Batel та ін., (2018) у

риби *D. rerio*. Проте в організмі двостулкового молюска здатність до акумуляції МР визначається не лише його потраплянням, але й великою інтенсивністю виведення з організму, що викликає скепсис щодо суттєвого впливу МР на організм молюска (Parolini et al., 2020).

У нашому дослідженні ми використовували МР з однаковою масовою концентрацією 1 мг/л, проте розрахована кількість частинок у воді становила $2,4 \cdot 10^8$ частинок/л для пластику розміром 2 мкм і 15-1900 (у середньому 850) одиниць для пластику розміром 0,1-0,5 мм. У прісних водах, що є первинним реципієнтом частинок пластику та, відповідно, містять частинки більшого розміру, ніж морська вода, концентрація частинок становить близько 0,003-24 частинки/л (Rodrigues et al., 2018; Bordós et al., 2019). У нашому дослідженні було підтверджено, що такі частинки акумулюються у м'яких тканинах молюска з максимумом на 10-12 доби інкубації, причому нами було показано, що за відсутності годівлі, їх концентрація в тілі значно перевищує таку, що міститься у молюсках з природних антропогенно модифікованих водойм. Ми не проводили ідентифікацію вмісту в організмі молюска частинок розміром 2 мкм, оскільки такі дослідження взагалі не практикуються. Загалом визнається, що частинки розміром 1-10 мкм не ідентифікуються кількісно у прісних водах (Beiras and Schönemann, 2020), а у тканинах молюска ще й існує проблема їх відокремлення від органічного вмісту. Тому ми не ставили задачі визначити їх концентрацію у тканинах молюска. Проте їх рівномірний розподіл у водному середовищі був проілюстрований нами за допомогою оптичних методів (Рис. 3.1.2).

Порівняння впливу МР різного розміру на молюсків з однієї популяції (р. Нічлава, антропогенно навантажена територія) демонструє, що за впливу МР 2 мкм у молюсків більш помітно виражені ознаки редукційного стресу (діапазон змін співвідношення $NAD^+/NADH$), як окремо, так і за комбінованої дії. Лише МР 2 мкм збільшує вміст протеїну металотіонеїну, тобто складових редокс-буферу клітинного тіолому, тоді як МР 0,1-0,5 мм викликає його зменшення. З іншого боку, за впливу МР 0,1-0,5 мм спостерігаються різні ознаки окисного

стресу, як за окремої дії, так і у поєднанні в обох популяціях молюсків. Лише МР 2 мкм активує узгоджено ензими апоптозу/аутофагії (каспазу-3, катепсин Д загальний та позалізосомальний), тоді як МР 0,1-0,5 мм активує лише катепсин Д та посилює його вихід з лізосом в обох популяціях.

Разом з тим, МР обох розмірів за дії поокремо викликає окисні зміни у системі глутатіону. Проте важливо, що вміст цинку в металотіонеїнах здебільшого зростає, що свідчить про високий відновний потенціал їх тіолів, що утримують метал у тіолатних кластерах та забезпечують його резерв у клітинах навіть за зниження загального вмісту цинку у тканині (Krężel and Maret, 2021). Відтак, можна заключити, що МР за низкою ознак окисного/редукційного стресу та апоптозу/аутофагії реалізує помітну і диференційовану залежно від розміру частинок дію на біохімічні процеси у організмі двостулкового молюска. При цьому МР більшого розміру має більш виражений прооксидантний вплив, ймовірно внаслідок механічної дії частинок на біологічні структури, а МР малого розміру стимулює узгоджену активність проапоптичних чинників, спрямовану на знешкодження уражених клітин. Такий висновок відповідає і інформації про імуномодуляторні властивості МР малого розміру (Wang et al., 2021).

4.3. Чи спостерігаються ознаки взаємодії між мікропластиком та фармацевтичними препаратами в організмі молюска?

Серед можливих ефектів МР на організм найбільше занепокоєння привертає його здатність взаємодіяти з іншими ксенобіотиками у середовищі чи організмі та модулювати їх біологічну активність. (Brennecke et al., 2016; Barboza et al., 2018; Zhang et al., 2018; Shi et al., 2020a; Sun et al., 2020). Тому ми порівнювали вплив на організм молюска фармацевтичних препаратів окремо (позитивний контроль) та у поєднанні з МР. Було обрано два препарати, які мають гідрофобні властивості та, відповідно, можуть утворювати контакти на поверхні частинок пластику. Крім того, ці фармацевтики належать до найбільш поширених у водоймах та відомі за своїм впливом на систему

окисного стресу та клітинні транспортні системи для металів (Tabrizi, Chiniforoshan and McArdle 2015). Для обох препаратів, ібупрофену та саліноміцину, було виявлено принципову відмінність між дією на організм молюска.

Загалом, реакція на індивідуальний вплив ібупрофену більше залежала від популяції, ніж від природи чинника (Табл. 4.1.1, Рис. 4.3.1). Так, у молюсків з референтної популяції ібупрофен викликав найменші ознаки токсичності серед всіх експозицій. Особливості його впливу, які не виявлялись за комплексної дії, - це відсутність вірогідних змін концентрації NAD^+ та NADH , GSH та GSSG , активності Mn-SOD та CtDt та зменшення вмісту Zn-MT . Разом з тим, у комплексній дії, як і за індивідуального впливу, він зумовлював стабільність редокс індекса глутатіону, ензимів антиоксидантного захисту Cu,Zn-SOD та Cat та підтримував стабільний рівень продуктів TBARS , проте пригнічував активність каспази-3 узгоджено з посиленням карбонілювання протеїнів та посилював акумуляцію цинку у тканині. Відтак, для ібупрофену була властива антиоксидантна дія, а пригнічення ензимів апоптозу узгоджувалось з високим вмістом недепонованого цинку у клітині, який пригнічує, зокрема, активність каспазного каскаду.

Важливо, що пригнічення каспази-3, виявлене виключно в групах PrIBU та PrMix , відповідає інформації про антиапоптичну дію цього нестероїдного протизапального препарату у вищих тварин у фізіологічних концентраціях як *in vitro*, так і *in vivo*, що характеризується як новий, незалежний від цитохрому P450 , протизапальний механізм у хребетних (Smith et al., 2018). Було доведено, що функціонування каспази-3 у травній залозі молюска пов'язане насамперед із дегенеративними процесами (Motta et al., 2013). Відтак, у референтній популяції ібупрофен гальмував ці процеси. Разом з тим, ібупрофен не активував лізосомальний шлях клітинного протеолізу, проте посилював вихід CtD у позалізосомальний простір. Функціональність лізосом є одним із найбільш часто досліджуваних біомаркерів впливу ібупрофену на водних безхребетних. Вплив на молюска *R. philippinarum* 10 мкг/л ібупрофену протягом 35 днів

знижував стабільність лізосомальної мембрани в гемоцитах (Aguirre-Martínez et al., 2013). У нашому дослідженні лізосомальна дисфункція, визначена за вивільненням CtD, свідчить про найвищу чутливість у Pr-популяції, аналогічно як і зміни в активності каспази-3. Ймовірно, у чистій місцевості у молюсків не реалізувались адаптації до забруднення фармацевтичними препаратами на відміну від перлівниць з антропогенно навантаженої території.

MP 0,1-0,5 мм, проявляючи за індивідуальної дії прооксидантні властивості (зниження активності Cat, RI GSH, посилення TBARS), втрачав ці ознаки за поєднаної дії. Проте саме риси, властиві для впливу MP, такі як збільшення концентрацій NAD^+ та NADH, GSH та GSSG та активація лізосомального шляху клітинної деградації проявлялись і за комплексної дії. Відтак, у молюсків референтної популяції за поєданого впливу MP та ібупрофену спостерігався синергічний ефект, причому домінуючим був антиоксидантний вплив ібупрофену, а роль MP проявлялася у поєднанні двох шляхів апоптозу/аутофагії – цитоплазматичного та лізосомального та посиленні відновного стресу. Дискримінантний аналіз ілюструє цей синергічний вплив згідно розташування групи PrMix між групами PrMP та PrIBU (Рис. 4.3.1, Табл. 4.3.1, 4.3.2). Ці результати узгоджуються з даними Santos та ін. (2021), які навели низку прикладів, у яких біонакопичення нестероїдних протизапальних фармацевтиків, у тому числі ібупрофену, було знижено в присутності MP. Подібним чином, при комбінованому впливі полістирольного нанопластику та ібупрофену, дія останнього на водорості *Chlorella pyrenoidosa* була послаблена (Wang et al., 2020). Проте у наведеній роботі використовували вплив високих концентрацій ібупрофену (5-100 мг/л) протягом 96 год, які викликали прооксидантні зміни. Відповідно дія ібупрофену у цій моделі кардинально відрізнялася від тієї, що спостерігали ми у референтній популяції.

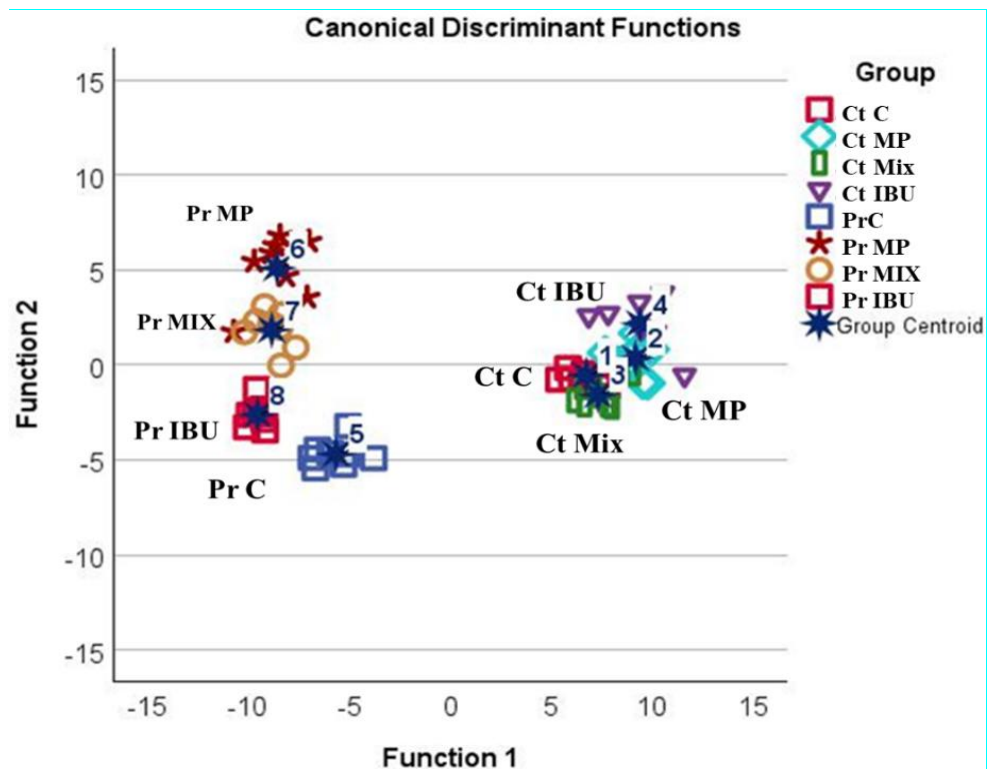


Рис. 4.3.1. Результати канонічного дискримінантного аналізу біохімічних відповідей у організмі *U. tumidus* з двох популяцій (Ct та Pr) за впливу на організм мікропластику окремо (MP), у поєднанні з ібупрофеном (Mix), та ібупрофену окремо (IBU). *Примітка:* Позначення груп наведено у тексті.

У молюсків із антропогенно навантаженої території особливості впливу ібупрофену порівняно з групою з референтної популяції були пов'язані з яскраво вираженою антиоксидантною дією (активацією обох форм SOD, пригніченням PC та відсутністю змін у рівні TBARS, не зважаючи на зменшену каталазну активність). У цій групі також не відбувалися ймовірно взаємопов'язані зміни у вмісті і розподілі цинку у клітинах та каспазній-3 активності. Відтак, до специфічних ефектів ібупрофену можна віднести антиоксидантну активність, виражену різною мірою у двох популяціях.

Відзначена нами антиоксидантна активність ібупрофену повідомлялась і в інших дослідженнях на водних організмах. Так, було продемонстровано, що ібупрофен у наномолярних концентраціях індукує експресію SOD і каталази у двостулкового молюска *D. polymorpha* після одного або чотирьох днів впливу (Contardo-Jaraa et al., 2011).

Таблиця 4.3.1.

Результати класифікації молюсків з двох популяцій за їх приналежністю до певної групи за впливу на організм мікропластику окремо (MP), у поєднанні з ібупрофеном (Mix), та ібупрофену окремо (IBU)

		Група	Належність до групи				Загалом	
			PrC	PrMP	PrMix	PrIBU		CtC
Cross-validated	Count	PrC	7	1	0	0	0	8
		PrMP	0	8	0	0	0	8
		PrMix	0	1	7	0	0	8
		PrIBU	0	0	0	8	0	8
		CtC	0	0	0	0	8	8
		CtMP	0	0	0	0	0	8
		CtMix	0	0	0	0	0	8
		CtIBU	0	0	0	0	1	8
	%	PrC	87,5	12,5	,0	,0	,0	100
		PrMP	,0	100,0	,0	,0	,0	100
		PrMix	,0	12,5	87,5	,0	,0	100
		PrIBU	,0	,0	,0	100,0	,0	100
		CtC	,0	,0	,0	,0	100,0	100
		CtMP	,0	,0	,0	,0	,0	100
		CtIBU	,0	,0	,0	,0	12,5	100
			Належність до групи			Загалом		
		Група	CtMP	CtMix	CtIBU			
Cross-validated	Count	CtMP	7	0	1	8		
		CtMix	0	8	0	8		
		CtIBU	0	0	7	8		
	%	CtMP	87,5	,0	12,5	100,0		
		CtMix	,0	100,0	,0	100,0		
		CtIBU	,0	,0	87,5	100,0		

Примітка: Позначення груп наведено у тексті

У мідій *M. galloprovincialis*, підданих протягом 2 тижнів екологічно реальній концентрації ібупрофену, було виявлено значну індукцію та позитивну кореляцію між активністю SOD та TBARS у зябрах (Gonzalez-Rey and Bebianno, 2011). Активності SOD і каталази індукувались також у

ракоподібного *D. magna* після 48 годин впливу високої концентрації 2,9 мг·л⁻¹ (Gomez-Olivan et al., 2014).

