

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

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

МАЦЬКІВ ТЕТЯНА РОМАНІВНА

УДК : 502/504:577]:[594+599](477)

ДИСЕРТАЦІЯ

Дослідження ролі металотіонеїнів у запальних процесах на
моделях двостулкового моллюска *Dreissena polymorpha* та
лабораторних щурів

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

_____ **Тетяна Мацьків**

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

Тернопіль 2023

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	22
ВСТУП.....	23
РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	30
1.1. Низькомолекулярні тіолові сполуки як антиоксиданти.....	30
1.2. Металотіонеїни та їх роль при запальних процесах.....	36
1.2.1. <i>Структура та властивості металотіонеїнів.....</i>	36
1.2.2. <i>Функціонування металотіонеїнів за фізіологічних умов.....</i>	39
1.2.3. <i>Металотіонеїни як імунорегулятори. Роль металотіонеїнів при запальних процесах.....</i>	44
1.3. Імуноактивні ксенобіотики водного середовища. Кофеїн та мікропластик.....	50
РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	60
2.1. Відбір дослідних груп тварин.....	60
2.2. Дослідження низькомолекулярних тіолів.....	65
2.2.1. <i>Виділення металотіонеїнів з допомогою гель-проникної хроматографії.....</i>	65
2.2.2. <i>Визначення концентрації металотіонеїнів у тканинах.....</i>	66
2.2.3. <i>Визначення концентрації металів у металотіонеїнах та тканині.....</i>	67
2.2.4. <i>Електрофорез термостабільних протеїнів в поліактиламідному гелі....</i>	68
2.2.5. <i>Визначення концентрації глутатіону.....</i>	69
2.3. Аналіз стану системи антиоксидантного захисту та імунореактивності.....	70
2.3.1. <i>Загальна антиоксидантна активність.....</i>	70
2.3.2. <i>Супероксиддисмутазна активність.....</i>	71
2.3.3. <i>Каталазна активність.....</i>	72
2.3.4. <i>Утворення продуктів перекисного окиснення ліпідів та протеїнів</i>	72
2.3.5. <i>Активність фенолоксидази.....</i>	73
2.4. Визначення показників цитотоксичності	74
2.4.1. <i>Активність каспази-3.....</i>	74

2.4.2. Активність катепсину <i>D</i>	75
2.4.3. Визначення стабільності лізосомальних мембран	75
2.4.4. Активність кислої-фосфатази	76
2.4.5. Активність холінестерази	77
2.5. Визначення вмісту протеїну у тканині.....	78
2.6. Статистичні методи оцінки результатів дослідження.....	78
РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	80
3.1. Вплив імуномодуляторів на властивості металотіонеїнів аборигенних і інвазивних молюсків виду <i>D. rolytorpha</i> та лабораторних щурів	80
3.1.1. Морфологічні характеристики молюсків <i>D. rolytorpha</i> з двох популяцій за експериментального впливу.....	80
3.1.2. Характеристика металотіонеїнів аборигенної та інвазивної популяції <i>D. rolytorpha</i> за впливу на організм мікропластику, кофеїну, температури поокремо та у поєднанні.....	81
3.1.3. Вміст металів у тканинах молюсків за впливу мікропластику та кофеїну поокремо та у суміші за двох температурних режимів.....	89
3.1.4. Отримання та властивості металотіонеїнів синовіальної тканини щурів із карагенан-індукованим гонартритом	91
3.2. Дослідження проявів окисного/відновного стресу в інвазивних і аборигенних молюсків та лабораторних щурів за впливу на організм імуномодулюючих стресорів.....	96
3.2.1. Вплив мікропластику та кофеїну поокремо та в суміші за двох температурних режимів на стан системи окисного/відновного стресу в аборигенній та інвазивній популяціях <i>D. rolytorpha</i>	96
3.2.2. Стан фенолоксидазної активності за впливу на організм мікропластику, кофеїну та їх суміші за двох температурних режимів.....	100
3.2.3. Вплив карагенан-індукованого гонартриту на стан системи окисного/відновного стресу у синовіальній тканині лабораторних щурів.....	104

3.3. Оцінка ступеню токсичності впливу імуномодуючих стресорів на <i>D. polymorpha</i> з двох популяцій та лабораторних щурів.....	107
3.3.1. Вплив мікропластику та кофеїну поокремо та в суміші за двох температурних режимів на показники апоптозу та аутофагії у <i>D. polymorpha</i> з двох популяцій.....	107
3.3.2. Дослідження цілісності лізосомальних мембран молюсків за впливу імуномодуляторів при різних температурних режимах.....	110
3.3.3. Дослідження показників токсичності при карагенан-індукованому гонартриті.....	113
РОЗДІЛ IV. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	115
4.1. Міжпопуляційні відмінності у відповідях організму <i>D. polymorpha</i> на вплив хімічних та екологічних чинників	116
4.1.1. Міжпопуляційні відмінності у контрольних групах молюсків.....	116
4.1.2. Спільні риси у відповідях організму молюсків аборигенної та інвазивної популяцій за впливу імуномодуляторів.....	117
4.1.3. Особливості відповідей на вплив імуномодуляторів у аборигенній та інвазивній популяціях.....	120
4.2. Реакція металотіонеїнів за впливу імуномодуючих стресорів як складова реакції на стрес та імунореактивні чинники	130
4.3. Роль металотіонеїнів у запальному процесі за стану гострого гонартриту.....	132
ВИСНОВКИ.....	146
ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	148

АНОТАЦІЯ

Мацьків Т.Р. Дослідження ролі металотіонеїнів у запальних процесах на моделях двостулкового молюска *Dreissena polymorpha* та лабораторних щурів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія» (09 – Біологія). – Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка, Тернопіль, 2023.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню ролі металотіонеїнів у реакції організму на вплив стресорних чинників запальної/антизапальної дії на моделях філогенетично віддалених організмів. Цинк (Zn) як імуномодулятор викликає посилену увагу дослідників у останні роки у зв'язку з пошуком ефективних засобів забезпечення реакції організму на стрес, пов'язаний з інфекційними захворюваннями, зокрема коронавірусною інфекцією (COVID-19) та численними мікрополлютантами у довкіллі, у тому числі мікропластиком та фармацевтичними препаратами. Серед близько 3000 відомих Zn-зв'язуючих протеїнів, металотіонеїни (МТ), універсальні у живому світі внутрішньоклітинні термостабільні політіоли, вирізняються тим, що у фізіологічних умовах депонують Zn у клітинах та забезпечують його транспорт до інших молекулярних мішеней. Їх ролі як індукцибельних редокс-активних молекул приділяється суттєво менше уваги. Зокрема, очікується, що особливості балансу між Zn-буферною функцією та відповіддю на окисний стрес цих поліфункціональних протеїнів відіграють роль у запальних процесах. Проте імуномодулюючий ефект МТ досі не з'ясований.

