

Г.И. Фальфушинская^{1,2}, Л.Л. Гнатишина^{1,2}, О.А. Федорук¹, О.Б. Столяр¹

¹Тернопольский национальный педагогический университет имени Владимира Гнатюка, Украина

²ГБУЗ «Тернопольский государственный медицинский университет имени И.Я. Горбачевского», Украина

ВИТЕЛЛОГЕНЕЗ И БИОТРАНСФОРМАЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ ЛЯГУШКИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ КОБАЛЬТА, ЦИНКА И ИХ ОРГАНИЧЕСКИХ КОМПЛЕКСОВ

Лягушки восприимчивы к абсорбции токсикантов из воды на протяжении всех жизненных стадий. Целью этого исследования стало оценить влияние промышленных нанокomпозитов (NC) – Co-NC и Zn-NC, соответствующих концентраций Co^{2+} (50 мкг/дм³), Zn^{2+} (100 мкг/дм³), или полимерного материала (PS) на самцов лягушки *Rana ridibunda* на протяжении 14 суток. Определяли уровень вителлогенина и ядерные повреждения (NL) в крови, активность цитохром P450-зависимой монооксигеназы (CYP450) и глутатион S-трансферазы (GST), а также распределение Zn, Co, Cu, Cd в печени. Zn, Zn-NC и PS вызывали токсические проявления: ксеноэстрогенный эффект (Zn и PS), угнетение GST (Zn-NC), увеличение числа NL (Zn-NC и PS). Активность CYP450 возросла только при действии Co-NC, тогда как другие воздействия угнетали ее. Действие Co и Co-NC приводило к увеличению соотношения количества количества (Cu+Co)/(Zn+Cd) в металлотионеинах, тогда как Zn, Zn-NC и PS вызывали его увеличение в других компонентах ткани. Эта исключительная чувствительность отличала реакции лягушки от рыбы *Carassius sp.*, изученной предварительно.

Ключові слова: кобальт, цинк, нанорозмерний композит, *Rana ridibunda*, вителлогенін, металлотіонеїн, цитотоксичність

UDC [504.064:577.25](564.3+564.141)

H.I. FALFUSHYNSKA^{1,2}, L.L. GNATYSHYNA^{1,2}, I.V. YURCHAK¹, O.B. STOLIAR¹

¹ Volodymyr Hnatiuk Ternopil National Pedagogical University, Ukraine

Kryvonosa Str., 2, Ternopil 46027, Ukraine

² I. Ya. Horbachevsky Ternopil State Medical University

Maydan Voli, 1, Ternopil 46001, Ukraine

ENDOCRINE DISRUPTION AND CYTOTOXICITY IN BIVALVE MOLLUSK UNDER THE COMPLEX EXPOSURE TO ZINC NANOOXIDE

Despite metal-contained nanoparticles (n) represent novel kind of environmental pollution, their toxicity to aquatic habitats is unclear with regards to multiple stress exposures. In present study, male *Unio tumidus* were exposed for 14 days to n-ZnO (3.1 μ M), Zn^{2+} (3.1 μ M), Ca-channel blocker nifedipine (Nfd, 10 μ M), combinations of n-ZnO and Nfd or n-ZnO and thiocarbamate fungicide Tattoo (Ta, 91 μ g L⁻¹) at 18°C, and n-ZnO at 25°C. Activities of vitellogenesis (Vtg), stress and detoxification systems (Mn- and Cu,Zn-superoxide dismutase, metallothionein (MT), EROD), nuclear lesions (NL) and choline esterase (ChE) activity) were analysed. Vtg and NL were elevated in most exposures. N-ZnO *per se* did not provoke any other changes of indices unlike Zn. In combine exposures, the activation of stress-responses, EROD and phenoloxidase activities were detected. Nfd caused the most prominent modulations of n-ZnO effect on Vtg and MT. Only Zn and Nfd caused ChE depletion.

