

БІОХІМІЯ

УДК 577.352.38:577.64

**ОСОБЛИВОСТІ РЕАКЦІЇ СТРЕСОЧУТЛИВИХ СИСТЕМ  
ДВОСТУЛКОВОГО МОЛЮСКА *UNIO TUMIDUS* НА ДІЮ НАНО-ЦИНК  
ОКСИДУ У ПОЄДНАННІ ЗІ СУПУТНИМИ ПОШКОДЖУЮЧИМИ ЧИННИКАМИ**

**Г. Фальфушинська<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>*Тернопільський державний медичний університет  
Майдан Волі, 1, Тернопіль 46001, Україна*

<sup>2</sup>*Тернопільський національний педагогічний університет  
імені Володимира Гнатюка*

*НДЛ порівняльної біохімії та молекулярної біології  
вул. М. Кривоноса, 2, Тернопіль 46027, Україна  
e-mail: halynka.f@gmail.com*

Порівнювали стан молекулярних стресочутливих і детоксикаційних систем двостулкового моллюска перлівниці *Unio tumidus* із умовно чистої місцевості за дії на організм наноформи цинк оксиду (нано-ZnO, 3,12 мкмоль/л) поокремо та за поєднаного впливу зі супутніми пошкоджуючими чинниками (підвищена температура 25 °С і тіокарбаматний пестицид Татту (91 мкг/л)) після 14-денної інкубації в експериментальних умовах. За дії всіх досліджуваних чинників у моллюсків пригнічуються процеси мікросомального окиснення (за результатами визначення ЕРОД-активності), з'являються ознаки нейротоксичності як пригнічення холінестеразної активності, цитотоксичності як збільшення фрагментації ланцюгів ДНК та пригнічення імунної відповіді за зменшенням фенолоксидазної активності, та збільшується вміст металодепонувальних стресорних протеїнів металотіонеїнів, за окремими винятками. Поєднана дія нано-цинк оксиду з тепловим стресом і пестицидом Татту викликає збільшення рівня карбонільних похідних протеїнів і загального глутатіону (нано-ZnO+ Татту-група) та збільшує варіабельність показників у групі нано-ZnO+ Татту порівняно з індивідуальною дією наночастинок у 5 разів. Згідно з результатами побудови класифікаційного дерева, до критеріїв диференціювання груп належать вміст карбонільних похідних протеїнів, металотіонеїнів і оксирадикалів. Відтак, вплив супутніх чинників модулює фізіолого-біохімічні реакції моллюсків на дію наноформи цинк оксиду.

*Ключові слова:* моллюск *Unio tumidus*, наноцинк оксид, карбонільні похідні протеїнів, металотіонеїни, поєднана дія чинників.

Сучасні технології у різних галузях виробництва, медицині, фармації дедалі більше орієнтуються на використання наноматеріалів. З одного боку, визнають великі перспективи цих новітніх продуктів у промисловості, з іншого – прогнозують небезпеку їхніх віддалених ефектів у вигляді механічних і фізичних змін (вплив на поляризацію та структурну організацію) надмолекулярних структур, зокрема біомембран і хроматину [15].

До найбільш поширених промислових наноматеріалів, із якими найімовірніше контактують живі організми, належить наноформа цинк оксиду (нано-ZnO), який широко використовується у складі антибактеріальних засобів, виробництві плівки для тривалого зберігання продуктів харчування, зубної пасти, косметичних продуктів, сонцезахисних кремів тощо [15]. Цинк – есенціальний метал, який входить до складу близько 10 % усіх

протеїнів організму та виступає в ролі кофактора для більш ніж 300 ензимів, регулює виділення й функціонування низки гормонів, проявляє антиоксидантну функцію, стабілізує структуру протеїнів та індукує упакування протеїнових субдоменів, залучається до підтримання стабільності геному, виконує функцію вторинного месенджера і регулює клітинний цикл, проліферацію, диференціацію клітини й апоптоз [18, 19]. Доведено, що дисрегуляція цинку в організмі детермінує порушення редокс-балансу у клітині, сприяє виникненню ендокринних порушень, неопластичному росту клітин тощо [20, 24]. У попередніх дослідженнях, в тому числі й наших, було показано, що у молюсків нано-ZnO викликає збільшення проникності мембран лізосом, пригнічення антиоксидантного захисту, появу ознак окисного ушкодження за збільшенням рівня окисної деструкції ліпідів [2, 10, 13]. Проте за аналогічних умов недостатньо вивченою залишається реакція імунної, нейрогуморальної систем і мітосомального окиснення.