У якості модельних організмів були обрані прісноводні молюски виду дрейсена (тригранка) *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) та щурі-альбіноси лінії Вістар. На моделі молюсків досліджували вплив таких імуномодуляторів як кофеїн та мікропластик окремо та у сумішах за двох температурних режимів та беручи до уваги особливості преадаптації в аборигенній та інвазивній популяціях. У щурів імунну реакцію вивчали за патології індукованого гонартриту. Для оцінки участі стрес-індуцибельних метал-депонувальних

протеїнів металотіонеїнів у реакції організму на вплив імуномодуляторів аналізували загальну концентрацію цих протеїнів за вмістом тіолів (MTSH) та вміст їх цинк-депонуваної форми (Zn-MT) у співставленні з показниками реакції окисного/відновного стресу, імунореактивності та апоптозу/аутофагії. Для реалізації мети дослідження використовувались методи препаративної біохімії, гістології, морфометрії, світлова та люмінесцентна мікроскопія, спектрофотометрія, хроматографічний та електрофоретичний аналізи та статистичний аналіз.

Дисертаційне дослідження складалось з двох етапів. У I-й експериментальній серії ми порівнювали вплив імуномодулюючих чинників на молюсків *D. polymorpha* аборигенної (р. Дніпро поблизу м. Херсон, Kh) та інвазивної (р. Серет, Тернопільський став, Tn) популяцій. Для цього, молюсків *D. polymorpha* з двох популяцій впродовж 14-ти днів піддавали впливу мікрочастинок полістиролу розміром 2 мкм і концентрацією $1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ (MP), фармацевтичного препарату кофеїну (Caf) концентрацією $20,0 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$, підвищеної температури $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (T) та суміші мікропластику з кофеїном за двох температурних режимів – $18 \text{ }^\circ\text{C}$ (Mіx) та $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (MіxT). Концентрації кофеїну та MP відповідали екологічно реальним концентраціям речовин у природних водоймах. При цьому враховувалося, що саме пластик малого розміру частинок провокує імунні відповіді організму. Температурний режим $25 \text{ }^\circ\text{C}$ відповідав екологічно реальним значенням для прісних водойм у період збору молюсків. Досліджували показники у гомогенаті м'яких тканин.

У II-й серії досліджень у лабораторних щурів-альбіносів лінії Вістар досліджували участь MT у реакції організму на запалення за гострого гонартриту (ГА). Для цього було сформовано дві групи – інтактний контроль (С) та патологія (GA). У щурів GA-групи індукували запалення шляхом одноразового внутрішньосуглобового введення 25 мкл 2 % карагенану в обидва коліна, тоді як особини інтактною С-групи отримували 25 мкл стерильного фізіологічного розчину. Тварин виводили з експерименту на 7-й день після

введення карагенану, коли спостерігались значні запальні зміни суглобу. Визначали показники у супернатанті синовіальних тканин.

Для оцінки реакції МТ на дію на організм імуномодуляторів з м'яких тканин молюсків та колінного суглобу щурів хроматографічно виділялись протеїни, які за ознаками термостабільності не денатурують за впливу температури 85 °С протягом 5 хв, мають молекулярну масу близько 7 кДа (підтверджено трицин SDS-PAGE електрофорезом), специфічний спектр поглинання з максимумом при 245–255 нм, що свідчить про наявність метал-тіолатних кластерів та відсутність ароматичних амінокислотних радикалів. Вплив стресорних чинників на молюсків у жодній групі з двох популяцій молюсків не провокував утворення димерів МТ, чи їх розпад на окремі кластери, що свідчить про відсутність екстремальних умов середовища. У тварин з ГА спостерігались ознаки часткової олігомеризації МТ, що може бути наслідком окиснення тіолів з утворенням олігомерів.

Порівнюючи дві контрольних групи аборигенних та інвазивних молюсків, можемо стверджувати, що хоч і загальний рівень МТ не виявляв відмінностей, частка метальованого МТ (Zn-МТ) у групі KhC становила 50 %, у той час як у інвазивній TnC-групі цей показник сягав 82 %, що вказує на відмінності у функціональному стані цього тіола та, відповідно, у залученні його до антиоксидантного захисту та депонування клітинного цинку.

У представників інвазивної популяції усі кофеїн-вмісні експозиції (Caf, Міх, МіхТ) викликали збільшення концентрації МТ за рахунок апо-форми (до чотирьох разів за впливу суміші), що гіпотетично сприяло посиленню їх антиоксидантних можливостей, тоді як у аборигенних представників мало місце збільшення вмісту МТ за рахунок їх цинк-депонуваної форми за усіх експозицій (за винятком МР) та, за більшості експериментальних впливів, і неметальованої форми. Відтак, за впливу досліджених чинників двом популяціям була властива відмінність у стратегії функціонування МТ, що проявлялось як різниця у рівні секвестрації ними цинку. Рівень глутатіону та редокс-індекс глутатіону (RI GSH) підвищувалися у аборигенних молюсків,

тоді як у інвазивних таких реакцій не спостерігалось. Визначення в інвазивній популяції концентрації купруму у тканинах виявило його збільшення, особливо за теплових впливів у TnT- і TnMixT-групах (до 2,9 і 3,0 рази), що, у свою чергу, спричинило різке зниження співвідношення Zn/Cu у тканинах молюсків та, ймовірно, позначилось на редокс-потенціалі тіолових груп у МТ.

У щурів за запального процесу в суглобах рівень протеїну МТ був підвищений, порівнюючи з контролем, як за загальною концентрацією протеїну (на 79 %), так і за концентрацією метальованої (Zn-вмісної) форми (на 46 %). При цьому, загальний рівень цинку в тканині суглоба за ГА не зазнавав змін, що вказує на залучення захисного механізму депонування цинку. Разом з тим, за патології спостерігався дисбаланс між діапазоном зростання концентрації загального протеїну МТ та його метальованої форми, що виявлялося у збільшенні частки неметальованих МТ (апо-форма). Відповідно, виникали умови для ефективного залучення МТ у антиоксидантний захист за рахунок незалучених у зв'язування цинку тіолових груп. Рівень глутатіону також знижувався на 28 %, що могло послаблювати його здатність захищати ліпіди від окисних ушкоджень та сприяти зростанню ролі тіолів МТ у забезпеченні антиоксидантного захисту клітинним тіоломом при запаленні.