Keywords: bivalve mollusk, zinc nanooxide, heating, nifedipine, thiocarbamate, combine exposure, biomarker

Nanoparticle toxicity is a growing concern in freshwater habitats; however, understanding of the nanoparticle effects on aquatic organisms is impeded by the lack of the studies of the nanoparticles effects in the environmentally relevant context of multiple stress exposures. Metal-contained nanoparticles can be transformed in aquatic organisms by reactions with biological macromolecules,

redox reactions, aggregation, and dissolution. Therefore, in order to use bivalves as bioindicators of nanoparticle toxicity, it is important to distinguish between the physiological and cellular responses to nanoparticles compared to the effects of their constituent metals, as well as assess the nanoparticle toxicity in the context of other common stressors in aquatic habitats [1, 6]. In the polluted environments, the cumulative effects of the various stressors that act on similar pathways (such as oxidative stress, apoptosis) or on the same molecular targets can complicate the interpretation and assessment of responses to nanoparticles [1, 2, 3, 7]. Therefore, it is important to study the effects on nanoparticles such as n-ZnO in the context of other common environmental stressors. Elevated temperature is a common stressor in temperate aquatic habitats that has profound effects on all physiological functions of aquatic organisms [4, 5]. In this study, we evaluated the effects of n-ZnO in a model organism, a mussel *Unio tumidus*, and the potential modulation of these effects by common co-occurring environmental stressors

Materials and methods

Adult *Unio tumidus* (Unionidae) (~ 6 years old, 8±1 cm length, and 42±5 g weight) were collected in a pristine site located in the basin of Dniester River, (Ukraine). Specimens were preacclimated to the laboratory conditions. One group was exposed to the aquarium water only and was considered control (C). Other groups were exposed to zinc nanooxide (n-ZnO, 3.1 µM), zinc ions (Zn, 3.1 µM), pharmaceutical Ca-channel blocker nifedipine (Nfd, 10 µM), combinations of n-ZnO with Nfd (n-ZnO+Nfd) or with thiocarbamate fungicide Tattoo (n-ZnO+Ta, 91 µg L⁻¹) at 18°C, and to n-ZnO at 25°C (n-ZnO+t°). The utilized methods for the determining of the biomarkers of stress, endocrine disruption (vitellogenesis in male specimens) and cytotoxicity are described in our previous articles [1-7].

Results and discussion

Data are represented in Tables 1, 2. Most common responses to the exposures were the elevation of vitellogenin-like proteins (Vtg-LP) in the gonads of male mussels that reflect xenoestrogenic effect in males.

Table 1

Endocrine disruption and stress responses in *U. tumidus*, M±SD, N=8

Parameters	Groups						
	K	ZnO	Zn	ZnO+t°	Nif	Nif+ ZnO	ZnO+ Ta
Mn-SOD, (RU·mg ⁻¹ proteins)	2,7± 0,3	2,6± 0,3	4,5± 1,1*	3,8± 0,3*	2,9± 0,5	2,6± 0,4	4,5± 0,6*
Cu,Zn-SOD, (RU·mg ⁻¹ proteins)	1,0± 0,2	2,4± 0,3*	1,8± 0,3*	0,6± 0,1*	2,6± 0,9*	4,0± 0,5*	3,0± 0,5*
MT (from Cu,Zn,Cd), µg·g ⁻¹ FW	16,2± 1,7	14,9± 1,7	13,0± 1,4*	12,9± 1,3*	36,3± 2,8*	30,4± 2,7*	13,1± 1,3*
Vtg-LP in gonads, µg P ₁ ·mg ⁻¹ proteins	10,0± 1,1	17,3± 3,2*	42,8± 5,1*	25,3± 6,2*	12,8± 3,5	10,9± 2,7	27,3± 4,6*
Vtg-LP in hemolymph, µg P ₁ ·mg ⁻¹ proteins	2,9± 0,1	6,5± 1,3*	3,1± 0,4	4,0± 1,3	2,9± 0,5	1,7± 0,2*	3,0± 0,5

In tables 1, 2: * – indicate values significantly different from control (P<0.05). The abbreviations are presented in the text.