Проте, залежно від умов експозиції, були зареєстровані і протилежні ефекти, зокрема у *D. magna*, що піддалася впливу 0,5 або 50 мкг л⁻¹ препарату при визначенні експресії генів циклооксигенази та глутатіон *S*-трансферази та продукції TBARS (Wang et al., 2016).). Відтак, антиоксидантні властивості ібупрофену виявились найбільш послідовним проявом його дії у обох популяціях.

Таблиця 4.3.2.

Результати визначення спорідненості між групами молюсків з двох популяцій за впливу на організм мікропластику окремо (MP), у поєднанні з ібупрофеном (Mix) та ібупрофену (IBU) окремо за показниками Функцій 1 та 2

Група	Функція	
	1	2
PrC	6,734	-,554
PrMP	9,170	,351
PrMix	7,315	-1,586
PrIBU	9,397	2,174
CtC	-5,658	-4,698
CtMP	-8,573	5,097
CtMix	-8,840	1,844
CtIBU	-9,544	-2,629

Примітка: Позначення груп наведено у тексті

Проте у молюсків із антропогенно навантаженої території не проявлялась специфічна здатність до активації цитоплазматичного АОР за впливу ібупрофену. Навпаки, у цій популяції були виражені спільні для всіх експозицій ознаки лізосомальної ініціації загибелі клітин, а активність каспази-3 не зазнавала змін. Загалом специфічність впливу ібупрофену порівняно з MP у цій популяції була менше виражена, а за комплексної дії негативний ефект обох чинників посилювався, зокрема зростало утворення продуктів TBARS,

зменшувався рівень GSH. Відтак і в цій популяції спостерігалась негативна синергія у дії двох факторів, але вона проявлялась за специфічним для цієї популяції АОР, який реалізувався з використанням лізосомального шляху клітинної загибелі.

Щодо специфіки впливу саліноміцину у молюсків з антропогенно навантаженої популяції, то він, на відміну від ібупрофену, не викликав значних змін у антиоксидантному захисті, за виключенням активації каталази та карбонілювання протеїнів, проте впливав на метаболізм металів, збільшуючи рівень металотіонеїнів та їх металювання та особливо посилюючи акумуляцію купруму у тканині. Ці ознаки відповідають і інформації про саліноміцин як іонофор для одновалентних та двовалентних металів (Рис.4.3.2.).

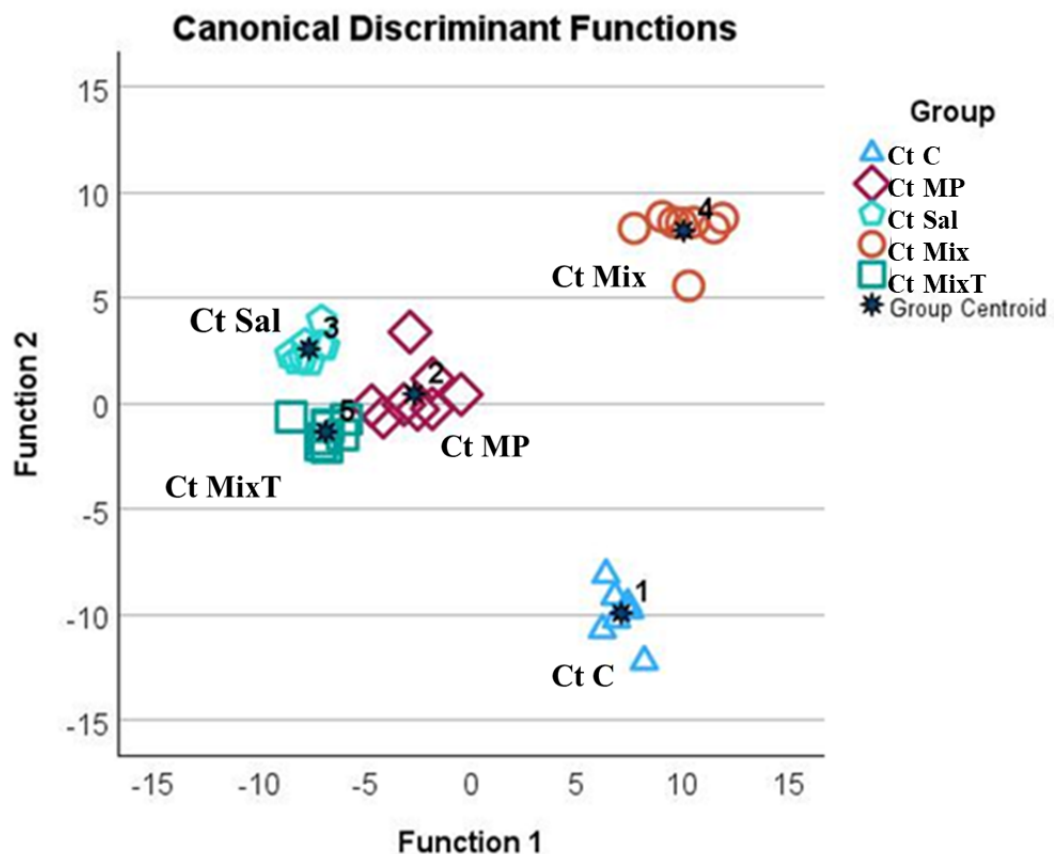


Рис. 4.3.2. Результати канонічного дискримінантного аналізу біохімічних показників у травній залозі молюска *U. timidus* за впливу на організм мікропластику (MP), саліноміцину (Sal), їх суміші за температури 18°C (Mix) та 25°C (MixT). Примітка: Позначення груп наведено у тексті.

У комбінованій експозиції у дії МР 2 мкм та саліноміцину проявлялися частково ознаки, притаманні дії саліноміцину та МР, проте були відзначені нові ознаки, зокрема зміна активностей Mn-SOD та Cu,Zn-SOD, відсутність зростання рівня протеїну металотіонеїнів та акумуляції цинку тканиною, що характеризує посилення стресу. Загалом у комбінованій дії були більше виражені знаки впливу МР 2 мкм, ніж саліноміцину, а результуючі зміни можна характеризувати як негативний синергізм (Рис. 4.3.2, Табл. 4.3.3, 4.3.4). За теплового впливу ці ознаки синергізму проявляються менше.

Таблиця 4.3.3.

Результати визначення спорідненості між групами молюсків за впливу на організм мікропластику (МР), саліноміцину (Sal), їх суміші за температури 18°C (Міх) та 25°C (МіхТ)

Група	Функція			
	1	2	3	4
CtC	7,103	-9,915	1,622	,713
CtMP	-2,676	,464	1,066	-4,583
CtSal	-7,639	2,590	6,245	2,104
CtMіх	10,057	8,189	-1,309	,641
CtMіхТ	-6,846	-1,328	-7,624	1,125

Примітка: Позначення груп наведено у тексті

Отже, у всіх досліджених моделях комбінованої дії МР з фармацевтичними препаратами спостерігались окремі риси, притаманні обом складовим, зокрема антиоксидантна дія ібупрофену, вплив на метаболізм металів саліноміцину та ініціація лізосомальної активації катепсину Д, зумовлена МР. Проте відзначались і нові риси, які у кожному випадку свідчили про посилення токсичності середовища.

Таблиця 4.3.4.

Результати класифікації моллюсків за їх приналежністю до певної групи за впливу на організм мікропластику (MP), саліноміцину (Sal), їх суміші за температури 18°C (Mix) та 25°C (MixT)

		Група	Належність до групи					Загалом
			CtC	CtMP	CtSal	CtMix	CtMixT	
Original	Count	CtC	8	0	0	0	0	8
		CtMP	0	8	0	0	0	8
		CtSal	0	0	8	0	0	8
		CtMix	0	0	0	8	0	8
		CtMixT	0	0	0	0	8	8
	%	CtC	100,0	,0	,0	,0	,0	100,0
		CtMP	,0	100,0	,0	,0	,0	100,0
		CtSal	,0	,0	100,0	,0	,0	100,0
		CtMix	,0	,0	,0	100,0	,0	100,0
		CtMixT	,0	,0	,0	,0	100,0	100,0
Cross-validated	Count	CtC	8	0	0	0	0	8
		CtMP	0	7	1	0	0	8
		CtSal	0	0	8	0	0	8
		CtMix	0	0	0	8	0	8
		CtMixT	0	0	0	0	8	8
	%	CtC	100,0	,0	,0	,0	,0	100,0
		CtMP	,0	87,5	12,5	,0	,0	100,0
		CtSal	,0	,0	100,0	,0	,0	100,0
		CtMix	,0	,0	,0	100,0	,0	100,0
		CtMixT	,0	,0	,0	,0	100,0	100,0

Примітка: Позначення груп наведено у тексті

Відтак, поєднана дія MP та ібупрофену або саліноміцину викликала непрогнозовані на підставі даних про їх поодинокую дію реакції організму перлівниці, причому ці ознаки (за впливу підвищеної температури у серії мікропластику та саліноміцину), частково втрачалися. Застосований нами підхід ілюструє необхідність визнання синергічного впливу множинних стресорів та враховувати його мінливість за дії додаткових впливів середовища.

4.3.1. Як впливають екологічні особливості – популяційні адаптації та тепловий чинник – на реакції молюсків за впливу ксенобіотиків?

У нашому дослідженні, виходячи з наведеної вище інформації, очікувалась адаптація молюсків з *St*-популяції до мікрополлютантів, таких як ібупрофен та МР, що і було доведено за результатами диференційного аналізу за належністю груп до функцій 1 та 2 (*Рис. 4.3.1, Табл. 4.3.2*). Отримані результати свідчать, що популяція, адаптована до антропогенно модифікованого середовища, виявилась резистентною до додаткових екологічно реальних навантажень складниками, які є типовими мікрополлютантами таких водойм – МР та нестероїдного протизапального препарату. З іншого боку, у популяції, яка у своїй життєвій історії не мала досвіду реагування на такі поллютанти, кожний з них викликав більш специфічну і чутливу реакцію систем стресу та детоксикації. При визначенні впливу преадаптації у певній популяції, як свідчить дискримінаційний аналіз (*Рис 4.3.1*), рівень специфічності реакцій на кожний чинник був значно вищим у *Rg*-популяції. Згідно з показниками центроїдів двофакторного дисперсійного аналізу, залежність від популяційної преадаптації була особливо помітною для експозиції до МР, потім Міх, і меншою для ІВU (*Табл. 4.3.2*).

Отже, кінцеві прояви несприятливих хімічних впливів (*adverse outcome pathways, AOP*) виявились специфічними для кожної популяції. Такі результати відповідають положенням, сформульованим Khan et al., (2020). Застосований нами набір біохімічних реакцій свідчить, що, незважаючи на спільну стратегію редукційного стресу та достатній рівень антиоксидантів, дві популяції використовували різні стратегії *AOP* щодо внутрішньо- або екстралізосомального використання *StD*.

Порівняння активності протеаз цитоплазми та лізосом дає найбільш плідні результати для такого твердження. Відомо багато способів загибелі клітин, які є наслідком токсичності (наприклад, апоптоз, аутофагія, фероптоз, піроптоз, мітотична катастрофа) усі вони є наслідком активації програм клітинної загибелі (Shen et al., 2023). Порівняння двох популяцій свідчить про

різну стратегію вилучення ушкоджених клітин у двох популяціях за впливу пошкоджуючих чинників, коли популяція із забрудненої місцевості використовувала лізосоми, як «суїцидальні ємності» (Turk and Turk, 2009), а за впливу МР 2 мкм, саліноміцину та їх суміші при температурі 18°C спостерігалась узгоджена активація каспази-3 та катепсину Д, що свідчить про можливий молекулярний зв'язок між аутофагією та апоптозом. З іншого боку, у референтній популяції вивільнення катепсину Д та пригнічення каспази-3 свідчили про використання сценарію аутофагії. Саме такий шлях було виявлено у молюсків за різних несприятливих впливах у клітинах гепатопанкреасу (Shaw et al., 2019). Посилення екстралізосомальної активності катепсину Д було виявлено також у тканинах десятиногих ракоподібних, де він діє як позаклітинний травний фермент (Martínez-Alarcón et al., 2018). Важливо відзначити, що механізми апоптозу у двостулкових молюсків мають багато спільних генів із хребетними (Vogeler et al., 2021), а отже, розподіл між лізосомальними та екстралізосомальними формами катепсину Д та узгодженість активностей цитозольного та лізосомального шляхів загибелі клітин у молюсків заслуговує на увагу при створенні моделей токсичності ксенобіотиків у різних видах тварин (Orrenius, 2019).

Відомо, що стійкість до конкретних забруднень може суттєво відрізнятись залежно від процесу преадаптації, демонструючи посилення або загострення захисних механізмів (Biagianti-Risbourg et al., 2013; Carrier-Belleau et al., 2021). Проте адаптаційний синдром у нижчих хребетних залежно від сформованих у популяції реакцій на стрес та специфічні ксенобіотики досліджується вкрай рідко. Більше уваги приділяється віковим особливостям тварин (Bozhkov et al., 2021; Bayliak et al., 2019). Щодо преадаптації водних тварин у певних популяціях, було доведено, що тривалий вплив певного навантаження призводить до адаптації до нього та зниженої чутливості до його гостротоксичної дії (Lefcort et al., 2015; Khan et al., 2020). Зокрема, у циклі досліджень, здійснених у лабораторії Guilhermino (Luis et al., 2015; de Sá et al., 2015; Miranda et al., 2019) було показано, що стійкість молодняка риби

Pomatochistus microps до хрому (VI), Cd або *Artemia nauplii* був відмінним у двох популяціях. Було також показано, що молюск *R. philippinarum*, який не зазнавав впливу Cd у своїй популяції, накопичував більше металу в зябрах і не синтезував металотіонеїни для детоксикації металу, на відміну від молюсків, адаптованих до забруднення (Paul-Pont et al., 2010). Подібним чином популяція молюсків, яка зазнавала впливу паразитів-трематод у своїй популяції, виявила більшу стійкість до інфекції, ніж молюски, які ніколи не контактували з цими паразитами (Paul-Pont et al., 2010). Однак, молодняк риби *Pomatoschistus microps* з більш забрудненої території прибережжя, був менш стійким до впливу МР, ніж з умовно чистої території (Miranda et al., 2019). Тому, прогнозування ефекту популяційно-залежної стійкості молюсків до мікрозабруднювачів є досить складним з огляду на характер комбінованих тривалих та тимчасових впливів.