Отже, в обох модельних ситуаціях (вплив хімічних та температурного чинників у молюсків та запалення у щурів), зростає вміст МТ за рахунок апо-форми. При цьому, в аборигенній популяції молюсків та у щурів збалансовано зростає і вміст метальованих МТ.

Дослідження показників окисного/відновного стресу у молюсків виявило відмінності між контрольними групами, які свідчать про вищу активність системи антиоксидантного захисту в інвазивній популяції. Втім, за впливу МР в аборигенній популяції активувались антиоксиданти, зокрема, мітохондріальна форма супероксиддисмутази (Mn-SOD), тоді як у інвазивних молюсків таких реакцій не спостерігалось, натомість, підвищувався рівень карбонілів протеїнів на 26 %. Вплив кофеїну у Kh-популяції не викликав змін стану антиоксидантів, порівнюючи з контролем, тоді як у інвазивній популяції спостерігалось

підвищення активності цитозольної Cu,Zn-SOD та зниження активності каталази. Вплив підвищеної температури також сприяв активації Cu,Zn-SOD у обох популяціях, але у Kh-популяції знижував активність каталази. При цьому, в інвазивній групі рівень окисних ушкоджень протеїнів підвищувався. Вплив МР у суміші з фармацевтиком у багатьох випадках виявляв кумулятивний ефект щодо реакції на окремі чинники, який проявлявся у активації Cu,Zn-SOD та каталази у обох популяціях, а також рівня перекисного окиснення ліпідів (TBARS) у Tn- та карбонілів протеїнів у Kh-групах, тоді як комбінований вплив за підвищеної температури пригнічував, або повністю нівелював ефект суміші. При цьому, рівні карбонілювання протеїнів зростали у Kh-популяції за усіх впливів (за винятком KhT) у аборигенних представників, тобто ця популяція виявляла меншу резистентність до впливу експозиційних чинників. Стан імунореактивності, визначений за активністю фенолоксидази та лаккази, у двох популяціях виявляв схожість реакції на вплив експозицій та проявлявся у пригніченні за впливу МР, відсутність реакції на вплив кофеїну та підвищеній активності за теплового та комбінованих впливів. Проте, не зважаючи на спільну стратегію відповіді імунореактивності в аборигенній та інвазивній популяціях молюсків, діапазон реакції був різним залежно від популяції.

При патології ГА у щурів спостерігався дисбаланс активностей ензимів антиоксидантного захисту, що проявлялося в удвічі вищій активності SOD, порівнюючи з контролем, тоді як активність каталази знижувалася. Це могло призводити до накопичення H_2O_2 та, як наслідок, зростання рівня TBARS.

Відтак, вплив низки стресорних чинників у молюсків та запалення у щурів ініціювали прояви окисного стресу, проте залежно від преадаптації у певному середовищі, негативний вплив МР був більш очевидним для аборигенних молюсків, тоді як на експозицію кофеїном чутливіше реагувала інвазивна група, а комбінована дія викликала в обох популяціях синергічний ефект. Порівняння реакцій складників клітинного тіолому свідчить про те, що саме МТ, а не глутатіон реагували на дію досліджених стресорних чинників.

Активність ензимів апоптозу та аутофагії мала відмінності між контрольними групами молюсків з двох популяцій. Так, каспаза-3 та загальний катепсин Д у контрольній групі Tn-популяції проявляли в 1,8 та 1,5 раза вищі показники активності, що свідчить про короткочасність життєвого циклу цих молюсків. За умов експозицій, у обох популяціях тепловий та комбіновані впливи викликали найбільший ефект серед всіх експериментальних впливів на каспазу-3 та загальну активність катепсину Д. При цьому, у Kh-популяції досліджувані впливи були більш згубними, оскільки активація каспази-3 проявлялась у кожній експериментальній групі, а за впливу Міх спостерігався і посилений вихід катепсину Д з лізосом. Тест на лізосомальну цілісність виявив у 2,5 рази вищий рівень дестабілізації лізосом у контрольній групі інвазивної популяції. Експозиції сприяли загальній реакції зниження цілісності лізосом у двох популяціях, але зміни були більш відчутними в аборигенних молюсків. Відмінність відповідей на впливи імуномодуляторів у межах популяції були виявлені також на прикладі кислої фосфатази. МР інгібував загальну активність ензиму, тоді як усі кофеїн-вмісні впливи, особливо комбіновані, сприяли збільшенню показника мембранно-зв'язаної латентності фосфатаз (до 3,4 та 3,6 разів у TnMіx- та TnMіxT-групах відповідно), що говорить про активацію функціональної активності лізосом за цих впливів.

Оцінка реакції організму щурів на індуковане запалення суглобів засвідчила підвищений рівень сіалових кислот у плазмі крові та зниження активності холінестерази у синовіальній тканині, що є ознаками гострої токсичності, пригнічення процесів регуляції розвитку та ремоделювання кісток.

Застосування факторного аналізу підтвердило в обох модельних схемах, як на моделі двостулкового молюска, так і за гострого гонартриту, узгодженість у відповідях між MTSN та Zn-MT та показниками запального процесу та антиоксидантного захисту. Це свідчить про універсальний характер стратегії залучення метальованої форми MT та їх апоформи до відповіді організму на вплив стресорних чинників.

Порівняння реакцій на пошкоджуючі чинники у двох популяціях молюсків за допомогою дискримінантного аналізу продемонструвало суттєвий вплив преадаптації на здатність реагувати на стрес та специфіку відповіді. Зокрема, було підтверджено переваги інвазивної популяції над аборигенною у резистентності до стресових впливів, що виявлялось у малому діапазоні відмінностей у локалізації експериментальних груп залежно від природи діючого чинника, тоді як у аборигенній популяції всі групи були чітко дистанційовані. Було також відзначено особливості у реакції на МР та кофеїн залежно від преадаптації у біотопі та синергізм у експозиціях до комбінованої дії, який частково нівелювався тепловим чинником.

Відтак, співставлення двох характеристик МТ – за вмістом тіолових груп та цинк-депонувальної форми, яке вкрай рідко використовується у дослідженні цих стрес-чутливих металодепонувальних протеїнів, довело, що ці протеїни беруть участь у редокс-реактивності організму на стресорні чинники, відмінні від їх типових індукторів – перехідних металів. Посилення цинк-депонувальної функції МТ є індикатором лабільності цинк-залежних процесів у організмі та стратегії кінцевих наслідків несприятливих впливів залежно від сили ураження та особливостей преадаптації до дії стресорного чинника.