Відтак, метою нашого дослідження було з'ясувати реакцію молекулярних стресорних і детоксикаційних систем двостулкового молюска *Unio tumidus* на стрес, зумовлений дією наноформи ZnO на організм. Двостулковий молюск був обраний для дослідження як пасивний фільтратор, що має здатність акумулювати речовини з водного оточення, та як альтернативна модель для прогнозування ефекту новітніх забруднювачів для людини [1, 8, 12, 13, 26]. Позаяк природні водойми є системами, що зазнають кумулятивного ефекту пошкоджуючих чинників у фонових концентраціях, продуктів їхнього перетворення та глобальних кліматичних змін, досліджували також поєднаний вплив нано-ZnO та підвищеної температури (25 °C) і тіокарбаматного пестициду Татту, який широко використовується в досліджуваному регіоні та має прооксидантні властивості, згідно з отриманими нами попередніми результатами [8]. Клітинну відповідь на стрес оцінювали за показниками, які рекомендовані стандартизованими протоколами та які проявили себе як найбільш чутливі в реакціях на стрес, зумовлений дією металів, органічних субстанцій і теплового стресу [1, 8–10, 12, 27, 28]. Зокрема, визначали вміст металодепонувального протеїну металотіонеїну (MT) та загального глутатіону, які потенційно мають здатність до знешкодження активних форм кисню, холінергезну активність (як показник дії сполук тіокарбаматної та фосфорорганічної природи), етоксирезорурфін-О-деетилазу (ЕРОД) і активність (як показник інтенсивності мітосомального окиснення), фенолоксидазну активність (як показник імунного статусу безхребетних) і окремі показники окисного стресу й цитотоксичності [8–10, 12, 25, 27, 28].

#### Матеріали та методи

Дослідження проводили на дорослих особинах чоловічої статі двостулкового молюска перлівниці *Unio tumidus* із довжиною мушлі 8,0 см і масою 5060 г. Молюсків відбирали у вересні у верхів'ї ріки Серет (с. Івачів Тернопільської обл., умовно чиста місцевість). Молюсків аклімували до лабораторних умов протягом 7 діб. Експериментальні умови створювали у басейнах об'ємом 40 л з кількістю молюсків із розрахунку 1 особина на 4 л води згідно із загальноприйнятою схемою токсикологічного експерименту. Вміст кисню у воді підтримували на рівні 7,0–8,0 мг/л, вуглекислого газу – 2,2–2,8 мг/л, рН – 7,68. Воду відстоювали і змінювали через кожні дві доби, поновлюючи в експериментальних групах вміст досліджуваної сполуки у воді. Температура води становила близько 18 °C. Тварин годували подрібненим комерційним кормом Акваріус, «FITO MENU».

Було сформовано п'ять груп молюсків: особини з чистої місцевості – контрольна (К-група) та чотири групи, яким безпосередньо у воду додавали сполуки цинку: нано-ZnO (3,12 мкмоль/л), іони Zn<sup>2+</sup> (Zn, 200 мкг/л, у вигляді ZnSO<sub>4</sub>), а також вивчали спільну дію підвищеної температури (ZnO, 3,12 мкмоль/л + 25 °C, ZnO+t°) і тіокарбаматного пестициду

Татту ( $ZnO$ , 3,12 мкмоль/л + Татту, 91 мкг/л,  $ZnO+Ta$ ). Концентрації чинників були нижчими за межі їхньої розчинності у воді та відповідали діапазону їхніх концентрацій у поверхневих водах або місцях скиду побутових стоків із густонаселених міст [10, 13]. Тривалість експерименту становила 14 діб.

Тварин умертвляли, визначали стать методом мікроскопічного аналізу гонад і відбирали у особин чоловічої статі тканину травної залози, оскільки відомо, що органічні сполуки потрапляють в організм молюсків із продуктами живлення та переважно накопичуються в кишечнику і травній залозі. Усі процедури з відбору й обробки тканини проводили на холоді. Усі реактиви, крім нижчезазначених, були від фірми «Рeахім» (Україна) і мали кваліфікацію «хч».

Для характеристики стану металодепонувальних протеїнів металотіонеїнів (МТ), системи антиоксидантного захисту, мікосомального окиснення та нейротоксичності були використані оптичні методи, детально описані у [1, 8–10]. Загальний вміст глутатіону (GSH) у депротейнізованому фільтраті тканини визначали ензимним методом за допомогою реактиву Елмана (5,5'-дитіо-біс-2-нітробензойна кислота, ДТНБ) (*Fluka*) [3]. Загальну концентрацію МТ як тіолових сполук (МТ-SH) у тканині визначали у 30 % гомогенаті в 20 мМ трис-сахарозному буфері за методом А. Viarengo та ін. (1997) за допомогою 5,5'-дитіо-біс-2-нітробензойної кислоти (ДТНБ) після екстракції в системі етанол/хлороформ. Вміст МТ-SH обчислювали, виходячи зі співвідношення: 1 моль МТ еквівалентний 20 моль GSH і виражали в мкг на г вологої маси тканини [28].