Розуміння впливу температурного чинника на здатність організму до реакції на хімічні чинники актуалізується відповідно до кліматичних змін. Довгострокові зміни в енергетичному балансі Землі збільшують частоту, інтенсивність та ймовірність токсичного впливу екологічно реального «коктейлю» забруднювачів на живу природу, а хронічний несприятливий вплив послаблює резистентність адаптивних механізмів організму (Столяр та ін. 2016; Ebi et al., 2021; Khoma et al., 2021, 2022). Зокрема, за умов кліматичних аномалій очікується ефект "стрес на стрес", за якого детоксикаційні системи організму виснажуються та втрачають свою ефективність. З іншого боку, як доведено на різних модельних організмах, від одноклітинних до хребетних тварин, попередня або тривала дія пошкоджуючого чинника помірної сили («м'якого стресу»), зокрема, адаптація у природних умовах існування до підвищеного рівня іонізуючої радіації або конкретного забруднювача, наприклад кадмію, у багатьох випадках викликає реакцію гормезису, тобто підвищує стійкість організму до гостротоксичного впливу цього ж стресу (явище переадаптації) та інших видів стресів (явище перехресної адаптації) (Bayliak et al., 2013, 2019; Falfushynska et al., 2014; Столяр та ін. 2016;

Gnatyshyna et al., 2012). Наше дослідження виявило послідовну закономірність, що проявлялась при аналізі майже кожного показника та за диференційним аналізом сукупності показників – це нівелювання комбінованого впливу МР та саліноміцину за приєднання до цього впливу теплового ефекту (Рис. 4.3.2). Дійсно, всі ефекти Міх, крім активації Mn-SOD, були послаблені або спотворені за теплового впливу. Для каталази були показані навіть протилежні реакції порівняно з комбінованим впливом за 18°C. Крім того, у групі МіхТ активності SOD і каталази були розбалансовані, що може спричинити підвищену продукцію перекису водню, який не може бути достатньою мірою вилучений каталазною активністю.

Посилення токсичності забруднювача за теплового впливу повідомлялось у різних експериментах. Наприклад, це стосується реакцій окисного стресу та детоксикації у травній залозі *U. tumidus* за суміші фармацевтичних препаратів і пестициду Раундапу (Khoma et al., 2020, 2021). Крім того, двостулкові молюски, адаптовані до підвищеного теплового режиму в їхньому природному середовищі, не змогли забезпечити адаптивну реакцію окисного стресу на наночастинки ZnO на відміну від молюсків з референтної місцевості, очевидно, внаслідок виснаження потенціалу резистентності (Falfushynska et al., 2018). У нашому дослідженні ці спостереження знайшли аргументоване підтвердження, оскільки температурна складова різко змінює реакцію молюсків на вплив суміші. Загалом, у цій дослідній серії низький індивідуальний ефект МР і Sal, їх кумулятивна взаємодія у комбінації та нівелювання цієї взаємодії за спільного впливу на тлі теплового ефекту ілюструється результатами дискримінантного аналізу (Рис. 4.3.2).

Підводячи підсумок, важливо відзначити, що на даний час вплив адаптаційної здатності організму на його реакцію на певний несприятливий чинник досліджений вкрай недостатньо. Проведений експеримент доводить, що ефективність молекулярних механізмів напряду залежить від ступеня резистентності організму, сформованого в середовищі існування, спричиненого поєднанням комплексного забруднення середовища та екологічними факторами

(Lionetto et al., 2021; Scholz et al., 2022). Доведено, що мікропластик, залежно від розміру, має особливості впливу на біохімічні показники молюска та модулює біологічну дію фармацевтичних препаратів. Ці ефекти залежать від адаптацій популяції у природних умовах до хронічного забруднення та послаблюються за умов теплового впливу на організм.

4.4 Обґрунтування мінімального набору біомаркерів екотоксичності мікропластику окремо та у комбінованій експозиції

З використанням факторного аналізу було проаналізовано зв'язок між окремими біоіндикаторами організму перлівниці у обох дослідних серіях, як за окремого впливу МР, або фармацевтика, так і у поєднанні та у залежності від екологічних чинників (популяція, тепловий вплив). Результати показали, що у кожному експерименті існують подібні взаємозалежності біомаркерів, що з високою ймовірністю визначають реакцію системи (Рис. 4.4.1, 4.4.2; Табл. 4.4.1, 4.4.2).

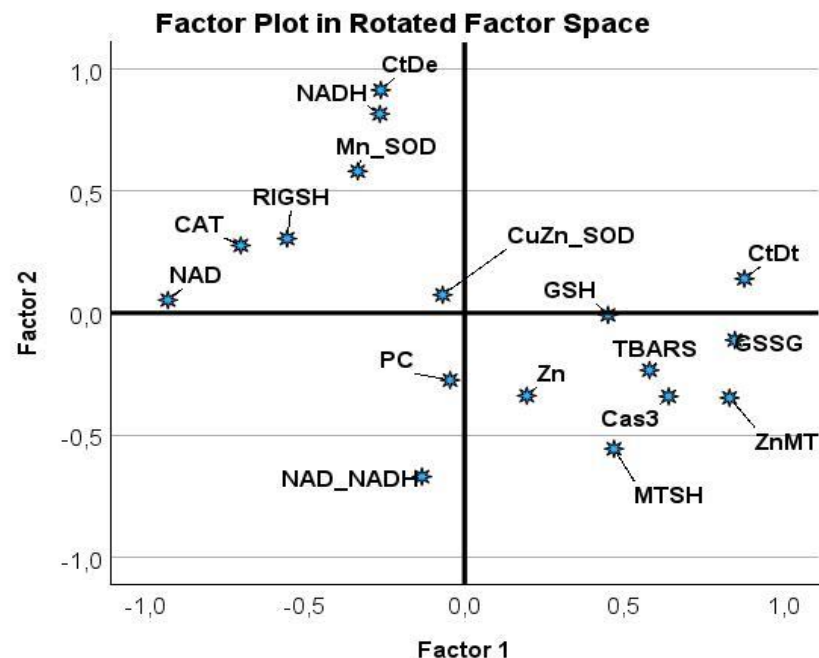


Рис. 4.4.1. Результати факторного аналізу стану біохімічних показників у організмі *U. tumidus* з двох популяцій за впливу на організм мікропластику окремо (МР), у поєднанні з ібупрофеном (Міх) та ібупрофену окремо (ІВU).

У дослідженні молюсків з двох популяцій (Рис. 4.4.1; Табл. 4.4.1), не зважаючи на встановлені особливості залежно від преадаптації у кожній популяції, було виявлено загальні взаємозв'язки. Найбільш вагомий внесок у реакцію організму, згідно з належністю до Фактора 1, виявили показники зростання рівня Zn-МТ у поєднанні з ознаками апоптозу/аутофагії (каспаза-3 та катепсин Д загальний) та окисного ушкодження (TBARS, GSSG) у негативному зв'язку (пригнічення рівня) з показниками енергетичної активності (NAD⁺) та антиоксидантного захисту (RI GSH, CAT).

Таблиця 4.4.1.

Розподіл біохімічних показників *U. tumidus* з двох популяцій між двома першими факторами факторного аналізу за впливу на організм мікропластику окремо (MP), у поєднанні з ібупрофеном (MIX) та ібупрофену окремо (IBU)

Показники	Фактор	
	1	2
Zn	,196	-,338
Zn-МТ	,832	-,346
MTSH	,469	-,555
GSH	,450	-,006
GSSG	,849	-,109
RIGSH	-,557	,306
NADH	-,266	,817
NAD	-,931	,055
NAD ⁺ /NADH	-,134	-,669
Cas3	,641	-,340
CtDe	-,263	,915
CtDt	,879	,142
CuZn-SOD	-,069	,076
Mn-SOD	-,335	,582
CAT	-,702	,278
TBARS	,581	-,233
PC	-,045	-,274

За належністю до Фактора 2, такими характеристиками були показники редукційного стресу (NADH протилежно до NAD⁺/NADH), вивільнення CtD з

лізосом, а також Mn-SOD. Загальний вміст металотіонеїну (MTSH) вірогідно належав до факторів 1 і 2, що відображає дуальність його функцій як антиоксиданта і буфера для цинку. Ці залежності відображають взаємозв'язок між процесами клітинної загибелі та зростанням рівня ушкоджень та послабленням енергетичного потенціалу нуклеотидних коензимів та окиснення тіолів. Відсутність взаємозалежності між активностями Mn-SOD та каталази характеризує розбалансування антиоксидантних активностей. Серед досліджених у цій серії показників, до найбільш інформативних відносимо показники NAD^+/NADH , оскільки їх баланс відображає стратегію реакції організму на несприятливі чинники.

У дослідній серії з вивчення впливу мікропластику 2 мкм та саліноміцину за двох теплових режимів до найбільш вагомих характеристик також належать показники відновного стресу (NAD^+/NADH , RIGSH) та Zn/Cu у негативній залежності з вивільненням CtDt з лізосом (Рис. 4.4.2., Табл. 4.4.2.)

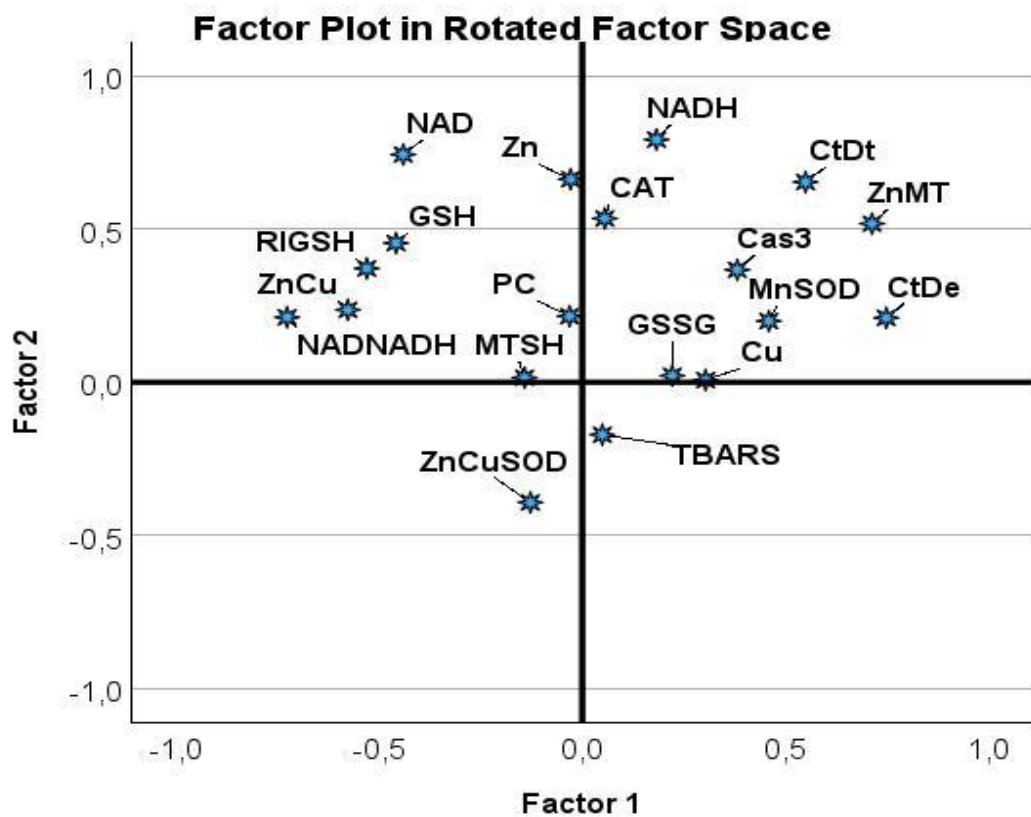


Рис. 4.4.2. Результати факторного аналізу стану біохімічних показників у організмі *U. tumidus* за впливу на організм мікропластику окремо (MP), саліноміцину (Sal), їх суміші за температури 18°C (Mix) та 25°C (MixT)

Метал-депонувальна та антиоксидантна функції металотіонеїнів реалізуються незалежно, причому перша з них і у цьому випадку негативно пов'язана з RI GSH. Показники антиоксидантного захисту та окисного ураження не демонструють послідовних вірогідних взаємозв'язків у цій серії.

Таблиця 4.4.2.

Розподіл біохімічних показників *U. tumidus* між двома першими факторами факторного аналізу за впливу на організм мікропластику окремо (MP), саліноміцину (Sal), їх суміші за температури 18°C (Mix) та 25°C (MixT)

Показники	Фактор			
	1	2	3	4
Zn	-,006	,002	-,001	-,009
Cu	-,072	,028	,033	,033
Zn/Cu	,881	-1,138	,808	,182
Zn-MT	,158	,122	-,081	,046
MTSH	,976	-,068	,667	-,591
GSH	-,008	,001	,013	-,009
GSSG	,034	,005	-,132	,106
RI GSH	,255	-,013	-,336	,490
NAD	,108	,021	,058	,064
NADH	,115	,082	,213	-,165
NAD ⁺ /NADH	1,236	-,380	,751	1,881
Cas3	,003	-,006	-,002	-,022
CtDe	1,160	,606	-,033	-,151
CtDt	,755	,436	,241	-,304
Zn,Cu-SOD	-4,378	-4,664	2,880	-3,721
Mn-SOD	,116	,457	-,705	,990
CAT	-,019	,009	,001	,003
TBARS	-,023	-,086	-,012	-,135
PC	,458	,321	1,445	-,128
(Constant)	-13,943	-8,737	-18,452	-3,103

Відтак, порівняння результатів двох серій досліджень дозволяють виокремити показники, які відображають здатність організму двостулкового молюска до загальної реакції на стрес – це зменшення Zn/Cu співвідношення у тканині, як найбільш простий у реалізації показник та характеристика редокс-

стресу – $NAD^+/NADH$ співвідношення, що засвідчує здатність організму до забезпечення відновного статусу клітинних низькомолекулярних тіолів та їх участі у метаболізмі металів. Узгоджена відповідь активації цитозольних та лізосомальних протеаз характеризує здатність системи до програмованого вилучення ушкоджених клітин, що може активуватися стимулами, відмінними від окисного стресу.

Згідно з аналізом літературних даних, здатність двостулкового молюска перлівниці до акумуляції МР у субхронічному експерименті та його реакція на вплив антибіотика саліноміцину і комбіновану дію фармацевтиків та МР були досліджені вперше. Зважаючи на екологічну реальність теплового впливу внаслідок глобального потепління, що має хвилеподібну динаміку, важливо зазначити, що втрата реакції організму на комплексний вплив МР та фармацевтика при нагріванні не є результатом посилення резистентності організму, а навпаки, проявом виснаження адаптаційних можливостей ектотермічного організму.