Ключові слова: металотіонеїни, тіол-вмісні сполуки, апоптоз, Цинк, купрум, окисний стрес, пре-адаптація, цитотоксичність, щурі, забруднення, двостулковий молюск, водне середовище, антиоксидантні ензими, антиоксидантна система захисту, антиоксидантна система.

SUMMARY

Matskiv T. R. Investigation of the role of metallothioneins in inflammatory processes on the models of bivalve mollusk *Dreissena polymorpha* and laboratory rats. – 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 the role of metallothioneins in the response to the influence of inflammatory/anti-inflammatory stressors on models of phylogenetically distant organisms. Zinc (Zn) as an immunomodulator has attracted the increased attention of researchers in recent years in connection with the search for effective means of ensuring the organism's response to stress associated with infectious diseases, in particular, coronavirus infection (COVID-19) and numerous micropollutants in the environment, including microplastics and pharmaceuticals. Among about 3,000 known Zn-binding proteins, metallothioneins (MTs), the universal among living world intracellular thermostable polythiols, are distinguished by their ability to buffering Zn within the cells under physiological conditions and provide its transport to other molecular targets. Much less attention is paid to their role as inducible redox-active molecules. In particular, the particularity of the balance between the Zn-buffering function and the response to oxidative stress of these bifunctional proteins is expected to be involved in the inflammatory processes. However, the immunomodulatory effect of MTs have not been elucidated yet.

In the present study, freshwater mussels *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) and Wistar albino rats were chosen as model organisms. On the molluscs model, the effect of supposed immunomodulators, caffeine and microplastics, separately and in mixtures at two temperature regimes was studied, taking into account the peculiarities of their pre-adaptation in native and invasive populations. In rats, the immune reaction was studied under the pathology of induced gonarthrosis. In order to assess the participation of stress-inducible metal-buffering proteins metallothioneins in the response of the organism to the influence of immunomodulators, the total

concentration of these proteins determined from their thiol content (MTSH) and the concentration of their zinc-buffering form (Zn-MT) were analyzed in association with indexes of oxidative/reductive stress response, immunoreactivity and apoptosis/autophagy. The methods of preparative biochemistry, histology, morphometry, light and luminescence microscopy, spectrophotometry, chromatographic and electrophoretic analyzes and statistical analysis were used to achieve the goal of the study.

The experiment was represented by two stages. In the 1st experimental stage, we compared the effect of immunomodulating factors on *D. polymorpha* molluscs from native (Dnipro River near Kherson, Kh) and invasive (Seret River, Ternopil Stav, Tn) populations. For this aim, *D. polymorpha* molluscs from two populations were exposed for 14 days to polystyrene microparticles with a size of 2 μm and a concentration of 1 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (MP), a caffeine of pharmaceutical quality (Caf) with a concentration of 20.0 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, elevated temperature of 25 $^{\circ}\text{C}$ (T) and a mixture of microplastics with caffeine at two temperature regimes – 18 $^{\circ}\text{C}$ (Mix) and 25 $^{\circ}\text{C}$ (MixT). The concentrations of caffeine and MP corresponded to ecologically real concentrations of substances in natural water bodies. At the same time, it was taken into account that plastic of small particle size provokes the immune responses of the organism. The temperature regime of 25 $^{\circ}\text{C}$ corresponds to the ecologically real values for water in the studied areas during the collection of mussels. The parameters were studied in the homogenate of soft tissues.

In the 2nd experimental series, the participation of MT in the response of the organism to inflammation during acute gonarthrititis was investigated in Wistar albino laboratory rats. For this aim, two groups were formed - intact control (C) and pathology (GA). Gonarthrititis was induced in rats of the GA-group by a single intra-articular injection of 25 μl of 2 % carrageenan into both knees, while individuals of the intact C-group received 25 μl of sterile saline. The animals were removed from the experiment on the 7th day after the introduction of carrageenan, when significant inflammatory changes in the joint were observed. Parameters were determined in the supernatants of the synovial tissues.

To evaluate the reaction of MT to the action on the organism of immunomodulators, chromatographically were isolated proteins from the soft tissues of molluscs and the knee joint of rats that, according to signs of thermal stability, do not denature under the influence of a temperature 85 °C for 5 min, have a molecular weight of about 7 kDa (confirmed by tricine SDS-PAGE electrophoresis), a specific absorption spectrum with a maximum at 245–255 nm, which indicates the presence of metal-thiolate clusters and the absence of aromatic amino acid radicals. The impact of stressful factors on molluscs in none of two populations provoked the formation of MT dimers or their disintegration into separate clusters, which indicates the absence of extreme environmental conditions. Animals with GA showed signs of partial oligomerization of MT, which may be a consequence of oxidation of thiols with the formation of oligomers.

Comparing the two control groups of native and invasive molluscs, we can say that although the total level of MT does not show differences, the part of metallated MT (Zn-MT) in the KhC-group was 50 %, while in the invasive TnC-group this indicator reached 82 %, indicating differences in the functional state of this thiol and, accordingly, in its involvement in antioxidant protection and cellular zinc deposition.

In invasive representatives, all caffeine-containing exposures (Caf, Mix, MixT) caused an increase in the content of the apo-form MT (up to four times under the influence of the mixture), which hypothetically contributed to the strengthening of their antioxidant capacity, while in native mussels there was an activation of their zinc-buffer properties at all exposures (with the exception of MP), and under most experimental influences, its non-metallated form. Therefore, under the influence of the investigated factors, the two populations had a difference in the strategy of MT functioning, which was manifested as a difference in their zinc sequestration. In the native population the level of glutathione and the redox index of glutathione (RI GSH) increased under the influence of MP and Mix, while no such reactions were observed in invasive molluscs. Determination of copper content in tissues in the invasive population revealed its increase, especially under thermal effects in the TnT- and TnMixT-groups (up to 2.9 and 3.0 times), which, in turn, caused a sharp decrease

in the Zn/Cu ratio in the tissues of molluscs and, probably affect on the redox potential of thiol groups in MT.

In rats with an inflammatory process in the joints, the level of MT protein was increased compared to the control both in terms of the total protein concentration (by 79 %) and the content of the metalated (Zn-containing) form (by 46 %). At the same time, the total level of zinc in the joint tissue during gonarthrosis did not change, which indicates the involvement of the protective mechanism of zinc deposition. However, under pathology, an imbalance was observed between the range of increase of the total MT protein content and its metallated form, which was manifested in an increase in the proportion of non-metallated MT (apo-form). Accordingly, there was the conditions for the effective involvement of MT in antioxidant protection due to thiol groups not involved in zinc binding. The level of glutathione was also reduced by 28 %, that can lead to its inability to protect lipids from oxidative damage and an increased role of MT thiols in providing antioxidant protection by the cellular thiolome during inflammation.