Вміст карбонільних похідних протеїнів (КПП) вимірювали за їхньою здатністю утворювати 2,4-динітрофенілгідрозони [23]. Утворення оксирадикалів у супернатанті гомогенату тканини в НЕРЕС-сахарозному буфері рН 7,4 оцінювали за утворенням флуоресцентного продукту родаміну 123 в реакції нефлуоресцентного деривату дигідрородаміну (*Sigma*) з активними формами кисню при хвилі збудження (ex.) = 485 нм та випромінювання (em.) = 538 нм [27] і виражали в умовних одиницях флуоресценції (УОФ)/г тканини. Активність холінестерази (ХЕ) [КФ 3.1.1.7] визначали за швидкістю гідролізу ацетилтіохолін йодиду (*Sigma*), яку реєстрували за допомогою ДТНБ [7]. Активність системи мікосомального окиснення характеризували за активністю мікосомальної етоксирезоруфін-О-деетилази (ЕРОД), яку визначали за утворенням резоруфину при 572 нм [16] в осаді мікосом, одержаному преципітацією з іонами кальцію в 80 мМ  $CaCl_2$  в 10 мМ Tris-HCl буфері, рН 7,4. Пошкодження ДНК (ознака генотоксичності) визначали як розриви ланцюгів депротейнізованої ДНК методом лужного осадження в 10 % гомогенаті тканини в 50 мМ трис-ЕДТА буферному розчині рН 8,0, що містить 0,5 % натрію додецил сульфат (*Sigma*) при хвилі збудження (ex.) = 360 нм та випромінювання (em.) = 450 нм [21]. Фенолоксидазну активність [КФ 1.14.18.1] визначали спектрофотометрично за утворенням о-хінону. Як субстрат використовували п-фенілендіамін у концентрації 50 мМ. Фенолоксидазну активність реєстрували при довжині хвилі 420 нм, обчислювали з використанням молярного коефіцієнта продукту  $43\ 160\ M^{-1}cm^{-1}$  [17] та виражали в мкмоль утвореного продукту за хвилину.

Результати вимірів подано у вигляді  $M \pm SD$  для восьми тварин дослідної групи. Імовірність відхилення двох рядів значень обчислювали з використанням *t*-тесту Стьюдента. Для порівняння впливу чинників на біохімічні показники молюска використовували метод побудови класифікаційного дерева та кореляційний аналіз. Визначали індекс варіабельності показників з використанням відсотка відхилення показника у групі від відповідного контролю. Порівняльний аналіз біологічних параметрів здійснювали, використовуючи комп'ютерні програми Statistica v 10.0 та Excel для Windows 2010.

### Результати і їхнє обговорення

Окисний стрес, який виникає внаслідок порушення балансу між утворенням і знешкодженням активних форм кисню, вважається неспецифічною ознакою впливу несприятливих чинників різного походження на тварин [2, 23]. Результати проведених досліджень свідчать, що за дії модельних чинників у травній залозі моллюсків проявляються ознаки окисного стресу: збільшення рівня КПП (за комбінованої дії нано-ZnO, теплового стресу і Тагту), глутатіону (у н-ZnO+Та-групі) та зменшення рівня оксирадикалів (у моллюсків за дії цинку та комбінованої дії нано-ZnO, теплового стресу і Тагту), порівняно з відповідним контролем (рис. 1).