Загалом, наші висновки підкреслюють необхідність впроваджувати еко-еспосомний підхід, що передбачає мультифакторний аналіз впливу на організм, зокрема враховувати особливості температурного режиму у довкіллі та взаємодію складників хімічного «коктейлю» та теплового режиму при оцінці екологічних ризиків мікропластику.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі доведено здатність прісноводного двостулкового молюска перлівниці *Unio tumidus* (Philipson et al., 1788) акумулювати мікропластик водного середовища та реагувати диференційовано на вплив мікропластику двох розмірів за ознаками змін цинк-депонувальної функції металотіонеїнів, показників окисного/редукційного стресу за участі низькомолекулярного тіолому, а також ензимів апоптозу. Преадаптація молюсків до впливу несприятливих чинників середовища у антропогенно навантаженій місцевості визначає реакції на вплив мікропластику окремо та спільно з фармацевтиками. Теплова дія нівелює реакції організму на комбінований вплив мікропластику та фармацевтика. Доведено, що вплив мікропластику залежить від його розміру. За спільного впливу мікропластику та фармацевтиків проявляється синергічний ефект.

1. Вперше доведено, що перлівниця акумулює мікропластик розміром 0,1-0,5 мм водного середовища за його концентрації у воді 1 мг/л протягом 14 діб інкубації з максимальним накопиченням у м'яких тканинах на 8-10 доби. Ці результати створюють перспективи використання молюсків для ідентифікації мікропластику у водному середовищі;

2. Встановлено, що металотіонеїни травної залози перлівниці з антропогенно навантаженої території забезпечують резерв цинку у тканині (до 21% від загального вмісту) за впливу мікропластику окремо та у поєднанні з ібупрофеном та саліноміцином та без відповідності із загальним вмістом цинку у тканині. Загальний вміст металотіонеїну у перлівниці цієї популяції зростає за впливу мікропластику та фармацевтиків при 18°C, а при 25°C та в особин з референтної популяції зменшується. Зменшення частки цинк/купрум у травній залозі є неспецифічною ознакою реакції на стрес.

3. За ознаками окисного/редукційного стресу у всіх експериментальних групах спостерігали ознаки збільшення відновного потенціалу NAD^+ , що за теплового впливу відбувається за загального зменшення концентрації NAD та $NADH$. У молюсків референтної популяції мікропластик викликав пригнічення

активності Cu,Zn-SOD та посилення перекисного окиснення ліпідів, а в антропогенно навантаженій популяції мікропластик 0,1-0,5 мм активував Mn-SOD. Мікропластик 2 мкм не викликав змін показників окисного стресу у молюсків. Вплив ібупрофену окремо та у суміші активував Mn-SOD та зменшував рівень карбонілювання протеїнів. Дія саліноміцину окремо та у суміші призвела до активації каталази та збільшення рівня карбонілювання протеїнів. Залежно від популяції редокс індекс глутатіону за впливу експериментальних чинників зростає (референтна) або зменшується (антропогенно навантажена). Тепловий вплив пригнічує реакцію системи антиоксидантного захисту на комбінований вплив мікропластику та саліноміцину.

4. Мікропластик 0,1-0,5 мм не впливав на активність каспази-3 у обох популяціях. Мікропластик 2 мкм, саліноміцин та їх суміш при 18 °C активували каспазу-3. Мікропластик 0,1-0,5 та 2 мкм окремо та у суміші викликав активацію катепсину Д та його вихід з лізосом, а саліноміцин не впливав на цей ензим. У референтній популяції відзначено особливості реакції ензимів апоптозу/аутофагії: пригнічення каспази-3 за впливу ібупрофену окремо та у суміші та максимальне зростання позалізосомальної активності катепсину Д (у чотири рази за впливу мікропластику). Тепловий вплив нівелює реакцію ензимів апоптозу/аутофагії на дію суміші ксенобіотиків.

5. На підставі результатів дослідження пропонуємо використовувати як біомаркери екотоксичності водного середовища вміст мікропластику у м'яких тканинах двостулкового молюска; зменшення співвідношень $NAD^+/NADH$ та Zn/Cu для оцінки адаптаційного потенціалу молюсків.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ:

1. Молекулярні реакції водних тварин на вплив пошкоджувальних чинників середовища : [монографія] / О. Б. Столяр, Г.І. Фальфушинська, Л.Л. Гнатишина, В.Г. Юкало – Тернопіль : Вид-во ТНТУ імені Івана Пулюя, 2016. – 352 с.
- 2.Регіональний офіс водних ресурсів у Тернопільській області. URL: <https://www.vodgosp.te.ua/water-resources.html> (дата звернення: 22.11.2022).
- 3.Температура води в річці Дністер. URL <https://ukr.seatemperature.net/zaraz/ukraine/dnestrovskiiy-kanon-ukraine-sea-temperature> (дата звернення: 22.07.2020).
- 4.Aceto, S., Formisano, G., Carella, F., De Vico, G., & Gaudio, L. (2011). The metallothionein genes of *Mytilus galloprovincialis*: genomic organization, tissue expression and evolution. *Marine genomics*, 4(1), 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2011.01.001>
- 5.Aguirre-Martínez, G. V., Del Valls, T. A., and Martín-Díaz, M. L. (2013). Identification of biomarkers responsive to chronic exposure to pharmaceuticals in target tissues of *Carcinus maenas*. *Marine environmental research*, 87-88, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.02.011>
- 6.Alomar, C., Sureda, A., Capó, X., Guijarro, B., Tejada, S., & Deudero, S. (2017). Microplastic ingestion by *Mullus surmuletus* Linnaeus, 1758 fish and its potential for causing oxidative stress. *Environmental research*, 159, 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.07.043>
- 7.Alonso, L. L., Demetrio, P. M., Capparelli, A. L., & Marino, D. J. G. (2019). Behavior of ionophore antibiotics in aquatic environments in Argentina: The distribution on different scales in water courses and the role of wetlands in depuration. *Environment international*, 133(Pt A), 105144. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105144>
- 8.Amjad, S., Nisar, S., Bhat, A. A., Shah, A. R., Frenneaux, M. P., Fakhro, K., Haris, M., Reddy, R., Patay, Z., Baur, J., & Bagga, P. (2021). Role of NAD⁺ in

regulating cellular and metabolic signaling pathways. *Molecular metabolism*, 49, 101195. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101195>

9. Andreani, G., Carpenè, E., Capranico, G., & Isani, G. (2011). Metallothionein cDNA cloning, metallothionein expression and heavy metals in *Scapharca inaequivalvis* along the Northern Adriatic coast of Italy. *Ecotoxicology and environmental safety*, 74(3), 366–372. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.12.008>

10. 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 (Barking, Essex : 1987)*, 192, 74–82. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.04.012>

11. Atif, F., Kaur, M., Yousuf, S., & Raisuddin, S. (2006). In vitro free radical scavenging activity of hepatic metallothionein induced in an Indian freshwater fish, *Channa punctata* Bloch. *Chemico-biological interactions*, 162(2), 172–180. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.06.006>

12. 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>

13. Atugoda, T., Vithanage, M., Wijesekara, H., Bolan, N., Sarmah, A. K., Bank, M. S., You, S., & Ok, Y. S. (2021). Interactions between microplastics, pharmaceuticals and personal care products: Implications for vector transport. *Environment international*, 149, 106367. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106367>

14. Bak, S. A., Hansen, M., Krogh, K. A., Brandt, A., Halling-Sørensen, B., & Björklund, E. (2013). Development and validation of an SPE methodology combined with LC-MS/MS for the determination of four ionophores in aqueous environmental matrices. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 93(14), 1500-1512. <https://doi.org/10.1080/03067319.2013.763250>

15.Barboza, L. G. A., Vieira, L. R., Branco, V., Figueiredo, N., Carvalho, F., Carvalho, C., & Guilhermino, L. (2018). Microplastics cause neurotoxicity, oxidative damage and energy-related changes and interact with the bioaccumulation of mercury in the *European seabass, Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Aquatic toxicology*, 195, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.12.008>

16.Barnes, D. K., Galgani, F., Thompson, R. C., & Barlaz, M. (2009). Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 364(1526), 1985–1998. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0205>

17.Bashir, H., Ibrahim, M. M., Bagheri, R., Ahmad, J., Arif, I. A., Baig, M. A., & Qureshi, M. I. (2015). Influence of sulfur and cadmium on antioxidants, phytochelatins and growth in Indian mustard. *AoB PLANTS*, 7, plv001. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plv001>

18.Batel, A., Borchert, F., Reinwald, H., Erdinger, L., & Braunbeck, T. (2018). Microplastic accumulation patterns and transfer of benzo[a]pyrene to adult zebrafish (*Danio rerio*) gills and zebrafish embryos. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 235, 918–930. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.028>

19.Batel, A., Linti, F., Scherer, M., Erdinger, L., & Braunbeck, T. (2016). Transfer of benzo[a]pyrene from microplastics to *Artemia nauplii* and further to zebrafish via a trophic food web experiment: CYP1A induction and visual tracking of persistent organic pollutants. *Environmental toxicology and chemistry*, 35(7), 1656–1666. <https://doi.org/10.1002/etc.3361>

20.Bayliak, M. M., Abrat, O. B., Storey, J. M., Storey, K. B., & Lushchak, V. I. (2019). Interplay between diet-induced obesity and oxidative stress: Comparison between *Drosophila* and mammals. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, 228, 18–28. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.09.027>

21.Bayliak, M. M., Burdyliuk, N. I., Izers'ka, L. I., & Lushchak, V. I. (2013). Concentration-Dependent Effects of *Rhodiola Rosea* on Long-Term Survival and Stress Resistance of Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*: The Involvement of YAP 1 and

MSN2/4 Regulatory Proteins. *Dose-response : a publication of International Hormesis Society*, 12(1), 93–109. <https://doi.org/10.2203/dose-response.13-013.Bayliak>

22. Bebianno, M. J., G eret, F., Hoarau, P., Serafim, M. A., Coelho, M. R., Gnassia-Barelli, M., & Rom eo, M. (2004). Biomarkers in *Ruditapes decussatus*: a potential bioindicator species. *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals*, 9(4-5), 305–330. <https://doi.org/10.1080/13547500400017820>

23. Beiras, R., & Sch onemann, A. M. (2020). Currently monitored microplastics pose negligible ecological risk to the global ocean. *Scientific reports*, 10(1), 22281. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79304-z>

24. Berm udez, J. R., & Swarzenski, P. W. (2021). A microplastic size classification scheme aligned with universal plankton survey methods. *MethodsX*, 8, 101516. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2021.101516>

25. Biagianti-Risbourg, S., Paris-Palacios, S., Mouneyrac, C., & Amiard-Triquet, C. (2013). Pollution acclimation, adaptation, resistance, and tolerance in ecotoxicology. In *Encyclopedia of aquatic ecotoxicology* (pp. 883-892). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5704-2_81

26. Binh, V. N., Dang, N., Anh, N. T. K., Ky, L. X., & Thai, P. K. (2018). Antibiotics in the aquatic environment of Vietnam: Sources, concentrations, risk and control strategy. *Chemosphere*, 197, 438–450. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.061>

27. Boleda, M. R., Alechaga, E., Moyano, E., Galceran, M. T., & Ventura, F. (2014). Survey of the occurrence of pharmaceuticals in Spanish finished drinking waters. *Environmental science and pollution research international*, 21(18), 10917–10939. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2885-9>

28. Bord os, G., Urb anyi, B., Micsinai, A., Kriszt, B., Palotai, Z., Szab o, I., Hantosi, Z., & Szoboszlay, S. (2019). Identification of microplastics in fish ponds and natural freshwater environments of the Carpathian basin, Europe. *Chemosphere*, 216, 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.110>

29. Bottoni, P., Caroli, S., & Caracciolo, A. B. (2010). Pharmaceuticals as priority water contaminants. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 92(3), 549-565. <https://doi.org/10.1080/02772241003614320>
30. Bozhkov, A. I., Sidorov, V. I., Alboqai, O. K., Akzhyhitov, R. A., Kurguzova, N. I., Malyshev, A. B., ... & Gromovoi, T. Y. (2021). The role of metallothioneins in the formation of hierarchical mechanisms of resistance to toxic compounds in young and old animals on the example of copper sulfate. *Translational Medicine of Aging*, 5, 62-74. <https://doi.org/10.1016/j.tma.2021.11.001>
31. Brate, I. L. N., Blázquez, M., Brooks, S. J., & Thomas, K. V. (2018). Weathering impacts the uptake of polyethylene microparticles from toothpaste in Mediterranean mussels (*M. galloprovincialis*). *The Science of the total environment*, 626, 1310–1318. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.141>
32. Breitwieser, M., Viricel, A., Graber, M., Murillo, L., Becquet, V., Churlaud, C., Fruitier-Arnaudin, I., Huet, V., Lacroix, C., Pante, E., Le Floch, S., & Thomas-Guyon, H. (2016). Short-Term and Long-Term Biological Effects of Chronic Chemical Contamination on Natural Populations of a Marine Bivalve. *PloS one*, 11(3), e0150184. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150184>
33. Brennecke, D., Duarte, B., Paiva, F., Caçador, I., & Canning-Clode, J. (2016). Microplastics as vector for heavy metal contamination from the marine environment. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 178, 189-195. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2015.12.003>
34. Broeg, K., & Lehtonen, K. 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(8-9), 508–522. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.02.004>
35. Calvo, J., Jung, H., & Meloni, G. (2017). Copper metallothioneins. *Iubmb Life*, 69(4), 236-245. <https://doi.org/10.1002/iub.1618>
36. Campos, A., Tedesco, S., Vasconcelos, V., & Cristobal, S. (2012). Proteomic research in bivalves: towards the identification of molecular markers of aquatic

pollution. *Journal of proteomics*, 75(14), 4346–4359.
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.04.027>

37.Carbery, M., O'Connor, W., & Palanisami, T. (2018). Trophic transfer of microplastics and mixed contaminants in the marine food web and implications for human health. *Environment international*, 115, 400–409.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.03.007>

38.Carlos de Sá, L., Luís, L. G., & Guilhermino, L. (2015). Effects of microplastics on juveniles of the common goby (*Pomatoschistus microps*): confusion with prey, reduction of the predatory performance and efficiency, and possible influence of developmental conditions. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 196, 359–362. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.10.026>

39.Carrier-Belleau, C., Drolet, D., McKindsey, C. W., & Archambault, P. (2021). Environmental stressors, complex interactions and marine benthic communities' responses. *Scientific reports*, 11(1), 4194.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-83533-1>

40.Carter, W. C., & Brown, B. R. (2013). Ibuprofen: clinical pharmacology, medical uses and adverse effects. (*No Title*).