Therefore, in both model situations (influence of chemical and temperature factors on molluscs and inflammation in rats), there is an imbalance of the metalated and apo-form of MT with an increase in the content of the last. At the same time, in the native molluscs and rats the content of metalated MT also increased in a balanced manner.

The study of indicators of oxidative/reductive stress in molluscs revealed differences between control groups, which indicate a higher activity of the antioxidant defense system in the invasive population. However, under the influence of MP, antioxidants, in particular, the mitochondrial form of superoxide dismutase (Mn-SOD), was activated in the native population, while no such reactions were observed in invasive molluscs, in which, on the contrary, the level of protein carbonyls increased by 26 %. Exposure to caffeine in the Kh-population did not cause changes in the state of antioxidants compared to the control, while in the invasive representatives there was an increase in the activity of cytosolic Cu,Zn-SOD and a decrease in the activity of catalase. Exposure to elevated temperature also promoted

activation of Cu,Zn-SOD in both populations, but decreased catalase activity in the Kh population. At the same time, the level of oxidative damage of proteins increased in the invasive group. The effect of MP in a mixture with pharmaceuticals revealed a cumulative effect in relation to the response to individual factors for most markers, which was manifested in the activation of Cu,Zn-SOD and catalase in both populations, as well as the level of lipid peroxidation (TBARS) in Tn- and protein carbonyls in Kh-representatives, while the combined effect at elevated temperature suppressed or completely eliminated the effect of the mixture. At the same time, the levels of protein carbonylation increased in the Kh-population under all exposures (except for KhT) in native representatives, that is, this population showed less resistance to exposure factors. The state of immunoreactivity, determined by the activity of phenoloxidase and laccase, in the two populations revealed a similarity in the response to the effects of exposures and manifested itself in inhibition under the influence of MP, no response to the influence of caffeine, and increased activity under thermal and combined effects. However, despite the common response strategy of immunoreactivity in native and invasive molluscs, the intensity of responses in both populations was different.

Under the GA pathology in rats, an imbalance of the activities of antioxidant protection enzymes was observed, which was manifested in a two-fold higher activity of SOD, compared to the control, while the activity of catalase decreased. This could lead to the accumulation of H_2O_2 and, as a consequence, the increase in TBARS levels.

Thus, exposure to a number of stressors in molluscs and inflammation in rats initiated manifestations of oxidative stress, however, depending on pre-adaptation in a certain environment, the negative effect of MP was more obvious for native molluscs, while the invasive group reacted more sensitively to caffeine exposure, and the combined effect caused a synergistic effect in both populations. Comparison of the reactions of cellular thiolome components shows that MT, and not glutathione, responded to the effects of the studied stressors.

The activity of apoptosis and autophagy enzymes had differences between the control groups of molluscs from the two populations. Thus, caspase-3 and total cathepsin D in the control group of the Tn population showed by 1.8 and 1.5 times higher activity, which indicates the short life cycle of these molluscs. Under the experimental conditions, in both populations, thermal and combined exposition caused the greatest effect among all experimental factors on caspase-3 and the total activity of cathepsin D. At the same time, in the Kh-population the studied effects were more harmful, since the activation of caspase-3 was manifested in every experimental group, and increased release of cathepsin D from the lysosome was observed under the influence of Mix. Test on the lysosomal integrity revealed a 2.5-fold higher level of lysosome destabilization in the TnC-group. The effects of exposure contributed to a common reaction of a decrease in the integrity of lysosomes in the two populations, but the changes were more sensitive in native molluscs. Differences in responses to the effects of immunomodulators within the population were also revealed in acid phosphatase activity. MP inhibited the total activity of the enzyme, while all caffeine-containing exposures, especially combined, promoted an increase in the index of membrane-bound latency of phosphatases (up to 3.4 and 3.6 times in TnMix- and TnMixT-groups, respectively), that suggests activation of the functional activity of lysosomes under these influences.

The assessment of the reaction of the rat's organism to the induced inflammation of the joints showed an increased level of sialic acids in the blood plasma and a decrease in the activity of cholinesterase in synovial tissues, that are a sign of acute toxicity, suppression the processes of regulation of development and remodeling of bones.

The factor analysis confirmed in both model schemes, both in the model of bivalve mollusc and in acute gonarthrosis, consistency in the responses between MTSH and Zn-MT and indicators of the inflammatory process and antioxidant protection. This testifies to the universal nature of the strategy of involving the metalated and apoform of MT in the response of the organism to the stressors.

Comparison of responses to damaging factors in two populations of molluscs using discriminant analysis demonstrated a significant influence of pre-adaptation on the ability to respond to stress and the specificity of the response. In particular, the superiority of the invasive population over the native population in resistance to stress was confirmed. It was manifested in a small range of differences in the localization of experimental groups depending on the nature of the stressor, while in the native population all groups were clearly distanced. Peculiarities in the reaction to MP and caffeine depending on pre-adaptation in the biotope and synergism in exposures to the combined action, which was partially neutralized by the thermal factor, were also noted.

To summarise, the comparison of two characteristics of MT – according to the content of thiol groups and the zinc-depositing form, which is extremely rare used in the study of these stress-sensitive metal-depositing proteins, proved that these proteins participate in the redox reactivity of the organism to stressor factors different from their typical inductors – transition metals. Enhancing of the zinc-depositing function of MT is an indicator of the lability of zinc-dependent processes in the organism and reflect the strategy of the adverse outcome pathways depending on the severity of the injury and the features of pre-adaptation to the exposure.