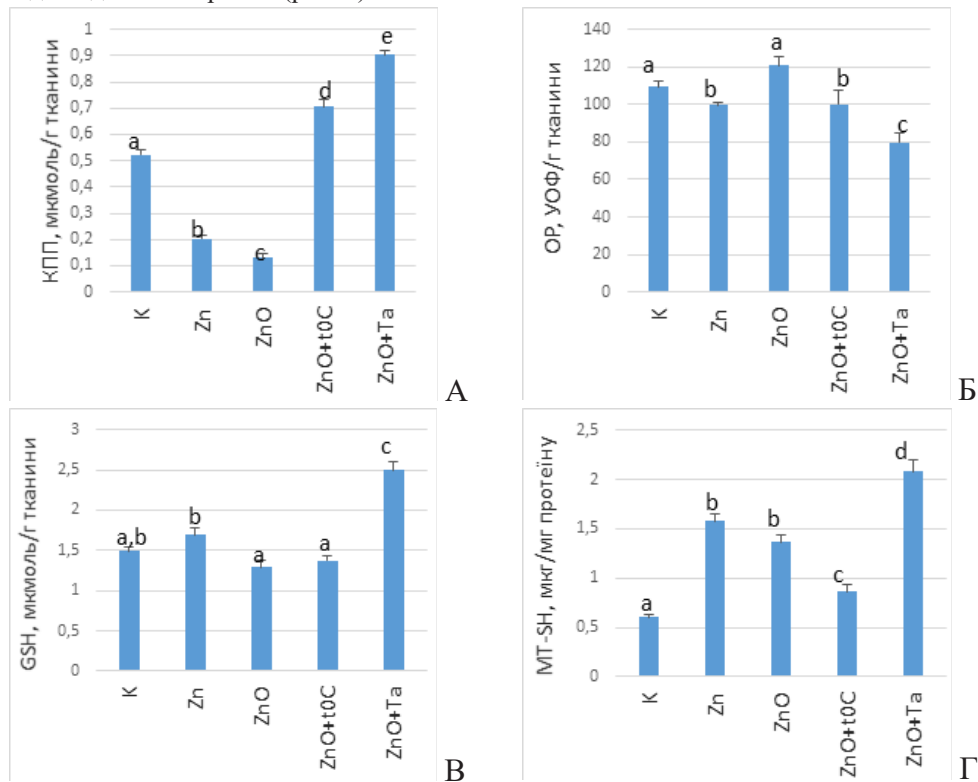


Рис. 1. Показники окисного стресу та клітинних тіолів у травній залозі моллюска *Unio tumidus* у контролі та за модельного впливу сполук цинку на організм,  $M \pm SD$ ,  $n=8$ . А – вміст карбонільних похідних протеїнів, Б – концентрація оксирадикалів, В – загальний вміст глутатіону, Г – вміст металотіонеїнів. Тут і на рис. 2 різні літери над стовпчиками позначають дані, що вірогідно відрізняються між собою,  $p < 0,05$

Концентрація МТ за впливу сполук цинку, як поокремо, так і в поєднанні з іншими супутніми чинниками, у травній залозі моллюсків зростає порівняно з контролем у 2-3 рази (рис. 1).

За умов експозиції у тварин пригнічуються процеси мітосомального окиснення (за результатами визначення ЕРОД-активності), за винятком н-ZnO+Та-групи, з'являються ознаки нейротоксичності (пригнічення ХЕ-активності), цитотоксичності (збільшення розривів ланцюгів ДНК) та пригнічення імунної системи за зменшенням фенолоксидазної активності (рис. 2).