41.ChemSpider (<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.3544.html>)
Data appeal: 23.11.2022

42.Chen, H., Liu, S., Xu, X. R., Liu, S. S., Zhou, G. J., Sun, K. F., Zhao, J. L., & Ying, G. G. (2015). Antibiotics in typical marine aquaculture farms surrounding Hailing Island, South China: occurrence, bioaccumulation and human dietary exposure. *Marine pollution bulletin*, 90(1-2), 181–187.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.10.053>

43.Chen, H., Tang, M., Yang, X., Tsang, Y. F., Wu, Y., Wang, D., & Zhou, Y. (2021). Polyamide 6 microplastics facilitate methane production during anaerobic digestion of waste activated sludge. *Chemical Engineering Journal*, 408, 127251.
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.127251>

44. Chiaverini, N., & De Ley, M. (2010). Protective effect of metallothionein on oxidative stress-induced DNA damage. *Free radical research*, 44(6), 605–613. <https://doi.org/10.3109/10715761003692511>

45. Cho, Y., Shim, W. J., Jang, M., Han, G. M., & Hong, S. H. (2021). Nationwide monitoring of microplastics in bivalves from the coastal environment of Korea. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 270, 116175. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116175>

46. Colvin, R. A., Holmes, W. R., Fontaine, C. P., & Maret, W. (2010). Cytosolic zinc buffering and muffling: their role in intracellular zinc homeostasis. *Metallomics : integrated biometal science*, 2(5), 306–317. <https://doi.org/10.1039/b926662c>

47. Contardo-Jara, V., Lorenz, C., Pflugmacher, S., Nützmann, G., Kloas, W., & Wiegand, C. (2011). Exposure to human pharmaceuticals Carbamazepine, Ibuprofen and Bezafibrate causes molecular effects in *Dreissena polymorpha*. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 105(3-4), 428–437. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.07.017>

48. Coyle, P., Philcox, J. C., Carey, L. C., & Rofe, A. M. (2002). Metallothionein: the multipurpose protein. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 59(4), 627–647. <https://doi.org/10.1007/s00018-002-8454-2>

49. David, A., & Pancharatna, K. (2009). Developmental anomalies induced by a non-selective COX inhibitor (ibuprofen) in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental toxicology and pharmacology*, 27(3), 390–395. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2009.01.002>

50. De Lange, H. J., Noordoven, W., Murk, A. J., Lüring, M., & Peeters, E. T. (2006). Behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) to low concentrations of pharmaceuticals. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 78(3), 209–216. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.03.002>

51. de Oliveira, M., Frihling, B. E. F., Velasques, J., Filho, F. J. C. M., Cavalheri, P. S., & Migliolo, L. (2020). Pharmaceuticals residues and xenobiotics contaminants: Occurrence, analytical techniques and sustainable alternatives for

wastewater treatment. *The Science of the total environment*, 705, 135568. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135568>

52.de Sá, L. C., Oliveira, M., Ribeiro, F., Rocha, T. L., & Futter, M. N. (2018). Studies of the effects of microplastics on aquatic organisms: What do we know and where should we focus our efforts in the future? *The Science of the total environment*, 645, 1029–1039. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.207>

53.De Zwaan, A. (1983). Carbohydrate catabolism in bivalves. In *Metabolic biochemistry and molecular biomechanics* (pp. 137-175). Academic Press.

54.Dewangan, J., Srivastava, S., & Rath, S. K. (2017). Salinomycin: A new paradigm in cancer therapy. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 39(3), 1010428317695035. <https://doi.org/10.1177/1010428317695035>

55.Diamanti, K. S., Alygizakis, N. A., Nika, M. C., Oswaldova, M., Oswald, P., Thomaidis, N. S., & Slobodnik, J. (2020). Assessment of the chemical pollution status of the Dniester River Basin by wide-scope target and suspect screening using mass spectrometric techniques. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 412(20), 4893–4907. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02648-y>

56.Dietrich, S., Ploessl, F., Bracher, F., & Laforsch, C. (2010). Single and combined toxicity of pharmaceuticals at environmentally relevant concentrations in *Daphnia magna*--a multigenerational study. *Chemosphere*, 79(1), 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.12.069>

57.Ding, J., Zhang, S., Razanajatovo, R. M., Zou, H., & Zhu, W. (2018). Accumulation, tissue distribution, and biochemical effects of polystyrene microplastics in the freshwater fish red tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 238, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.03.001>

58.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>

59. 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>

60. Dziegiel P. (2004). Expression of metallothioneins in tumor cells. *Polish journal of pathology : official journal of the Polish Society of Pathologists*, *55*(1), 3–12.

61. Dziegiel, P., Pula, B., Kobierzycki, C., Stasiolek, M., & Podhorska-Okolow, M. (2016). Metallothioneins in Normal and Cancer Cells. *Advances in anatomy, embryology, and cell biology*, *218*, 1–117. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27472-0_1

62. Ebi, K. L., Vanos, J., Baldwin, J. W., Bell, J. E., Hondula, D. M., Errett, N. A., Hayes, K., Reid, C. E., Saha, S., Spector, J., & Berry, P. (2021). Extreme Weather and Climate Change: Population Health and Health System Implications. *Annual review of public health*, *42*, 293–315. <https://doi.org/10.1146/annurev-publhealth-012420-105026>

63. Efimova, I., Bagaeva, M., Bagaev, A., Kileso, A., & Chubarenko, I. P. (2018). Secondary microplastics generation in the sea swash zone with coarse bottom sediments: laboratory experiments. *Frontiers in Marine Science*, *5*, 313. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00313>

64. Elizalde-Velázquez, A., Carcano, A. M., Crago, J., Green, M. J., Shah, S. A., & Cañas-Carrell, J. E. (2020). Translocation, trophic transfer, accumulation and depuration of polystyrene microplastics in *Daphnia magna* and *Pimephales promelas*. *Environmental Pollution*, *259*, 113937. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.113937>

65. Eriksen, M., Lebreton, L. C., Carson, H. S., Thiel, M., Moore, C. J., Borerro, J. C., Galgani, F., Ryan, P. G., & Reisser, J. (2014). Plastic Pollution in the World's Oceans: More than 5 Trillion Plastic Pieces Weighing over 250,000 Tons Afloat at Sea. *PloS one*, *9*(12), e111913. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111913>

66.Expasy: SIB Swiss Institute of Bioinformatics (www.expasy.ch). application date: 03.02.2023

67.Fackelmann, G., & Sommer, S. (2019). Microplastics and the gut microbiome: How chronically exposed species may suffer from gut dysbiosis. *Marine pollution bulletin*, 143, 193–203. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.04.030>

68.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>

69.Falfushynska, H. I., Gnatyshyna, L. L., Ivanina, A. V., Sokolova, I. M., & Stoliar, O. B. (2018). Detoxification and cellular stress responses of unionid mussels *Unio tumidus* from two cooling ponds to combined nano-ZnO and temperature stress. *Chemosphere*, 193, 1127–1142. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.079>

70.Falfushynska, H. I., Gnatyshyna, L. L., Osadchuk, O. Y., Farkas, A., Vehovszky, A., Carpenter, D. O., Gyori, J., & Stoliar, O. B. (2014). Diversity of the molecular responses to separate wastewater effluents in freshwater mussels. Comparative biochemistry and physiology. *Toxicology & pharmacology: CBP*, 164, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2014.04.007>

71.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*, 162, 82–93. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.03.006>

72.Fields, J. H., & Quinn, J. F. (1981). Some theoretical considerations on cytosolic redox balance during anaerobiosis in marine invertebrates. *Journal of Theoretical Biology*, 88(1), 35-45. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(81\)90327-1](https://doi.org/10.1016/0022-5193(81)90327-1)

73.Freshwater quality - European Environment Agency (<http://www.eea.europa.eu/soer-2015/europe/freshwater>). Data appeal: 23.11.2022

74.Futakawa, N., Kondoh, M., Ueda, S., Higashimoto, M., Takiguchi, M., Suzuki, S., & Sato, M. (2006). Involvement of oxidative stress in the synthesis of metallothionein induced by mitochondrial inhibitors. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 29(10), 2016–2020. <https://doi.org/10.1248/bpb.29.2016>

75. Gagné, F., Blaise, C., & André, C. (2006). Occurrence of pharmaceutical products in a municipal effluent and toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Ecotoxicology and environmental safety*, 64(3), 329–336. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.04.004>

76. Gall, S. C., & Thompson, R. C. (2015). The impact of debris on marine life. *Marine pollution bulletin*, 92(1-2), 170–179. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.12.041>

77. Gaucher, C., Boudier, A., Bonetti, J., Clarot, I., Leroy, P., & Parent, M. (2018). Glutathione: Antioxidant Properties Dedicated to Nanotechnologies. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 7(5), 62. <https://doi.org/10.3390/antiox7050062>

78. Georgieva, E., Antal, L., Stoyanova, S., Aranudova, D., Velcheva, I., Iliev, I., Vasileva, T., Bivolarski, V., Mitkovska, V., Chassovnikarova, T., Todorova, B., Uzochukwu, I. E., Nyeste, K., & Yancheva, V. (2022). Biomarkers for pollution in caged mussels from three reservoirs in Bulgaria: A pilot study. *Heliyon*, 8(3), e09069. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09069>

79. Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science advances*, 3(7), e1700782. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782>

80. Gnatyshyna, L., Falfushynska, H., Bodilovska, O., Oleynik, O., Golubev, A., & Stoliar, O. (2012). Metallothionein and glutathione in *Lymnaea stagnalis* determine the specificity of responses to the effects of ionising radiation. *Radioprotection*, 47(2), 231–242. <https://doi.org/10.1051/radiopro/2012004>

81. Gnatyshyna, L., Khoma, V., Mishchuk, O., Martinyuk, V., Sprinĝe, G., & Stoliar, O. (2020). 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 international*, 27(10), 11038–11049. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-07698-4>

82. Gómez-Oliván, L. M., Galar-Martínez, M., García-Medina, S., Valdés-Alanís, A., Islas-Flores, H., & Neri-Cruz, N. (2014). Genotoxic response and oxidative stress induced by diclofenac, ibuprofen and naproxen in *Daphnia magna*.

Drug and chemical toxicology, 37(4), 391–399.
<https://doi.org/10.3109/01480545.2013.870191>

83. Jan-Roblero, J., & Cruz-Maya, J. A. (2023). Ibuprofen: Toxicology and Biodegradation of an Emerging Contaminant. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(5), 2097. <https://doi.org/10.3390/molecules28052097>

84. González-Fernández, C., Díaz Baños, F. G., Esteban, M. Á., & Cuesta, A. (2021). Functionalized Nanoplastics (NPs) Increase the Toxicity of Metals in Fish Cell Lines. *International journal of molecular sciences*, 22(13), 7141. <https://doi.org/10.3390/ijms22137141>

85. 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)

86. Gündoğdu, S., Kutlu, B., Özcan, T., Büyükdeveci, F., & Blettler, M. C. M. (2023). Microplastic pollution in two remote rivers of Türkiye. *Environmental monitoring and assessment*, 195(6), 791. <https://doi.org/10.1007/s10661-023-11426-z>

87. Gupta, S. K., & Singh, J. (2011). Evaluation of mollusc as sensitive indicator of heavy metal pollution in aquatic system: a review. *IIOAB J*, 2(1), 49-57.

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

89. Hajnóczky, G., Csordás, G., Das, S., Garcia-Perez, C., Saotome, M., Roy, S. S., & Yi, M. (2006). Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial Ca²⁺ uptake in apoptosis. *Cell calcium*, 40(5-6), 553-560. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2006.08.016>

90. Hale, R. C., Seeley, M. E., La Guardia, M. J., Mai, L., & Zeng, E. Y. (2020). A global perspective on microplastics. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 125(1), e2018JC014719. <https://doi.org/10.1029/2018JC014719>

91. Handy, D. E., & Loscalzo, J. (2017). Responses to reductive stress in the cardiovascular system. *Free radical biology & medicine*, 109, 114–124. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.006>

92.Hantoro, I., Löhr, A. J., Van Belleghem, F. G. A. J., Widianarko, B., & Ragas, A. M. J. (2019). Microplastics in coastal areas and seafood: implications for food safety. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*, 36(5), 674–711. <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1585581>

93.Hathout, Y., Fabris, D., & Fenselau, C. (2001). Stoichiometry in zinc ion transfer from metallothionein to zinc finger peptides. *International Journal of Mass Spectrometry*, 204(1-3), 1-6. [https://doi.org/10.1016/S1387-3806\(00\)00343-2](https://doi.org/10.1016/S1387-3806(00)00343-2)

94.Hayashi, Y., Heckmann, L. H., Callaghan, A., & Sibly, R. M. (2008). Reproduction recovery of the crustacean *Daphnia magna* after chronic exposure to ibuprofen. *Ecotoxicology (London, England)*, 17(4), 246–251. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0191-3>

95.Hickey, E. E., Page, S. W., & Trott, D. J. (2020). In vitro efficacy and pharmacodynamic profiles of four polyether ionophores against methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 43(5), 499–507. <https://doi.org/10.1111/jvp.12871>

96.Hirt, N., & Body-Malapel, M. (2020). Immunotoxicity and intestinal effects of nano- and microplastics: a review of the literature. *Particle and fibre toxicology*, 17(1), 57. <https://doi.org/10.1186/s12989-020-00387-7>

97.Hook, S. E., Gallagher, E. P., & Batley, G. E. (2014). The role of biomarkers in the assessment of aquatic ecosystem health. *Integrated environmental assessment and management*, 10(3), 327–341. <https://doi.org/10.1002/ieam.1530>

98.Iglesias, A., Nebot, C., Vázquez, B. I., Miranda, J. M., Abuín, C. M. F., & Cepeda, A. (2014). Detection of veterinary drug residues in surface waters collected nearby farming areas in Galicia, North of Spain. *Environmental science and pollution research international*, 21(3), 2367–2377. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2142-7>