In the hemolymph the alteration were different and less appeared. Nuclear lesions (the elevated number of hemocytes with micronuclei and nuclear abnormalities) were detected in most exposures. N-ZnO *per se* did not provoke any other changes of indices. On the other hand, exposure to Zn and Nfd demonstrated the signs of neurotoxicity (choline esterase (ChE) depletion). In combine exposures, the activation of stress-responses, microsomal biotransformation (EROD and phenol

oxidase activities) was detected. Nfd caused the most prominent modulations of n-ZnO effect on Vtg-LP and metallothionein (MT). These data prove the low evidence of the release of Zn from n-ZnO in the mussels due to different mechanisms of n-ZnO and Zn effects and confirm our previous conclusions [6].

Table 2

Markers of toxicity in *U. tumidus*, M \pm SD, N=8.

Parameters	Groups						
	K	ZnO	Zn	ZnO+t°	Nif	Nif+ZnO	ZnO+Ta
EROD, pmol min ⁻¹ ·mg ⁻¹ proteins	2,9 \pm 0,1	2,8 \pm 0,1	1,8 \pm 0,2*	3,1 \pm 0,2*	3,6 \pm 0,4*	3,1 \pm 0,3*	5,2 \pm 0,3*
Phenoloxidase, nmol/(min·mg protein)	24,2 \pm 2,5	22,9 \pm 3,9	24,6 \pm 3,1	28,7 \pm 3,2*	44,1 \pm 8,2*	24,5 \pm 2,3	29,2 \pm 4,2*
Phenol oxidase + CTAB, nmol/(min·mg protein)	6,0 \pm 0,9	6,5 \pm 1,2	12,7 \pm 2,3*	13,8 \pm 2,4*	1,5 \pm 0,3*	1,1 \pm 0,2*	14,4 \pm 2,4*
ChE, nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ proteins	2,8 \pm 0,3	3,2 \pm 0,3*	2,0 \pm 0,4*	2,9 \pm 0,2	1,9 \pm 0,4*	2,4 \pm 0,4	2,3 \pm 0,3
Hemocytes with micronuclei. (per 1000)	1,5 \pm 0,3	4,5 \pm 0,4*	1,5 \pm 0,3	1,5 \pm 0,3	3,5 \pm 0,4*	4,2 \pm 0,6*	1,5 \pm 0,3
Hemocytes with nuclear abnormalities (per 1000)	7,0 \pm 0,8	10,5 \pm 1,3*	11,0 \pm 1,4*	7,0 \pm 0,9	7,2 \pm 0,9	9,1 \pm 1,1	11,0 \pm 1,4*

Besides, high sensitivity of vitellogenesis in male mussels that was also detected for other novel pollutants [7] needs special concern. The key biomarkers that showed differential responses to different single and combined stressors in this study were the concentration of MT (metal-bound (Cu, Zn, Cd)-form, phenol oxidase and Mn-superoxide dismutase (SOD) activities. At 25°C, exposures to n-ZnO led to a prominent down-regulation of MT and Cu,Zn-SOD.

Conclusion

These data indicate that n-ZnO toxicity to freshwater organisms is modulated by organic pollutants and enhanced by elevated temperatures.

1. **Diversity** of the molecular responses to separate wastewater effluents in freshwater mussels / H. I. Falfushynska, L. L. Gnatyshyna, O. Yu. Osadchuk [et al.] // Comp. Biochem. Physiol. – 2014. – Vol. 164 C. – P. 51–58.
2. **Falfushynska H.** Effect of *in situ* exposure history on the molecular responses of bivalve mollusks to trace metals./ H. Falfushynska, L. Gnatyshyna, O. Stoliar // Ecotoxicol. Environ. Saf. – 2013. – Vol. 89. – P. 73–83.
3. **Falfushynska H.** In situ exposure history modulates the molecular responses to carbamate fungicide Tattoo in bivalve mollusk / H. Falfushynska, L. Gnatyshyna, O. Stoliar // Ecotoxicology. – 2013. – Vol. 22. – P. 433–445.
4. **Habitat** pollution and thermal regime modify molecular stress responses to elevated temperature in freshwater mussels (*Anodonta anatina*: Unionidae) / H. Falfushynska, L. Gnatyshyna, I. Yurchak [et al.] // Sci. Total. Environ. – 2014. – Vol. 500–501. – P. 339–350.
5. **Sokolova I. M.** Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: Implications of global climate change / I. M. Sokolova, G. Lannig // Clim. Res. – 2008. – Vol. 37. – P. 181–201.
6. **The effects** of zinc nanooxide on cellular stress responses of the freshwater mussels *Unio tumidus* are modulated by elevated temperature and organic pollutants / H. Falfushynska, L. Gnatyshyna, I. Yurchak [et al.] // Aquat. toxicol. – 2015. - Vol. 162 – P. 82–93.