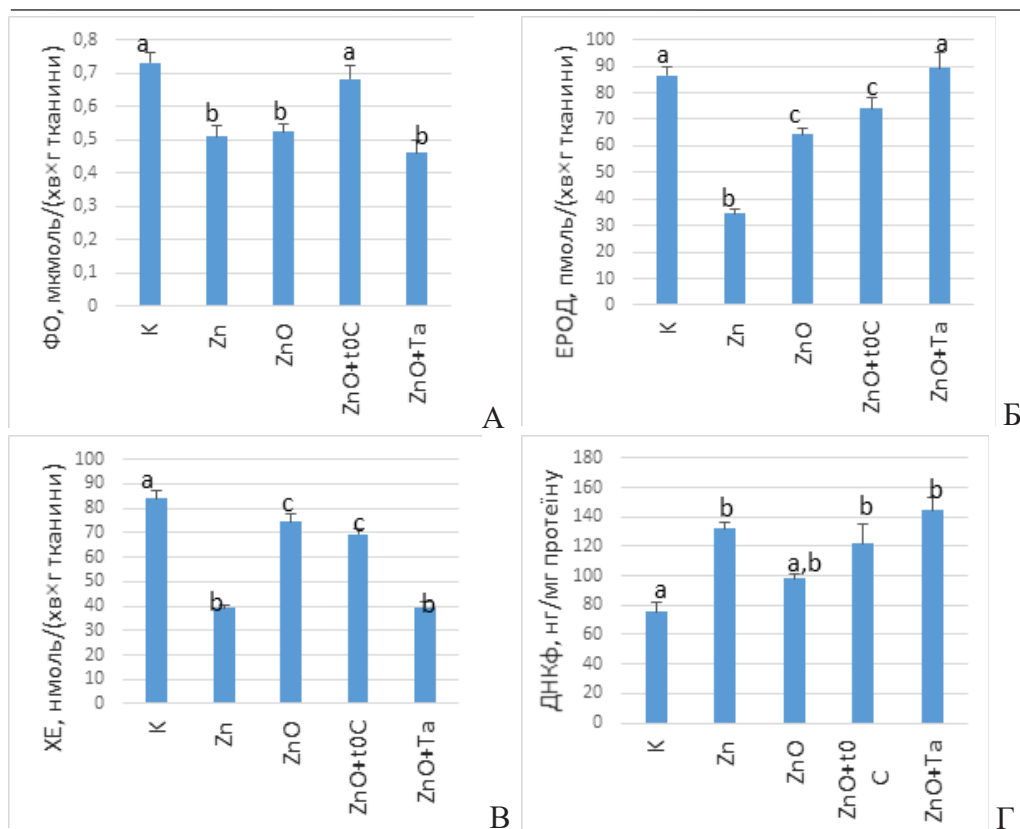


Рис. 2. Показники стану імунної системи, мікросомального окиснення, нейро- і цитотоксичності у травній залозі молюска *Unio tumidus* у контролі та за модельного впливу сполук цинку на організм,  $M \pm SD$ ,  $n=8$ : А – фенолоксидазна активність; Б – етоксирезорурфін-О-деетилазна активність; В – холінестеразна активність; Г – рівень фрагментації ДНК

Для інтегрального аналізу одержаних результатів ми використали статистичний метод побудови бінарного класифікаційного дерева з використанням CART алгоритму, який імітує природний процес мислення при диференційній діагностиці. Застосування цього підходу дало змогу виділити специфічні ознаки молекулярної відповіді досліджуваних груп двостулків на дію модельного чинника. Визначальна роль у диференціації груп належить показникам окисного стресу (рівень КПП і оксирадикалів) та вмісту МТ (рис. 3). За результатами визначення індексу варіабельності групи можна розташувати в ряді нано-ZnO+Tattu (8,3) > Zn(3,8) > нано-ZnO (1,6) > нано-ZnO+t°C (0,3).

Карбонілювання протеїнів вважається одним із визнаних, неспецифічних до природи чинника маркерів окисного ушкодження [23]. Воно посилюється у широкого кола організмів за дії низки пошкоджуючих чинників, у тому числі металів, сполук прооксидантної природи тощо [1, 5, 8–10, 26]. Отримані нами результати свідчать про збільшення рівня КПП у тварин за комбінованої дії чинників, особливо за експозиції молюсків у присутності пестициду тіокарбаматної природи, неузгоджено з рівнем оксирадикалів ( $r=0,63$ ,  $p<0,001$ ). Відтак, поєднана дія нано-ZnO зі супутніми чинниками сприяє посиленню токсичності нано-ZnO та прояву специфічних ознак, як окисний стрес у групі нано-ZnO+Tattu, який є визнаним прооксидантом [8]. Очевидно, накопичення КПП у травній залозі перлівниці пов'язано з пригніченням процесів елімінації продуктів окисного ушкодження за участю протеасом

і розвитку протеостазису [15, 26], що узгоджується й із появою ознак uszkodження ДНК. Подібні результати були отримані в умовах *in vitro* за дії дитіокарбаматів аурому, цинку та купруму на клітинні лінії раку молочної залози DCIS і MCF7, а також раку простати PC-3, проте механізми цього явища остаточно не з'ясовані [5].

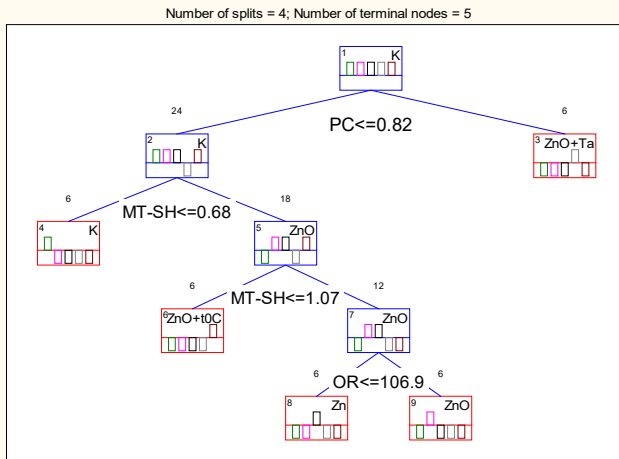


Рис. 3. Класифікаційне дерево за CART алгоритмом набору біохімічних показників травної залози молюска перлівниці за індивідуальної дії сполук цинку та в поєднанні зі супутніми пошкоджуючими чинниками (тепловий стрес і тіокарбаматний пестицид Татту). PC – Вміст карбонільних похідних протеїнів, MT-SH металотіонеїнів, OR – оксирадикалів