99.Ikkere, L. E., Perkons, I., Sire, J., Pugajeva, I., & Bartkevics, V. (2018). Occurrence of polybrominated diphenyl ethers, perfluorinated compounds, and

nonsteroidal anti-inflammatory drugs in freshwater mussels from Latvia. *Chemosphere*, 213, 507–516. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.036>

100. Impellitteri, F., Yunko, K., Martyniuk, V., Matskiv, T., Lechachenko, S., Khoma, V., Mudra, A., Piccione, G., Stoliar, O., & Faggio, C. (2023). Physiological and biochemical responses to caffeine and microplastics in *Mytilus galloprovincialis*. *The Science of the total environment*, 890, 164075. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164075>

101. 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>

102. Isani, G., Monari, M., Andreani, G., Fabbri, M., & Carpenè, E. (2003). Effect of copper exposure on the antioxidant enzymes in bivalve mollusc *Scapharca inaequalvis*. *Veterinary research communications*, 27 Suppl 1, 691–693. <https://doi.org/10.1023/b:verc.0000014249.21581.5d>

103. Jambeck, J. R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T. R., Perryman, M., Andrady, A., Narayan, R., & Law, K. L. (2015). Marine pollution. Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science (New York, N.Y.)*, 347(6223), 768–771. <https://doi.org/10.1126/science.1260352>

104. Jang, Y., Shin, J. S., Yoon, Y. S., Go, Y. Y., Lee, H. W., Kwon, O. S., Park, S., Park, M. S., & Kim, M. (2018). Salinomycin Inhibits Influenza Virus Infection by Disrupting Endosomal Acidification and Viral Matrix Protein 2 Function. *Journal of virology*, 92(24), e01441-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.01441-18>

105. Jan-Roblero, J., & Cruz-Maya, J. A. (2023). Ibuprofen: Toxicology and Biodegradation of an Emerging Contaminant. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(5), 2097. <https://doi.org/10.3390/molecules28052097>

106. Jenny, M. J., Payton, S. L., Baltzegar, D. A., & Lozier, J. D. (2016). Phylogenetic Analysis of Molluscan Metallothioneins: Evolutionary Insight from *Crassostrea virginica*. *Journal of molecular evolution*, 83(3-4), 110–125. <https://doi.org/10.1007/s00239-016-9758-4>

107. Jeyavani, J., Sibiya, A., Stalin, T., Vigneshkumar, G., Al-Ghanim, K. A., Riaz, M. N., Govindarajan, M., & Vaseeharan, B. (2023). Biochemical, Genotoxic and Histological Implications of Polypropylene Microplastics on Freshwater Fish *Oreochromis mossambicus*: An Aquatic Eco-Toxicological Assessment. *Toxics*, *11*(3), 282. <https://doi.org/10.3390/toxics11030282>
108. Kadota, Y., Suzuki, S., Ideta, S., Fukinbara, Y., Kawakami, T., Imai, H., Nakagawa, Y., & Sato, M. (2010). Enhanced metallothionein gene expression induced by mitochondrial oxidative stress is reduced in phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase-overexpressed cells. *European journal of pharmacology*, *626*(2-3), 166–170. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.09.060>
109. Kaile, N., Lindivat, M., Elio, J., Thuestad, G., Crowley, Q. G., & Hoell, I. A. (2020). Preliminary results from detection of microplastics in liquid samples using flow cytometry. *Frontiers in Marine Science*, *7*, 552688. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.552688>
110. Kang, H. J., Park, H. J., Kwon, O. K., Lee, W. S., Jeong, D. H., Ju, B. K., & Kwon, J. H. (2018). Occurrence of microplastics in municipal sewage treatment plants: a review. *Environmental health and toxicology*, *33*(3), e2018013. <https://doi.org/10.5620/eht.e2018013>
111. 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>
112. Kato, S., Matsui, T., Gatsogiannis, C., & Tanaka, Y. (2018). Molluscan hemocyanin: structure, evolution, and physiology. *Biophysical reviews*, *10*(2), 191–202. <https://doi.org/10.1007/s12551-017-0349-4>
113. Kazi Tani, L. S., Gourlan, A. T., Dennouni-Medjati, N., Telouk, P., Dali-Sahi, M., Harek, Y., Sun, Q., Hackler, J., Belhadj, M., Schomburg, L., & Charlet, L. (2021). Copper Isotopes and Copper to Zinc Ratio as Possible Biomarkers for Thyroid Cancer. *Frontiers in medicine*, *8*, 698167. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.698167>

114.Khan, B., Ho, K. T., & Burgess, R. M. (2020). Application of Biomarker Tools Using Bivalve Models Toward the Development of Adverse Outcome Pathways for Contaminants of Emerging Concern. *Environmental toxicology and chemistry*, 39(8), 1472–1484. <https://doi.org/10.1002/etc.4757>

115.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. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111695>

116.Khoma, V., Gnatyshyna, L., Martinyuk, V., Rarok, Y., Mudra, A., & Stoliar, O. (2020). Biochemical Responses of the Bivalve Mollusk *Unio tumidus* Inhabiting a Small Power Plant Reservoir on the Dniester River Basin, Ukraine. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 105(1), 67–75. <https://doi.org/10.1007/s00128-020-02873-2>

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

118.Kim, D., Chae, Y., & An, Y. J. (2017). Mixture Toxicity of Nickel and Microplastics with Different Functional Groups on *Daphnia magna*. *Environmental science & technology*, 51(21), 12852–12858. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03732>

119.Kim, J. H., Kim, T. Y., Kim, H. S., Hong, S., & Yoon, S. (2012). Lower salinomycin concentration increases apoptotic detachment in high-density cancer cells. *International journal of molecular sciences*, 13(10), 13169–13182. <https://doi.org/10.3390/ijms131013169>

120.Kim, S. C., & Carlson, K. (2006). Occurrence of ionophore antibiotics in water and sediments of a mixed-landscape watershed. *Water research*, 40(13), 2549–2560. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.04.036>

121.Kiran, B. R., Kopperi, H., & Venkata Mohan, S. (2022). Micro/nano-plastics occurrence, identification, risk analysis and mitigation: challenges and perspectives. *Reviews in environmental science and bio/technology*, 21(1), 169–203. <https://doi.org/10.1007/s11157-021-09609-6>

122.Kiss T. (2010). Apoptosis and its functional significance in molluscs. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 15(3), 313–321. <https://doi.org/10.1007/s10495-009-0446-3>

123.Klaassen, C. D., Liu, J., & Diwan, B. A. (2009). Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicology and applied pharmacology*, 238(3), 215–220. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.03.026>

124.Koelmans, A. A., Diepens, N. J., Velzeboer, I., Besseling, E., Quik, J. T., & van de Meent, D. (2015). Guidance for the prognostic risk assessment of nanomaterials in aquatic ecosystems. *The Science of the total environment*, 535, 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.02.032>

125.Kolodziejaska, M., Maszkowska, J., Białk-Bielińska, A., Steudte, S., Kumirska, J., Stepnowski, P., & Stolte, S. (2013). Aquatic toxicity of four veterinary drugs commonly applied in fish farming and animal husbandry. *Chemosphere*, 92(9), 1253–1259. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.04.057>

126.Kostić, J., Kolarević, S., Kračun-Kolarević, M., Aborgiba, M., Gačić, Z., Paunović, M., Višnjic-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. *The Science of the total environment*, 601-602, 1670–1681. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.273>

127.Kraemer, S. A., Ramachandran, A., & Perron, G. G. (2019). Antibiotic pollution in the environment: from microbial ecology to public policy. *Microorganisms*, 7(6), 180. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7060180>

128.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>

129. Kültz D. (2003). Evolution of the cellular stress proteome: from monophyletic origin to ubiquitous function. *The Journal of experimental biology*, 206(Pt 18), 3119–3124. <https://doi.org/10.1242/jeb.00549>
130. Kumar, V., Parihar, R. D., Sharma, A., Bakshi, P., Singh Sidhu, G. P., Bali, A. S., Karaouzas, I., Bhardwaj, R., Thukral, A. K., Gyasi-Agyei, Y., & Rodrigo-Comino, J. (2019). Global evaluation of heavy metal content in surface water bodies: A meta-analysis using heavy metal pollution indices and multivariate statistical analyses. *Chemosphere*, 236, 124364. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124364>
131. Kwon, J. H., Kim, J. W., Pham, T. D., Tarafdar, A., Hong, S., Chun, S. H., Lee, S. H., Kang, D. Y., Kim, J. Y., Kim, S. B., & Jung, J. (2020). Microplastics in Food: A Review on Analytical Methods and Challenges. *International journal of environmental research and public health*, 17(18), 6710. <https://doi.org/10.3390/ijerph17186710>
132. Kye, H., Kim, J., Ju, S., Lee, J., Lim, C., & Yoon, Y. (2023). Microplastics in water systems: A review of their impacts on the environment and their potential hazards. *Heliyon*, 9(3), e14359. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14359>
133. LaLone, C. A., Berninger, J. P., Villeneuve, D. L., & Ankley, G. T. (2014). Leveraging existing data for prioritization of the ecological risks of human and veterinary pharmaceuticals to aquatic organisms. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 369(1656), 20140022. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0022>
134. Lasee, S., Mauricio, J., Thompson, W. A., Karnjanapiboonwong, A., Kasumba, J., Subbiah, S., Morse, A. N., & Anderson, T. A. (2017). Microplastics in a freshwater environment receiving treated wastewater effluent. *Integrated environmental assessment and management*, 13(3), 528–532. <https://doi.org/10.1002/ieam.1915>
135. Lee, C. F., Caudal, A., Abell, L., Nagana Gowda, G. A., & Tian, R. (2019). Targeting NAD⁺ Metabolism as Interventions for Mitochondrial Disease. *Scientific reports*, 9(1), 3073. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39419-4>

136.Lee, S. J., Park, M. H., Kim, H. J., & Koh, J. Y. (2010). Metallothionein-3 regulates lysosomal function in cultured astrocytes under both normal and oxidative conditions. *Glia*, 58(10), 1186–1196. <https://doi.org/10.1002/glia.20998>

137.Lefcort, H., Cleary, D. A., Marble, A. M., Phillips, M. V., Stoddard, T. J., Tuthill, L. M., & Winslow, J. R. (2015). Snails from heavy-metal polluted environments have reduced sensitivity to carbon dioxide-induced acidity. *SpringerPlus*, 4, 267. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1073-9>

138.Lei, L., Wu, S., Lu, S., Liu, M., Song, Y., Fu, Z., Shi, H., Raley-Susman, K. M., & He, D. (2018). Microplastic particles cause intestinal damage and other adverse effects in zebrafish *Danio rerio* and nematode *Caenorhabditis elegans*. *The Science of the total environment*, 619-620, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.103>

139.Leignel, V., Hardivillier, Y., & Laulier, M. (2005). Small metallothionein MT-10 genes in coastal and hydrothermal mussels. *Marine biotechnology (New York, N.Y.)*, 7(3), 236–244. <https://doi.org/10.1007/s10126-004-0135-8>

140.Li, J., Liu, H., & Chen, J. P. (2018). Microplastics in freshwater systems: A review on occurrence, environmental effects, and methods for microplastics detection. *Water research*, 137, 362-374. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.12.056>

141.Li, J., Zhang, K., & Zhang, H. (2018). Adsorption of antibiotics on microplastics. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 237, 460–467. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.02.050>

142.Lindeque, J. Z., Levanets, O., Louw, R., & van der Westhuizen, F. H. (2010). The involvement of metallothioneins in mitochondrial function and disease. *Current protein & peptide science*, 11(4), 292–309. <https://doi.org/10.2174/138920310791233378>

143.Lionetto, F., & Esposito Corcione, C. (2021). An overview of the sorption studies of contaminants on poly (Ethylene Terephthalate) microplastics in the marine environment. *Journal of Marine Science and Engineering*, 9(4), 445. <https://doi.org/10.3390/jmse9040445>

144. Livingstone D. R. (2001). Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine pollution bulletin*, 42(8), 656–666. [https://doi.org/10.1016/s0025-326x\(01\)00060-1](https://doi.org/10.1016/s0025-326x(01)00060-1)

145. 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.

146. Luís, L. G., Ferreira, P., Fonte, E., Oliveira, M., & Guilhermino, L. (2015). Does the presence of microplastics influence the acute toxicity of chromium(VI) to early juveniles of the common goby (*Pomatoschistus microps*)? A study with juveniles from two wild estuarine populations. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 164, 163–174. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.04.018>

147. Luo, Y., Guo, W., Ngo, H. H., Nghiem, L. D., Hai, F. I., Zhang, J., Liang, S., & Wang, X. C. (2014). A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *The Science of the total environment*, 473-474, 619–641. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.065>

148. 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>

149. Magni, S., Binelli, A., Pittura, L., Avio, C. G., Della Torre, C., Parenti, C. C., Gorbi, S., & Regoli, F. (2019). The fate of microplastics in an Italian Wastewater Treatment Plant. *The Science of the total environment*, 652, 602–610. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.269>

150. Magni, S., Della Torre, C., Garrone, G., D'Amato, A., Parenti, C. C., & Binelli, A. (2019). First evidence of protein modulation by polystyrene microplastics in a freshwater biological model. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 250, 407–415. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.04.088>

151. Maity, S., Rajkumar, A., Matai, L., Bhat, A., Ghosh, A., Agam, G., Kaur, S., Bhatt, N. R., Mukhopadhyay, A., Sengupta, S., & Chakraborty, K. (2016).

Oxidative Homeostasis Regulates the Response to Reductive Endoplasmic Reticulum Stress through Translation Control. *Cell reports*, 16(3), 851–865. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.06.025>

152. Marczenko, Z., & Balcerzak, M. (2000). *Separation, preconcentration and spectrophotometry in inorganic analysis*. Elsevier.

153. 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 of the United States of America*, 96(5), 1936–1940. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.5.1936>

154. Martínez-Alarcón, D., Saborowski, R., Rojo-Arreola, L., & García-Carreño, F. (2018). Is digestive cathepsin D the rule in decapod crustaceans? *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 215, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2017.09.006>

155. Masura, J., Baker, J., Foster, G., & Arthur, C. (2015) Laboratory methods for the analysis of microplastics in the marine environment: recommendations for quantifying synthetic particles in waters and sediments. Silver Spring, MD, NOAA Marine Debris Division, 31pp. (NOAA Technical Memorandum NOS-OR&R-48): <http://dx.doi.org/10.25607/OBP-604>

156. Matozzo, V., Zampieri, C., Munari, M., & Marin, M. G. (2019). Glyphosate affects haemocyte parameters in the clam *Ruditapes philippinarum*. *Marine environmental research*, 146, 66–70. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2019.03.008>

157. Matskiv, T., & Stoliar, O. (2023). Biochemical responses of the *Dreissena polymorpha* from municipal pond to caffeine, microplastics, and heating in single and combined exposure. *Studia Biologica*, 17(2), 27–42. <https://dx.doi.org/10.30970/sbi.1702.717>

158. Miranda, T., Vieira, L. R., & Guilhermino, L. (2019). Neurotoxicity, behavior, and lethal effects of cadmium, microplastics, and their mixtures on *Pomatoschistus microps* juveniles from two wild populations exposed under laboratory conditions—implications to environmental and human risk assessment.