7. **Vulnerability** of biomarkers in the indigenous mollusk *Anodonta cygnea* to spontaneous pollution in a transition country / Н. І. Falfushynska, L. L. Gnatyshyna, A. Farkas [et al.] // *Chemosphere*. – 2010. – Vol. 81. – P. 1342–1351.

Г.І. Фальфушинська^{1,2}, Л.Л. Гнатишина^{1,2}, І.В. Юрчак¹, О.Б. Столяр¹

¹Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка, Україна

²ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського», Україна

ЕНДОКРИННІ РОЗЛАДИ ТА ЦИТОТОКСИЧНІСТЬ У ДВОСТУЛКОВОГО МОЛЮСКА ЗА КОМБІНОВАНОГО ВПЛИВУ НАНООКСИДУ ЦИНКУ

Було досліджено вплив на самців *Unio tumidus* наночастинок n-ZnO (3,1 мкМ), Zn²⁺ (3,1 мкМ), а також блокатора Са-каналів ніфедипіну (Nfd, 10 мкМ) спільно із n-ZnO та тіокарбаматного фунгіциду Татту (Та, 91 мкг·л⁻¹) спільно із n-ZnO при 18°C та n-ZnO при 25°C. Визначали характеристики вітелогенезу (Vtg), систем стресу та детоксикації (Mn- та Cu,Zn-супероксиддисмутаза, металотіонеїну (MT), EROD), частку гемоцитів із ураженнями ядра (NL) та холінестеразну активність (ChE). За впливу більшості чинників спостерігали зростання рівню Vtg та NL. N-ZnO не викликав інших змін, на відміну від Zn. За поєднаного впливу відзначали активацію стрес-реакцій, EROD та фенолоксидази. Найпомітніше вплив n-ZnO на Vtg та MT залежав від поєднання із Nfd. Пригнічення ChE викликали лише Zn та Nfd.

Ключові слова: двостулковий моллюск, наноксид цинку, тепловий ефект, ніфедипін, тіокарбамат, комбінована дія, біомаркер

Г.И. Фальфушинская^{1,2}, Л.Л. Гнатишина^{1,2}, И.В. Юрчак¹, О.Б. Столяр¹

¹Тернопольский национальный педагогический университет имени Владимира Гнатюка, Украина

²ГВУЗ «Тернопольский государственный медицинский университет имени И.Я. Горбачевского», Украина

ЭНДОКРИННЫЕ НАРУШЕНИЯ И ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ У ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ ПРИ КОМПЛЕКСНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ НАНООКСИДА ЦИНКА

Исследовали влияние на самцов *Unio tumidus* наночастичек n-ZnO (3,1 мкМ), Zn²⁺ (3,1 мкМ), а также блокатора Са-каналов нифедипина (Nfd, 10 мкМ) совместно с n-ZnO и тиокарбаматного фунгицида Татту (Та, 91 мкг л⁻¹) при 18°C, а также n-ZnO при 25°C. Определяли характеристики вителлогенеза (Vtg), систем стресса и детоксикации (Mn- та Cu,Zn-супероксиддисмутаза, металлотіонеїна (MT), EROD), долю гемоцитов с ядерными повреждениями (NL) и активность холинэстеразы (ChE). При действии большинства факторов наблюдали увеличение уровня Vtg и NL. N-ZnO не вызывал, в отличие от Zn, других изменений. При совместном воздействии отмечали активацию стресс-реакций, EROD и фенолоксидазы. Наиболее заметно на действие n-ZnO на Vtg та MT влияла комбинация с Nfd. Угнетение ChE вызывали только Zn и Nfd.

Ключевые слова: двустворчатый моллюск, наноксид цинка, тепловой эффект, нифедипин, тиокарбамат, комбинированное воздействие, биомаркер