Key words: metallothioneins, thiol-containing compounds, apoptosis, Zinc, copper, oxidative stress, pre-adaptation, cytotoxicity, rats, pollution, bivalve mollusc, aquatic environment, antioxidant enzymes, antioxidant protection system, antioxidant system.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці в яких опубліковані наукові результати дисертації:

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

1. **Matskiv, T.**, Stoliar, O. (2023). Biochemical responses of the *Dreissena polymorpha* from municipal pond to caffeine, microplastics, and heating in single and combined exposures. *Studia Biologica*, 17(2), 27–42. <https://doi.org/10.30970/sbi.1702.717>
2. **Mackiv T.**, Lytkin D., Shebeko S., Khoma V., Martinyuk V., Gnatyshyna L., Stoliar O. (2021). Metallothioneins involment in the pathogenesis of synovial tissue inflammation in rats with acute gonarthritis. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 93(5), 63-71. <https://doi.org/10.15407/ubj93.05.063>
3. **Matskiv T.**, Martyniuk V., Khoma V., Yunko K., Orlova-Hudim K., Gnatyshyna L., Geffard A., Palos-Ladeiro M., Stoliar O. (2024). Biochemical basis of resistance to multiple contaminations in the native and invasive populations of *Dreissena polymorpha*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 276, 109803. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2023.109803>

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, МПК А61К 35/08 (2015.01), А23L 17/50 (2016.01), G01N 33/18 (2006.01) № u202103868; заявл. 05.07.2021; опубл. 01.12.2021, Бюл. № 48.

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. **Mackiv T.**, Lytkin D., Shebeko S., Khoma V., Martyniuk V., Formanchuk R., Gnatyshyna L, Stoliar O. Discovering metallothionein functions in the joint tissues under the acute carrageenan-induced gonarthritis. *Молодь і поступ*

біології: збірник тез доповідей XVII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів (м. Львів, 19–21 квітня 2021 р.). Львів. 2021. С. 66.

2. **Mackiv T.**, Lytkin D., Shebeko S., Khoma V., Martinyuk V., Formanchuk R., Gnatyshyna L., Stoliar O. The discovery of metallothioneins response in the synovial tissues of rats under the acute gonarthrititis. *Хімічні проблеми сьогодення (ХПС-2021)*: збірник тез доповідей IV Міжнародної (XIV Української) наукової конференції студентів, аспірантів і молодих учених. (м. Вінниця, 23–25 березня 2021 р.). Вінниця. 2021. С. 30.

3. Lytkin D., Shebeko S., **Mackiv T.**, Khoma V., Martinyuk V., Formanchuk R., Gnatyshyna L., Stoliar O. The involving of zinc-metallothioneins in the joint tissues response under the acute carrageenan-induced gonarthrititis in rat. *Modern approach of experimental and preclinical pharmacology: Materials of the International Distance Scientific and Practical Conference* (19 February, 2021, Kharkiv). Kharkiv. 2021. P.18-19.

4. **Matskiv T.**, Martyniuk V., Khoma V., Yunko K., Orlova-Hudim K., Gnatyshyna L., Geffard A., Palos-Ladeiro M., Stoliar O. Population dependent resistance of bivalve mollusk *Dreissena polymorpha* in the combine exposure to caffeine, microplastic and heating. *Молодь і поступ біології*: збірник тез доповідей XVIII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів (м. Львів, 6–7 жовтня 2022р.). Львів. 2022. С. 34-35.

5. **Matskiv T.**, Yunko K., Martyniuk V., Khoma V., Orlova-Hudim K., Gnatyshyna L., Geffard A., Palos-Ladeiro M., Stoliar O. Biochemical comparison of the invasive and native bivalve mollusk *Dreissena polymorpha*. Unique experience of Kherson field study. *Молодь і поступ біології*: збірник тез доповідей XVIII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів (м. Львів, 6–7 жовтня 2022р.). Львів. 2022. С.35-36.

6. **Matskiv T.**, Martyniuk V., Khoma V., Yunko K., Lechachenko S., Zabolotna M., Slimchuk S., Habarova S., Gush N., Shpak V., Orlova-Hudim K., Gnatyshyna L., Geffard A., Palos-Ladeiro M., Stoliar O. The biochemical basis of the preferences of bivalve mollusk *Dreissena polymorpha* in a new environment. Unique

opportunity to compare native and invasive populations in the field and experimental exposures. *Тернопільські біологічні читання – Ternopil Bioscience – 2023*: матеріали Міжнародної науково-практичної конференції, присвяченої 100-річчю від дня народження відомої вченої-ботаніка к.б.н., доц. Валентини Омелянівни Шиманської (м. Тернопіль, 11-13 травня 2023 р.). Тернопіль: Вектор, 2023. С. 193-196.

7. **Matskiv T.**, Martyniuk V., Khoma V., Zabolotna M., Habarova S., Gnatyshyna L., Stoliar O. Heating distorts the biochemical response of *Dreissena polymorpha* from municipal pond to the mixture of caffeine and microplastics. *Молодь і поступ біології: збірник тез доповідей XIX Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів* (м. Львів, 26-28 квітня 2023р.). Львів. 2023. С. 46-47.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

AcP – кисла фосфатаза

CtD – катепсин Д

GSH (GSSG) – глутатіон відновлений (окиснений)

MP – мікропластик

MT – металотіонеїни

PC – протеїнові карбоніли

PhO – фенолоксидаза

SiA – сіалові кислоти

SOD – супероксиддисмутаза

TAC – загальна антиоксидантна активність

TBARS – тіобарбітурові кислотнo-реактивні речовини

Zn-MT – концентрація цинку у складі металотіонеїнів

АФК/АФА/АФС – активні форми кисню/азоту/сірки

ГА – гонартрит

ДТНБ – 5,5-дитіобіс-2-нітробензойна кислота

ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота

ФМСФ – фенілметилсульфонілфторид

Tn – інвазивна популяція дрейсени, Тернопільський став

Kh – аборигенна популяція дрейсени, р Дніпро, м. Херсон

TnC, KhC – контрольні групи

TnMP, KhMP – вплив мікропластика

TnCaf, KhCaf – вплив кофеїну

TnT, KhT – вплив підвищеної температури (25 °C)

TnMix, KhMix – вплив суміші мікропластика і кофеїну

TnMixT, KhMixT – вплив суміші мікропластика і кофеїну за підвищеної температури (25 °C)

GA, C – група щурів із гонартритом та інтактний контроль

НДЛ – науково-дослідна лабораторія порівняльної біохімії та молекулярної біології Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка

ВСТУП

Актуальність теми.

Цинк (Zn) як імуномодулятор викликає посилену увагу дослідників у останні роки у зв'язку з пошуком ефективних засобів забезпечення реакції організму на стрес, пов'язаний з інфекційними захворюваннями, зокрема коронавірусною інфекцією (COVID-19) та численними мікрополітантами у довкіллі, у тому числі мікропластиком (MP) та фармацевтичними препаратами.