International Journal of Environmental Research and Public Health, 16(16), 2857.
<https://doi.org/10.3390/ijerph16162857>

159.Mofijur, M., Ahmed, S. F., Rahman, S. M. A., Arafat Siddiki, S. Y., Islam, A. B. M. S., Shahabuddin, M., Ong, H. C., Mahlia, T. M. I., Djavanroodi, F., & Show, P. L. (2021). Source, distribution and emerging threat of micro- and nanoplastics to marine organism and human health: Socio-economic impact and management strategies. *Environmental research*, 195, 110857.
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.110857>

160.Mooney, D., Richards, K. G., Danaher, M., Grant, J., Gill, L., Mellander, P. E., & Coxon, C. E. (2020). An investigation of anticoccidial veterinary drugs as emerging organic contaminants in groundwater. *The Science of the total environment*, 746, 141116. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141116>

161.Moore, C. J., Lattin, G. L., & Zellers, A. F. (2005). Density of plastic particles found in zooplankton trawls from coastal waters of California to the North Pacific Central Gyre. In *The plastic debris river to sea conference, Redondo Beach, California*.

162.Motta, C. M., Frezza, V., & Simoniello, P. (2013). Caspase 3 in molluscan tissues: Localization and possible function. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 319(10), 548-559.
<https://doi.org/10.1002/jez.1817>

163.Nicholson, S. (2003). The mytilid mussel *Perna viridis* (Mytilidae: Bivalvia) as a pollution monitor in Hong Kong. *Turning the tides, Marine Biological Association of Hong Kong. University Press, Hong Kong*, 201-228.

164.Nielson, K. B., & Winge, D. R. (1985). Independence of the domains of metallothionein in metal binding. *The Journal of biological chemistry*, 260(15), 8698–8701.

165.Nordberg G. F. (2010). Biomarkers of exposure, effects and susceptibility in humans and their application in studies of interactions among metals in China. *Toxicology letters*, 192(1), 45–49. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.06.859>

166.Ogunwole, G. A., Saliu, J. K., Osuala, F. I., & Odunjo, F. O. (2021). Chronic levels of ibuprofen induces haematotoxic and histopathology damage in the gills, liver, and kidney of the African sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*). *Environmental science and pollution research international*, 28(20), 25603–25613. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-12286-7>

167.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)

168.Oliver, L. M., Fisher, W. S., Winstead, J. T., Hemmer, B. L., & Long, E. R. (2001). Relationships between tissue contaminants and defense-related characteristics of oysters (*Crassostrea virginica*) from five Florida bays. *Aquatic toxicology*, 55(3-4), 203-222. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(01\)00161-8](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(01)00161-8)

169.Orrenius S. (2019). Role of Cell Death in Toxicology: Does It Matter How Cells Die? *Annual review of pharmacology and toxicology*, 59, 1–14. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010818-021725>

170.Otsuka, F., Koizumi, S., Kimura, M., & Ohsawa, M. (1988). Silver staining for carboxymethylated metallothioneins in polyacrylamide gels. *Analytical biochemistry*, 168(1), 184–192. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(88\)90027-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90027-9)

171.Pain-Devin, S., Cossu-Leguille, C., Geffard, A., Giambérini, L., Jouenne, T., Minguez, L., Naudin, B., Parant, M., Rodius, F., Rousselle, P., Tarnowska, K., Daguin-Thiébaud, C., Viard, F., & Devin, S. (2014). Towards a better understanding of biomarker response in field survey: a case study in eight populations of zebra mussels. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 155, 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.06.008>

172.Pal, A., Gin, K. Y., Lin, A. Y., & Reinhard, M. (2010). Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: review of recent occurrences, sources, fate and effects. *The Science of the total environment*, 408(24), 6062–6069. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.09.026>

173. Pandey, S., & Kumari, N. (2023). Impact assessment of heavy metal pollution in surface water bodies. *Metals in Water*, 129-154. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95919-3.00004-5>

174. Pannetier, P., Morin, B., Le Bihanic, F., Dubreil, L., Clérandeau, C., Chouvellon, F., Van Arkel, K., Danion, M., & Cachot, J. (2020). Environmental samples of microplastics induce significant toxic effects in fish larvae. *Environment international*, 134, 105047. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105047>

175. Parolini, M., & Binelli, A. (2012). Cyto-genotoxic effects induced by three brominated diphenyl ether congeners on the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 79, 247–255. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.01.008>

176. Parolini, M., De Felice, B., Gazzotti, S., Annunziata, L., Sugni, M., Bacchetta, R., & Ortenzi, M. A. (2020). Oxidative stress-related effects induced by micronized polyethylene terephthalate microparticles in the *Manila clam*. *Journal of toxicology and environmental health. Part A*, 83(4), 168–179. <https://doi.org/10.1080/15287394.2020.1737852>

177. Patel, M., Kumar, R., Kishor, K., Mlsna, T., Pittman, C. U., Jr, & Mohan, D. (2019). Pharmaceuticals of Emerging Concern in Aquatic Systems: Chemistry, Occurrence, Effects, and Removal Methods. *Chemical reviews*, 119(6), 3510–3673. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00299>

178. Paul-Pont, K. Tallec, C. Gonzalez-Fernandez, C. Lambert, D. Vincent, D. Mazurais, J.L. Zambonino-Infante, G. Brotons, F. Lagarde, C. Fabioux, P. Soudant Constraints and priorities for conducting experimental exposures of marine organisms to microplastics *Frontiers in Marine Science*, 5, 252. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00252>

179. Peterson, R. E., & Bollier, M. E. (1955). Spectrophotometric determination of serum copper with biscyclohexanoneoxalyldihydrazone. *Analytical Chemistry*, 27(7), 1195-1197. <https://doi.org/10.1021/ac60103a054>

180. Peyrot, C., Gagnon, C., Gagné, F., Willkinson, K. J., Turcotte, P., & Sauvé, S. (2009). Effects of cadmium telluride quantum dots on cadmium bioaccumulation

and metallothionein production to the freshwater mussel, *Elliptio complanata*. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*, 150(2), 246–251. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.05.002>

181. Qi, D., Liu, Y., Li, J., Huang, J. H., Hu, X., & Wu, E. (2022). Salinomycin as a potent anticancer stem cell agent: State of the art and future directions. *Medicinal research reviews*, 42(3), 1037–1063. <https://doi.org/10.1002/med.21870>

182. Qu, H., Ma, R., Wang, B., Yang, J., Duan, L., & Yu, G. (2019). Enantiospecific toxicity, distribution and bioaccumulation of chiral antidepressant venlafaxine and its metabolite in loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) co-exposed to microplastic and the drugs. *Journal of hazardous materials*, 370, 203–211. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.04.041>

183. Quinn, B., Schmidt, W., O'Rourke, K., & Hernan, R. (2011). Effects of the pharmaceuticals gemfibrozil and diclofenac on biomarker expression in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and their comparison with standardised toxicity tests. *Chemosphere*, 84(5), 657–663. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.03.033>

184. Rainsford, K. D. (2009). Ibuprofen: pharmacology, efficacy and safety. *Inflammopharmacology*, 17(6), 275–342. <https://doi.org/10.1007/s10787-009-0016-x>

185. 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)

186. Rigby Duncan, K. E., & Stillman, M. J. (2007). Evidence for noncooperative metal binding to the alpha domain of human metallothionein. *The FEBS journal*, 274(9), 2253–2261. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05762.x>

187. Rist, S. E., Assidqi, K., Zamani, N. P., Appel, D., Perschke, M., Huhn, M., & Lenz, M. (2016). Suspended micro-sized PVC particles impair the performance and decrease survival in the Asian green mussel *Perna viridis*. *Marine pollution bulletin*, 111(1-2), 213–220. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.07.006>

188. Riva, C., Binelli, A., Parolini, M., & Provini, A. (2010). The case of pollution of Lake Maggiore: a 12-year study with the bioindicator mussel *Dreissena*

polymorpha. *Water, Air, & Soil Pollution*, 210, 75-86. <https://doi.org/10.1007/s11270-009-0225-3>

189.Rochman, C. M., Kurobe, T., Flores, I., & Teh, S. J. (2014). Early warning signs of endocrine disruption in adult fish from the ingestion of polyethylene with and without sorbed chemical pollutants from the marine environment. *The Science of the total environment*, 493, 656–661. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.06.051>

190.Rochman, C. M., Manzano, C., Hentschel, B. T., Simonich, S. L., & Hoh, E. (2013). Polystyrene plastic: a source and sink for polycyclic aromatic hydrocarbons in the marine environment. *Environmental science & technology*, 47(24), 13976–13984. <https://doi.org/10.1021/es403605f>

191.Rochman, C. M., Tahir, A., Williams, S. L., Baxa, D. V., Lam, R., Miller, J. T., Teh, F. C., Werorilangi, S., & Teh, S. J. (2015). Anthropogenic debris in seafood: Plastic debris and fibers from textiles in fish and bivalves sold for human consumption. *Scientific reports*, 5, 14340. <https://doi.org/10.1038/srep14340>

192.Rodrigues, M. O., Abrantes, N., Gonçalves, F. J. M., Nogueira, H., Marques, J. C., & Gonçalves, A. M. M. (2018). Spatial and temporal distribution of microplastics in water and sediments of a freshwater system (Antuã River, Portugal). *The Science of the total environment*, 633, 1549–1559. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.233>

193.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)

194.Rowley, K. H., Cucknell, A. C., Smith, B. D., Clark, P. F., & Morritt, D. (2020). London's river of plastic: High levels of microplastics in the Thames water column. *The Science of the total environment*, 740, 140018. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140018>

195.Sacher, F., Ehmann, M., Gabriel, S., Graf, C., & Brauch, H. J. (2008). Pharmaceutical residues in the river Rhine-results of a one-decade monitoring programme. *Journal of environmental monitoring : JEM*, 10(5), 664–670. <https://doi.org/10.1039/b800701b>

196.Sadri, S. S., & Thompson, R. C. (2014). On the quantity and composition of floating plastic debris entering and leaving the Tamar Estuary, Southwest England. *Marine pollution bulletin*, *81*(1), 55–60. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.02.020>

197.Santos, J. L., Aparicio, I., Callejón, M., & Alonso, E. (2009). Occurrence of pharmaceutically active compounds during 1-year period in wastewaters from four wastewater treatment plants in Seville (Spain). *Journal of hazardous materials*, *164*(2-3), 1509–1516. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.09.073>

198.Santos, L. H., Rodríguez-Mozaz, S., & Barceló, D. (2021). Microplastics as vectors of pharmaceuticals in aquatic organisms—an overview of their environmental implications. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, *3*, 100079. <https://doi.org/10.1016/j.cscee.2021.100079>

199.Sarasquete, C., & Segner, H. (2000). Cytochrome P4501A (CYP1A) in teleostean fishes. A review of immunohistochemical studies. *The Science of the total environment*, *247*(2-3), 313–332. [https://doi.org/10.1016/s0048-9697\(99\)00500-8](https://doi.org/10.1016/s0048-9697(99)00500-8)

200. Sarijan, S., Azman, S., Said, M. I. M., & Jamal, M. H. (2021). Microplastics in freshwater ecosystems: a recent review of occurrence, analysis, potential impacts, and research needs. *Environmental science and pollution research international*, *28*(2), 1341–1356. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11171-7>

201.Sasoni, N., Hartman, M. D., García-Effron, G., Guerrero, S. A., Iglesias, A. A., & Arias, D. G. (2022). Functional characterization of monothiol and dithiol glutaredoxins from *Leptospira interrogans*. *Biochimie*, *197*, 144–159. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2022.02.006>

202.Scholz, S., Nichols, J. W., Escher, B. I., Ankley, G. T., Altenburger, R., Blackwell, B., Brack, W., Burkhard, L., Collette, T. W., Doering, J. A., Ekman, D., Fay, K., Fischer, F., Hackermüller, J., Hoffman, J. C., Lai, C., Leuthold, D., Martinovic-Weigelt, D., Reemtsma, T., Pollesch, N., ... von Bergen, M. (2022). The Eco-Exposome Concept: Supporting an Integrated Assessment of Mixtures of Environmental Chemicals. *Environmental toxicology and chemistry*, *41*(1), 30–45. <https://doi.org/10.1002/etc.5242>

203.Serra, R., Isani, G., Tramontano, G., & Carpené, E. (1999). Seasonal dependence of cadmium accumulation and Cd-binding proteins in *Mytilus galloprovincialis* exposed to cadmium. *Comparative biochemistry and physiology. Part C, Pharmacology, toxicology & endocrinology* 123(2), 165–174. [https://doi.org/10.1016/s0742-8413\(99\)00024-9](https://doi.org/10.1016/s0742-8413(99)00024-9)

204.Shang, X., Lu, J., Feng, C., Ying, Y., He, Y., Fang, S., Lin, Y., Dahlgren, R., & Ju, J. (2020). Microplastic (1 and 5 μm) exposure disturbs lifespan and intestine function in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *The Science of the total environment*, 705, 135837. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135837>

205.Shaw, J. P., Moore, M. N., Readman, J. W., Mou, Z., Langston, W. J., Lowe, D. M., Frickers, P. E., Al-Moosawi, L., Pascoe, C., & Beesley, A. (2019). Oxidative stress, lysosomal damage and dysfunctional autophagy in molluscan hepatopancreas (digestive gland) induced by chemical contaminants. *Marine environmental research*, 152, 104825. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2019.10482>

206.Shen, S., Shao, Y., & Li, C. (2023). Different types of cell death and their shift in shaping disease. *Cell death discovery*, 9(1), 284. <https://doi.org/10.1038/s41420-023-01581-0>

207.Shi, W., Han, Y., Sun, S., Tang, Y., Zhou, W., Du, X., & Liu, G. (2020). Immunotoxicities of microplastics and sertraline, alone and in combination, to a bivalve species: size-dependent interaction and potential toxication mechanism. *Journal of hazardous materials*, 396, 122603. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122603>

208.Smith, M., Love, D. C., Rochman, C. M., & Neff, R. A. (2018). Microplastics in Seafood and the Implications for Human Health. *Current environmental health reports*, 5(3), 375–386. <https://doi.org/10.1007/s40572-018-0206-z>

209.Soazig, L., & Marc, L. (2003). Potential use of the levels of the mRNA of a specific metallothionein isoform (MT-20) in mussel (*Mytilus edulis*) as a biomarker

of cadmium contamination. *Marine pollution bulletin*, 46(11), 1450–1455.
[https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(03\)00283-2](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(03)00283-2)

210. Soazig, L., & Marc, L. (2003). Potential use of the levels of the mRNA of a specific metallothionein isoform (MT-20) in mussel (*Mytilus edulis*) as a biomarker of cadmium contamination. *Marine Pollution Bulletin*, 46(11), 1450-1455.
[https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(03\)00283-2](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(03)00283-2)

211. Sommer, A. K., Hermawan, A., Mickler, F. M., Ljepoja, B., Knyazev, P., Bräuchle, C., Ullrich, A., Wagner, E., & Roidl, A. (2016). Salinomycin co-treatment enhances tamoxifen cytotoxicity in luminal A breast tumor cells by facilitating lysosomal degradation of receptor tyrosine kinases. *Oncotarget*, 7(31), 50461–50476.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.10459>

212. Sousa, J. C. G., Ribeiro, A. R., Barbosa, M. O., Pereira, M. F. R., & Silva, A. M. T. (2018). A review on environmental monitoring of water organic pollutants identified by EU guidelines. *Journal of hazardous materials*, 344, 146–162.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.09.058>

213. Stein, L. R., & Imai, S. (2012). The dynamic regulation of NAD metabolism in mitochondria. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 23(9), 420–428. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.06.005>

214. Stoliar, O. B., & Lushchak, V. I. (2012). Environmental pollution and oxidative stress in fish. *Oxidative stress-environmental induction and dietary antioxidants*, 131-166.