MT – низькомолекулярні, термостабільні протеїни цитозолу з високим вмістом цистеїну (до 30 %) та металу, з плейотропними функціями [6, 18, 25]. Завдяки наявності у промоторі гена трьох регуляторних елементів, металочутливого, антиоксидантночутливого та глюкокортикоїдоchутливого, вони беруть участь у депонуванні та детоксикації металів, знешкодуванні активних форм кисню, формуванні імунної відповіді, проліферації та диференціації клітин тощо [6, 18, 25]. На прикладі вищих хребетних було доведено, що у клітині MT утворюють спільний пул тіолів разом із глутатіоном і можуть функціонувати як пастки радикалів, що було відзначено й нами у досліджуваних двостулках. Негативна кореляція, з одного боку, з вмістом оксирадикалів, а з іншого – MT і глутатіону підтверджує наведені міркування ( $r = 0,55$  та  $r = 0,58$  відповідно;  $p < 0,01$ ). Подібні результати були отримані й у тварин із природної популяції, що існувала у водоймі, забрудненій металами. У молюсків було відзначено збільшення вмісту MT, 50 % із яких є в окисненій формі, узгоджено зі зменшенням інтенсивності перекисного окиснення ліпідів [12].

Вплив сполук цинку, як поокремо, так і в поєднанні з іншими супутніми чинниками у травній залозі молюсків, викликав універсальну реакцію організму на пошкоджуючий чинник: дво-трикратне збільшення концентрації MT-SH як показника експресії цього металопротеїну. Це відповідає загальним уявленням, встановленим з використанням нижчих і вищих хребетних, про індукцію синтезу MT у відповідь на вплив металів, насамперед кадмію, ртуті та цинку, через цис-активний елемент у промоторі гена MT і транскрипційний фактор MTF-1 [6]. Більше того, рівень MT-SH виявився ключовою класифікаційною ознакою, яка дає змогу відділити інтактних тварин і тварин, які зазнавали впливу модельних чинників (рис. 3).

Цинк вважається необхідним компонентом забезпечення нормального функціонування імунної системи [19]. За його дефіциту у тварин і людини пригнічується імунний захист, знижується здатність імунокомпетентних клітин до фагоцитозу, утворення цитокінів, функціональна активність Т-хелперів тощо [19, 24]. Збільшення вмісту MT-SH призвело до часткового вилучення цинку з лабільного пулу у травній залозі перлівниці ( $r = 0,77$ ;  $p < 0,001$ ) [10], що, очевидно, стало однією з детермінант пригнічення фенолоксидазної активності як показника імунного статусу молюсків [20]. Такі дані отримані нами вперше.

ЕРОД (активація) та ХЕ (пригнічення) вважаються специфічними маркерами поліароматичних циклічних вуглеводнів та поліхлорованих біфенілів і сполук тіокарбаматної та органофосфатної природи відповідно. Разом з тим, з'являється дедалі більше повідомлень, що високий рівень двовалентних металів за умов *in vitro* може викликати їх неспецифічне інгібування в ряді Cd(II)>Ni(II)>Cu(II)>Co(II)=Zn(II)>Pb(II)>Fe(II)>Cr(VI) (для ЕРОД) [4, 11, 22], що для цинку було встановлено і нами за умов організму (рис. 3). Це пов'язує зі здатністю металів зв'язуватися з функціональними групами (сульфгідрильними, карбоксильними, імідазольними тощо) в активних центрах ензимів та/або замінювати метал, асоційований з ензимом, на інший, що призводить до послаблення або втрати каталітичної активності ензимів. В окремих роботах були здійснені пошукові експерименти щодо протекторної ролі глутатіону проти інгібувальної дії металів, насамперед цинку, купруму та кадмію, в результаті чого було встановлено, що глутатіон у кількості 0,5 мМ зменшує ефект впливу металів у діапазоні концентрацій 10–100 мкмоль Zn і 1–100 мкмоль Cu за умов *in vitro* [22]. Статистично-вірогідного взаємозв'язку між пулом тіолів (глутатіон, MT) та ЕРОД активністю нами не було встановлено ( $r=0,3$ ,  $p=0,053$ ), що може бути пов'язано з порівняно нижчим співвідношенням реагентів 5–50 проти 0,5–0,8, використаних нами для проведення досліджень за умов організму.