Zn захищає природні тканинні бар'єри в організмі, запобігає вторгненню патогенів, балансує функцію імунної та окисно-відновної систем, впливаючи на перебіг запальних процесів. Численні дослідження показали цінність добавок Zn, які запобігають проникненню вірусу в клітини шляхом посилення протівірусного імунітету, який реалізується через різні механізми, зокрема шляхом впливу на розподіл елемента між клітинними мішенями. Zn є асоційованим фактором для протеїнів з каталітичною та регуляторною активністю, зокрема факторів транскрипції, факторів реплікації, а його низький рівень призводить до дисфункції всіх імунних клітин. Проте багато аспектів механізму імуномодуляторної ролі Zn залишаються невирішеними (Prasad, 2009; Prasad and Bao, 2019; Таууїб et al., 2020; Lu et al., 2022).

Металотіонеїни (MT) були відкриті як низькомолекулярні багаті на цистеїн термостабільні протеїни, які мають властивість зв'язувати метали, зокрема іони кадмію у гіпотетично низькотоксичну форму (Dai et al., 2021). Однак у фізіологічних умовах ці універсальні у живому світі протеїни вирізняються серед близько 3000 відомих Zn-зв'язуючих протеїнів тим, що вони депонують Zn у клітинах та забезпечують його транспорт до інших молекулярних мішеней. MT, переважно, відомі як внутрішньоклітинні протеїни. Разом з тим, все більше доказів свідчить, що за деяких стресових впливів, зокрема запальних станів, вони можуть вивільнятися у позаклітинне середовище (Vignesh et al., 2016), проте механізм їх виходу з клітин та здатність функціонувати по-за клітинами невідомі. Тим не менш, їх ролі як біфункціональних індукцибельних редокс-активних молекул приділяється мало уваги. Зокрема, не з'ясовано особливості балансу між Zn-буферною функцією

та реакцією на окисний стрес, зумовлений запальними процесами, що потенційно може проявитись як імуномодуляторна дія (Isani and Carpenè, 2014; Krezel and Maret, 2017; Gnatyshyna et al., 2020a; Bozhkov et al., 2021).

У якості експериментальних моделей для вивчення ролі МТ у формуванні реакції організму на вплив чинників запальної/антизапальної дії ми обрали двостулкового молюска, відомого біоіндикатора стану водного середовища, та модель гострого артрити у вищих хребетних тварин. Двостулковий молюск *Dreissena polymorpha* (sp.) є інвазивним видом, який походить із Понто-Каспійського регіону і поширився по всій Європі через мережу водних шляхів у 18-20 століттях (Minchin et al., 2002). На сьогоднішній день цей вид є найбільш визнаним біоіндикатором забруднення прісноводних середовищ і, завдяки своїй високій здатності до фільтрації, одним із кращих моніторингових об'єктів у оцінці екотоксичності водойм (Garaud et al., 2015). Разом з тим, залишається невідомим біохімічне підґрунтя його унікальної пластичності та конкурентної здатності у нових умовах існування (Palos-Ladeiro and Geffard, 2018). Тому порівняння двох популяцій за здатністю до біохімічної реакції на вплив несприятливих чинників хімічного та екологічного характеру є перспективним для розуміння переваг цього інвазивного виду у новому середовищі. Зокрема, згідно концепції еко-експосоми (Scholz et al., 2022) та досвіду порівняльного дослідження резистентності популяцій у експерименті «стрес на стрес», біохімічні відповіді організму, у тому числі відповідь МТ, на пошкодуючі впливи середовища обумовлені станом сприйнятливості до нових впливів, що, очевидно, залежить від особливостей преадаптації організму (Bayliak and Abrat, 2020; Khoma et al., 2021).

Кофеїн та мікропластик (МР) є одними з найпоширеніших мікрополітантів у водному середовищі, безпосередньому впливу яких піддаються фільтруючі види-седиментатори (Cruz et al., 2016; Yang et al., 2020). Кофеїн визнаний найпоширенішою фармацевтично-активною сполукою у світі та однією з найбільш часто виявлених сполук у водному середовищі завдяки широкому використанню людиною у якості харчових продуктів, напоїв та ліків.

Ця сполука виявляє вплив на вроджену та адаптивну імунні відповіді. Він виступає імуносупресором запальних реакцій та проявляє інгібуючу дію на проліферацію, активацію та секрецію цитокінів лімфоцитами (Ritter et al., 2005; Kovács et al., 2021). Попри те, що низка досліджень вказує на антиоксидантні ефекти впливу кофеїну на ссавців (Azam et al., 2003), дослідження з двостулковими молюсками продемонстрували, що кофеїн може призводити до посилення ліпопероксидації (Cruz et al., 2016) і пошкодження ДНК (Aguirre-Martínez et al., 2015), що демонструє необхідність подальших досліджень дії кофеїну на водні організми.

МР належить до пріоритетних забруднювачів середовища. За даними Асамблеї ООН з навколишнього середовища (ЮНЕП) у 2017 році, щорічно в океани потрапляє 4,8-12,7 мільйонів метричних тонн пластику (Alfaro-Núñez et al., 2021). Окисний стрес та запальна реакція є найбільш вивченими впливами МР у водних видів (Yang et al., 2020). Попри власну потенційну токсичність, на особливу увагу заслуговує векторний потенціал МР для гідрофобних сполук, який сприяє їх проникненню в організм та біологічним відповідям (Sewwandi et al., 2022). Тому біологічна дія поєднання МР та кофеїну аргументовано може мати синергічний ефект.

Температура води є важливим фактором навколишнього середовища, який впливає на ріст і виживання (Wang et al., 2006) ектотермних водних організмів, у тому числі на аеробне дихання та, відповідно, на метаболізм та чутливість до токсичних речовин, хвороб і паразитів (de Souza et al., 2014). Сезонні екстремальні температури в мілководних прісноводних місцях існування є звичайним явищем, проте частота та діапазон екстремальних температур зростають через глобальну зміну клімату (Intergovernmental Panel for Global Climate Change (IPGCC), 2013). Вплив підвищених температур може впливати на адаптаційний потенціал ектотермних видів та здатності протистояти несприятливим впливам середовища (Martyniuk et al., 2023), тому для адекватної оцінки відповіді організму необхідно враховувати як поодинокі, так і поєднані впливи суміші стресорів.

Оскільки відомі дослідження, що вказують на вплив МТ на диференціацію та функції імунних клітин, зокрема, прозапальних цитокінів та Т-лімфоцитів, пов'язані з виходом цих протеїнів у позаклітинний матрикс, для обґрунтування їх імуносупресивної ролі при запаленні (Wu et al., 2013; Vignesh et al., 2016) доцільно дослідити функціонування МТ у моделі гострого гонартриту на зразках уражених синовіальних тканин.