215. Story, P., & Doube, A. (2004). A case of human poisoning by salinomycin, an agricultural antibiotic. *The New Zealand medical journal*, 117(1190), U799.

216. Stott, L. C., Schnell, S., Hogstrand, C., Owen, S. F., & Bury, N. R. (2015). A primary fish gill cell culture model to assess pharmaceutical uptake and efflux: evidence for passive and facilitated transport. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 159, 127–137. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.12.007>

217. Sun, P., Barmaz, D., Cabrera, M. L., Pavlostathis, S. G., & Huang, C. H. (2013). Detection and quantification of ionophore antibiotics in runoff, soil and

poultry litter. *Journal of chromatography. A*, 1312, 10–17.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.08.044>

218.Sun, S., Shi, W., Tang, Y., Han, Y., Du, X., Zhou, W., Hu, Y., Zhou, C., & Liu, G. (2020). Immunotoxicity of petroleum hydrocarbons and microplastics alone or in combination to a bivalve species: Synergic impacts and potential toxication mechanisms. *The Science of the total environment*, 728, 138852.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138852>

219.Sureda, A., Box, A., Tejada, S., Blanco, A., Caixach, J., & Deudero, S. (2011). Biochemical responses of *Mytilus galloprovincialis* as biomarkers of acute environmental pollution caused by the Don Pedro oil spill (Eivissa Island, Spain). *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 101(3-4), 540–549.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.12.011>

220.Svenningsen, E. B., Thyrssted, J., Blay-Cadanet, J., Liu, H., Lin, S., Moyano-Villameriel, J., Olganier, D., Idorn, M., Paludan, S. R., Holm, C. K., & Poulsen, T. B. (2021). Ionophore antibiotic X-206 is a potent inhibitor of SARS-CoV-2 infection *in vitro*. *Antiviral research*, 185, 104988.
<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104988>

221.Tabrizi, L., Chiniforoshan, H., & McArdle, P. (2015). Synthesis, crystal structure and spectroscopy of bioactive Cd(II) polymeric complex of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac sodium: antiproliferative and biological activity. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, 136 Pt B, 429–436. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.09.053>

222.Torreggiani, A., & Tinti, A. (2010). Raman spectroscopy a promising technique for investigations of metallothioneins. *Metallomics : integrated biometal science*, 2(4), 246–260. <https://doi.org/10.1039/b922526a>

223.Tosetto, L., Brown, C., & Williamson, J. E. (2016). Microplastics on beaches: ingestion and behavioural consequences for beachhoppers. *Marine biology*, 163(10), 199. <https://doi.org/10.1007/s00227-016-2973-0>

224.Trapp, J., Armengaud, J., Salvador, A., Chaumot, A., & Geffard, O. (2014). Next-generation proteomics: toward customized biomarkers for environmental

biomonitoring. *Environmental science & technology*, 48(23), 13560–13572.
<https://doi.org/10.1021/es501673s>

225. Turja, R., Höher, N., Snoeijs, P., Baršienė, J., Butrimavičienė, L., Kuznetsova, T., Kholodkevich, S. V., Devier, M. H., Budzinski, H., & Lehtonen, K. K. (2014). A multibiomarker approach to the assessment of pollution impacts in two Baltic Sea coastal areas in Sweden using caged mussels (*Mytilus trossulus*). *The Science of the total environment*, 473-474, 398–409.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.038>

226. Turk, B., & Turk, V. (2009). Lysosomes as "suicide bags" in cell death: myth or reality? *The Journal of biological chemistry*, 284(33), 21783–21787.
<https://doi.org/10.1074/jbc.R109.023820>

227. UniProt URL <https://www.uniprot.org/uniprot/A4UHT8> application date: 03.02.2023

228. Varel, V. H., Wells, J. E., Shelver, W. L., Rice, C. P., Armstrong, D. L., & Parker, D. B. (2012). Effect of anaerobic digestion temperature on odour, coliforms and chlortetracycline in swine manure or monensin in cattle manure. *Journal of applied microbiology*, 112(4), 705–715. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05250.x>

229. Vergani, L. (2009). Metallothioneins in aquatic organisms: fish, crustaceans, molluscs and echinoderms. *Metal ions in life sciences*, 5, 199-238.

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

231. 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. Toxicology & pharmacology : CBP*, 146(3), 281–300.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.04.011>

232. Viarengo, A., Palmero, S., Zanicchi, G., Capelli, R., Vaissiere, R., & Orunesu, M. (1985). Role of metallothioneins in Cu and Cd accumulation and

elimination in the gill and digestive gland cells of *mytilus galloprovincialis* lam. *Marine Environmental Research*, 16(1), 23-36. [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(85\)90018-2](https://doi.org/10.1016/0141-1136(85)90018-2)

233.Vivekanand, A. C., Mohapatra, S., & Tyagi, V. K. (2021). Microplastics in aquatic environment: Challenges and perspectives. *Chemosphere*, 282, 131151. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131151>

234.Vogeler, S., Carboni, S., Li, X., & Joyce, A. (2021). Phylogenetic analysis of the caspase family in bivalves: implications for programmed cell death, immune response and development. *BMC genomics*, 22(1), 80. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07380-0>

235.von Moos, N., Burkhardt-Holm, P., & Köhler, A. (2012). Uptake and effects of microplastics on cells and tissue of the blue mussel *Mytilus edulis* L. after an experimental exposure. *Environmental science & technology*, 46(20), 11327–11335. <https://doi.org/10.1021/es302332w>

236.Vystavna, Y., Frkova, Z., Celle-Jeanton, H., Diadin, D., Huneau, F., Steinmann, M., Crini, N., & Loup, C. (2018). Priority substances and emerging pollutants in urban rivers in Ukraine: Occurrence, fluxes and loading to transboundary European Union watersheds. *The Science of the total environment*, 637-638, 1358–1362. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.095>

237.Wang, F., Wang, B., Qu, H., Zhao, W., Duan, L., Zhang, Y., Zhou, Y., & Yu, G. (2020). The influence of nanoplastics on the toxic effects, bioaccumulation, biodegradation and enantioselectivity of ibuprofen in freshwater algae *Chlorella pyrenoidosa*. *Environmental pollution* (Barking, Essex : 1987), 263(Pt B), 114593. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114593>

238.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>

239.Wang, R., Mou, H., Lin, X., Zhu, H., Li, B., Wang, J., & Wang, J. (2021). Microplastics in mollusks: research progress, current contamination status, analysis

approaches, and future perspectives. *Frontiers in Marine Science*, 8, 759919. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.759919>

240. Wang, Y., Rume, T., Islam, S. M. D., Fan, W., Wu, J., & Li, X. (2022). Water Quality Criteria and Ecological Risk Assessment of Typical Transition Metals in South Asia. *International journal of environmental research and public health*, 19(23), 16125. <https://doi.org/10.3390/ijerph192316125>

241. Ward, J. E., Rosa, M., & Shumway, S. E. (2019). Capture, ingestion, and egestion of microplastics by suspension-feeding bivalves: a 40-year history. *Anthropocene Coasts*, 2(1), 39-49. <https://doi.org/10.1139/anc-2018-0027>

242. Watanabe, N., Harter, T. H., & Bergamaschi, B. A. (2008). Environmental occurrence and shallow ground water detection of the antibiotic monensin from dairy farms. *Journal of environmental quality*, 37(5 Suppl), S78–S85. <https://doi.org/10.2134/jeq2007.0371>

243. Water Quality Standards Handbook URL http://water.epa.gov/scitech/swguidance/standards/criteria/current/upload/2009_01_13_criteria application date: 03.02.2023

244. Wegner, A., Besseling, E., Foekema, E. M., Kamermans, P., & Koelmans, A. A. (2012). Effects of nanopolystyrene on the feeding behavior of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.). *Environmental toxicology and chemistry*, 31(11), 2490–2497. <https://doi.org/10.1002/etc.1984>

245. 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)

246. Wong, B. B., & Candolin, U. (2015). Behavioral responses to changing environments. *Behavioral Ecology*, 26(3), 665-673. <https://doi.org/10.1093/beheco/aru183>

247. Wright, S. L., Thompson, R. C., & Galloway, T. S. (2013). The physical impacts of microplastics on marine organisms: a review. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 178, 483–492. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.02.031>

248.Xiao, W., & Loscalzo, J. (2020). Metabolic Responses to Reductive Stress. *Antioxidants & redox signaling*, 32(18), 1330–1347. <https://doi.org/10.1089/ars.2019.7803>

249.Xu, X., Jian, Y., Xue, Y., Hou, Q., & Wang, L. (2019). Microplastics in the wastewater treatment plants (WWTPs): Occurrence and removal. *Chemosphere*, 235, 1089–1096. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.197>

250.Yadati, T., Houben, T., Bitorina, A., & Shiri-Sverdlov, R. (2020). *The Ins and Outs of Cathepsins: Physiological Function and Role in Disease Management*. *Cells*, 9(7), 1679. <https://doi.org/10.3390/cells9071679>

251.Yang, J., Liu, D., He, Y., & Wang, L. (2015). Mitochondrial energy metabolism in the hepatopancreas of freshwater crabs (*Sinopotamon henanense*) after cadmium exposure. *Environmental science. Processes & impacts*, 17(1), 156–165. <https://doi.org/10.1039/c4em00453a>

252.Yu, F., Yang, C., Huang, G., Zhou, T., Zhao, Y., & Ma, J. (2020). Interfacial interaction between diverse microplastics and tetracycline by adsorption in an aqueous solution. *The Science of the total environment*, 721, 137729. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137729>

253.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>

254.Zangger, K., Shen, G., Oz, G., Otvos, J. D., & Armitage, I. M. (2001). Oxidative dimerization in metallothionein is a result of intermolecular disulphide bonds between cysteines in the alpha-domain. *The Biochemical journal*, 359(Pt 2), 353–360. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3590353>

255.Zhang, H., Limphong, P., Pieper, J., Liu, Q., Rodesch, C. K., Christians, E., & Benjamin, I. J. (2012). Glutathione-dependent reductive stress triggers mitochondrial oxidation and cytotoxicity. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 26(4), 1442–1451. <https://doi.org/10.1096/fj.11-199869>

256.Zhang, H., Wang, J., Zhou, B., Zhou, Y., Dai, Z., Zhou, Q., Christie, P., & Luo, Y. (2018). Enhanced adsorption of oxytetracycline to weathered microplastic polystyrene: Kinetics, isotherms and influencing factors. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 243(Pt B), 1550–1557. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.09.122>

257.Zhivotovsky, B., & Orrenius, S. (2011). Calcium and cell death mechanisms: a perspective from the cell death community. *Cell calcium*, 50(3), 211–221. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2011.03.003>

258.Zhou, S., Di Paolo, C., Wu, X., Shao, Y., Seiler, T. B., & Hollert, H. (2019). Optimization of screening-level risk assessment and priority selection of emerging pollutants - The case of pharmaceuticals in European surface waters. *Environment international*, 128, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.04.034>

259.Zhou, W., Han, Y., Tang, Y., Shi, W., Du, X., Sun, S., & Liu, G. (2020). Microplastics Aggravate the Bioaccumulation of Two Waterborne Veterinary Antibiotics in an Edible Bivalve Species: Potential Mechanisms and Implications for Human Health. *Environmental science & technology*, 54(13), 8115–8122. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c01575>

260.Zhou, Y., Li, L., & Ru, B. (2000). Expression, purification and characterization of beta domain and beta domain dimer of metallothionein. *Biochimica et biophysica acta*, 1524(2-3), 87–93. [https://doi.org/10.1016/s0304-4165\(00\)00072-6](https://doi.org/10.1016/s0304-4165(00)00072-6)

261.Zhu, C. T., & Rand, D. M. (2012). A hydrazine coupled cycling assay validates the decrease in redox ratio under starvation in *Drosophila*. *PloS one*, 7(10), e47584. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047584>

262.Ziajahromi, S., Kumar, A., Neale, P. A., & Leusch, F. D. L. (2017). Impact of Microplastic Beads and Fibers on Waterflea (*Ceriodaphnia dubia*) Survival, Growth, and Reproduction: Implications of Single and Mixture Exposures. *Environmental science & technology*, 51(22), 13397–13406. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03574>

263.Zuykov, M., Pelletier, E., & Harper, D. A. (2013). Bivalve mollusks in metal pollution studies: from bioaccumulation to biomonitoring. *Chemosphere*, 93(2), 201–208. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.001>