Відтак, вплив супутніх чинників модулює реакції стресочутливих і детоксикаційних систем двостулкового молюска перлівниці на дію наноформи цинк оксиду. Це проявляється як посилення окисної деструкції протеїнів, збільшення концентрації глутатіону у травній залозі перлівниці та поступове послаблення здатності організму до адаптивної реакції на дію додаткового пошкоджуючого чинника. До універсальних реакцій молюсків на стрес, зумовлений дією мікромолярних концентрацій сполук цинку, належать пригнічення процесів мікосомального окиснення, імунної відповіді, поява ознак нейротоксичності, цитотоксичності та збільшення вмісту металодепонувальних стресорних протеїнів металотіонеїнів, за окремими винятками. Визначення вмісту карбонільних похідних протеїнів, металотіонеїнів і оксирадикалів дає підстави з високим ступенем вірогідності диференціювати групи тварин за природою діючого чинника. Двостулковий молюск перлівниці становить зручну і коректну експериментальну модель для оцінки потенційних біоризиків новітніх пошкоджуючих чинників.

Робота виконана за підтримки Міністерства освіти і науки України (НДР №125Б), Фонду Фулбрайта (*Fulbright Scholar Grant*) і Західно-Українського Біомедичного Центру.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Фальфушинська Г. І., Гнатишина Л. Л., Юрчак І. В. та ін. Реакції двостулкового молюска на теплову дію залежно від особливостей існування у природних умовах // Гидробиол. журнал. 2015. Т. 51. С. 81–94.
2. Ali D., Alarifi S., Kumar S. et al. Oxidative stress and genotoxic effect of zinc oxide nanoparticles in freshwater snail *Lymnaea luteola* L. // Aquat. Toxicol. 2012. Vol. 124–125. P. 83–90.
3. Anderson M. E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples // Meth. Enzymol. 1985. Vol. 113. P. 548–555.
4. Bozcaarmutlu A., Arinc E. Inhibitory effects of divalent metal ions on liver microsomal 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity of leaping mullet // Mar. Environ. Res. 2004. Vol. 58. P. 521–524.
5. Buac D., Schmitt S., Vestro G. et al. Dithiocarbamate-Based Coordination Compounds as Potent Proteasome Inhibitors in Human Cancer Cells // Mini Rev. Med. Chem. 2012. Vol. 12. P. 1193–1201.
6. Davis S. R., Cousins R. J. Metallothionein expression in animals: a physiological perspective on function // J. Nutr. 2000. Vol. 130. P. 1085–1088.

7. Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V. J. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity // *Biochem. Pharmacol.* 1961. Vol. 7. P. 88–95.
8. Falfushynska H., Gnatyshyna L., Stoliar O. In situ exposure history modulates the molecular responses to carbamate fungicide Tattoo in bivalve mollusk // *Ecotoxicol.* 2013. Vol. 22. P. 433–445.
9. Falfushynska H., Gnatyshyna L., Yurchak I. et al. Habitat pollution and thermal regime modify molecular stress responses to elevated temperature in freshwater mussels (*Anodonta anatina*: Unionidae) // *Sci. Total. Environ.* 2014. Vol. 500–501. P. 339–350.
10. Falfushynska H., Gnatyshyna L., Yurchak I. et al. The effects of zinc nanooxide on cellular stress responses of the freshwater mussels *Unio tumidus* are modulated by elevated temperature and organic pollutants // *Aquat. Toxicol.* 2015. Vol. 162. P. 8293.
11. Frasco M. F., Fournier D., Carvalho F., Guilhermino L. Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity // *Biomarkers.* 2005. Vol. 10. P. 360–375.
12. Gagné F., André C., Blaise C. The dual nature of metallothioneins in the metabolism of heavy metals and reactive oxygen species in aquatic organisms: implications of use as a biomarker of heavy-metal effects in field investigations // *Biochem. Insights.* 2008. Vol. 1. P. 31–41.
13. Gagné F., Turcotte P., Auclair J., Gagnon C. The effects of zinc oxide nanoparticles on the metallome in freshwater mussels // *Comp. Biochem. Physiol.* 2013. Vol. 158C. P. 22–28.
14. Hernebring M., Fredriksson Å., Liljevald M. et al. Removal of damaged proteins during ES cell fate specification requires the proteasome activator PA28 // *Nature. Sci. Rep.* 2013. Vol. 3. P. 1381.
15. Kashrut A., Dubourguier H. S. From ecotoxicology to nanoecotoxicology // *Toxicol.* 2010. Vol. 269. P. 105–119.
16. Klotz A. V., Stegeman J. J., Walsh C. An alternative 7-ethoxyresorufin-O-deethylase activity assay: a continuous visible spectrophotometric method for measurement of cytochrome P-450 monooxygenase activity // *Anal. Biochem.* 1984. Vol. 140. P. 138–145.
17. Luna-Acosta A., Thomas-Guyon H., Amari M. et al. Differential tissue distribution and specificity of phenoloxidases from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* // *Comp. Biochem. Physiol.* 2011. Vol. 159B. P. 220–226.
18. Maret W. Zinc coordination environments in proteins as redox sensors and signal transducers // *Antioxid. Redox Signaling.* 2006. Vol. 8. P. 1419–1441.
19. Mocchegiani E., Muzzioli M., Giacconi R. Zinc, metallothioneins, immune responses, survival and ageing // *Biogerontology.* 2000. Vol. 1. P. 133–143.
20. Mottin E., Caplat C., Mahaut M.-L. et al. Effect of in vitro exposure to zinc on immunological parameters of haemocytes from the marine gastropod *Haliotis tuberculata* // *Fish. Shellfish. Immun.* 2010. Vol. 29. P. 846–853.
21. Olive P. L. DNA precipitation assay: a rapid and simple method for detecting DNA damage in mammalian cells // *Environ. Mol. Mutagen.* 1988. Vol. 11. P. 487–495.
22. Oliveira M., Santos M.A., Pacheco M. Glutathione protects heavy metal-induced inhibition of hepatic microsomal ethoxyresorufin O-deethylase activity in *Dicentrarchus labrax* L. // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2004. Vol. 58. P. 379–385.
23. Reznick A. Z., Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay // *Meth. Enzymol.* 1994. Vol. 233. P. 357–363.
24. Shankar A. H., Prasad A. S. Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection // *Am. J. Clin. Nutr.* 1998. Vol. 68. P. 447S–463S.
25. Stoliar O. B., Falfushynska H. I. Metallothionein of aquatic animals as a biomarker: Coverage of vulnerability // *Global J. Environ. Sci. Technol.* 2012. Vol. 2. P. 115.



26. Treaster S. B., Chaudhuri A. R., Austad S. N. Longevity and GAPDH Stability in Bivalves and Mammals: A Convenient Marker for Comparative Gerontology and Proteostasis // PLoS ONE. 2015. Vol. 10. P. e0143680.
27. Viarengo A., Burlando B., Cavaletto M. et al. Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis* // Am. J. Physiol. 1999. Vol. 277. P. 16121619.
28. Viarengo A., Ponzano E., Dondero F., Fabbri R. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic Molluscs // Mar. Environ. Res. 1997. Vol. 44. P. 69–84.

Стаття: надійшла до редакції 12.03.16

доопрацьована 05.09.16

прийнята до друку 13.09.16

## THE PECULIARITIES OF REACTION OF STRESS-RESPONSE SYSTEMS OF BIVALVE MOLLUSKS *UNIO TUMIDUS* UNDER THE EFFECT OF NANO-ZINC OXIDE IN THE COMBINATION WITH CONCOMITANT DAMAGING FACTORS

H. Falfushynska<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*I. Ya. Horbachevsky Ternopil State Medical University  
1, Maidan Voli, Ternopil 46001, Ukraine*

<sup>2</sup>*Volodymyr Hnatiuk Ternopil National Pedagogical University  
Research Laboratory of Comparative Biochemistry and Molecular Biology  
2, M. Kryvonis St., Ternopil 46027, Ukraine  
e-mail: halynka.f@gmail.com*

The peculiarities of molecular stress-response and detoxification systems of bivalve mollusk *Unio tumidus* from relatively clean area under the action of nano-Zinc oxide (nano-ZnO, 3.12  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) alone and in the combination with other damaging factors (high temperature (25 °C and thiocarbamate pesticide Tattoo (91  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )) after 14-day incubation in experimental conditions were evaluated. It has been shown that all treatments inhibited microsomal oxidation (according to the evaluation of EROD activity), caused neurotoxicity estimated by cholinesterase activity inhibition, cytotoxicity by increased of DNA strand breaks and inhibition of immune response by depleted of phenoloxidase activity, and increased the level of metal-binding stress proteins, metallothioneins in mollusk's digestive gland with some exceptions. Combined effect of nano-ZnO and heat stress or pesticide Tattoo caused increases in the level of protein carbonyls and total glutathione (nano-ZnO + Tattoo group) as well as increase the variability indices in the group of nano-ZnO + Tattoo fivefold compared with individual nano-ZnO effect. According to the results of classification tree analysis the levels of protein carbonyls, metallothioneins and oxyradicals are the main criterion of groups discriminating by type of stressors. Thus, the additional stressors modulated physiological and biochemical response of mollusks to the effect of nano-ZnO.

*Keywords:* mollusk *Unio tumidus*, nano-Zinc oxide, protein carbonyls, metallothionein, stressors interactions.