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

Робота виконувалась у межах держбюджетної теми МОН України 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» та дослідницької програми РНС DNIPRO №46800RK спільно з Університетом Реймса Шампань-Арденни (URCA) (Франція).

Мета і завдання дослідження.

Мета роботи – дослідження ролі поліфункціональних цинк-депонувальних протеїнів металотіонеїнів у реакції організму на вплив стресорних чинників запальної/антизапальної дії на моделях філогенетично віддалених організмів.

Для досягнення мети було визначено наступні завдання:

1. Виділити металотіонеїни молюска виду *Dreissena polymorpha* аборигенної та інвазивної популяції та визначити вміст низькомолекулярних тіолів у тканинах за впливу на організм екологічно реальних концентрацій мікропластику, кофеїну, підвищеної температури (25 °С), та суміші мікропластику з кофеїном при температурі 18 °С та 25 °С.

2. Дослідити присутність металотіонеїнів у синовіальній тканині лабораторних щурів за експериментальної моделі гострого гонартриту та визначити вміст низькомолекулярних тіолів і їх роль у накопиченні цинку.

3. Охарактеризувати стан системи антиоксидантного захисту у молюсків *D. polymorpha* аборигенної та інвазивної популяції за впливу на

організм мікропластику, кофеїну, підвищеної температури (25 °C), та суміші мікропластику з кофеїном при температурі 18 °C та 25 °C.

4. Проаналізувати стан системи антиоксидантного захисту у лабораторних щурів за експериментальної моделі гострого гонартриту.

5. Оцінити цитотоксичність експериментальних чинників у створених моделях у молюсків *D.polymorpha* аборигенної та інвазивної популяції.

6. Визначити ознаки токсичності у щурів з індукованим гонартритом за активністю холінестерази у синовіальній тканині.

7. Здійснити інтегральну оцінку імунних відповідей організмів молюсків та щурів за впливу експериментальних чинників та довести їх взаємозв'язок із функціонуванням металотіонеїнів за умов впливів.

Об'єкт дослідження – металотіонеїни двостулкового молюска *D. polymorpha* та лабораторних щурів.

Предмет дослідження – рівень металювання металотіонеїнів, стан системи антиоксидантного захисту та показники токсичності у двостулкових молюсків *D. polymorpha* за впливу на організм імуномодулюючих чинників та лабораторних щурів за гонартриту.

Методи дослідження – методи препаративної біохімії, гістології (визначення статі та інфікування), морфометрії, мікроскопічні (аналіз вмісту мікропластику та кофеїну), гель-розподільча хроматографія (для виділення металотіонеїнів), електрофорез в поліакриламідному гелі (для виділення металотіонеїнів), спектрофотометричні (визначення вмісту металотіонеїнів, акумуляції металів, активності ензимів), методи математичної статистики.

Наукова новизна одержаних результатів.

У дисертаційній роботі вирішено проблему дослідження ролі та властивостей металотіонеїнів в умовах запальних станів. Проаналізовано властивості МТ у філогенетично віддалених видах організмів. Доведено універсальний взаємозв'язок між функціональною активністю МТ та показниками запалення, окисного стресу та токсичності за імунореактивного впливу на організм. Вперше виявлено популяційну відмінність функціонування

металотіонеїнів у аборигенних та інвазивних осіб двостулкового молюска *D. polymorpha* за однакових умов впливу та їх синергічну реакцію за комбінованого впливу. Вперше виявлено присутність металотіонеїнів у синовіальній тканині лабораторних щурів та зміну їх властивостей за експериментальної моделі гострого гонартриту та доведено, що металотіонеїни є протеїнами гострої фази запалення. Уперше співставлення двох характеристик МТ – за вмістом тіолових груп та цинк-депонувальної форми на двох експериментальних моделях довело, що ці протеїни беруть участь у редокс-реактивності організму на стресорні чинники, відмінні від їх типових індукторів – перехідних металів. Запропоновано механізм функціонування металотіонеїнів у позаклітинному середовищі в умовах гострого запально-деструктивного процесу. На моделі молюска доведено синергізм впливу кофеїну у сукупності з мікропластиком та його часткове нівелювання за теплової дії. Обґрунтовано біохімічні основи переваг у поширенні інвазивних організмів *D. polymorpha* на нові території.

Практичне значення одержаних результатів.

Проведене дослідження дає основу для розуміння дисбалансу цинку при патології гострого гонартриту та відбору біохімічних маркерів для оцінки адекватного фармакологічного лікування патологій колінних суглобів. Рекомендується оцінювати рівень металотіонеїнів та ступінь їх насичення цинком для оцінки ефективності реакції організму на запальний процес. Здатність мікропластику адсорбувати гідрофобні забруднювачі повинна враховуватися при дослідженні впливу його суміші з іншими ксенобіотиками. Отримані результати щодо міжпопуляційних відмінностей у відповідях двостулкового молюска при експериментальному впливі токсикантів повинні бути враховані при оцінці екотоксичності водного середовища.

Особистий внесок здобувача. Автором здійснювався самостійно підбір та аналіз літератури з обраної тематики, постановка та реалізація методик дослідження та опрацювання отриманих даних. Відбір молюсків здійснювався самостійно (Тернопіль) та учасниками експерименту з Херсонського

педагогічного університету (К. Орлова-Гудим). Відбір щурів, індукція запалення, евтаназія тварин та відбір колінних суглобів здійснювалися співробітниками віварію харківського Навчально-наукового інституту прикладної фармації. Проведення експерименту здійснювалось спільно з іншими співробітниками держбюджетної теми, які аналізували спектр показників, не включений у зміст дисертації. Внесок учасників експерименту відображений у публікаціях.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації були представлені на міжнародних та всеукраїнських наукових конференціях, зокрема на XVII, XVIII, XIX Міжнародних наукових конференціях студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2021, 2022, 2023), IV Міжнародній (XIV українській) науковій конференції студентів, аспірантів і молодих учених «Хімічні проблеми сьогодення – 2021» (Вінниця, 2021), Міжнародній дистанційній науково-практичній конференції «Modern approach of experimental and preclinical pharmacology» (Харків, 2021), Міжнародній науково-практичній конференції «Тернопільські біологічні читання – Ternopil bioscience» (Тернопіль, 2023).

Публікації. За результатами дисертаційного дослідження опубліковано 11 наукових праць, у тому числі 1 патент на корисну модель, 3 статті у фахових виданнях з сумарним імпаکت-фактором 8,6, $h=4$ згідно баз даних Scopus (Scopus Author ID: 57405185500), 7 – матеріали і тези доповідей на з'їздах і конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація викладена на 184 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 286 джерел (з них 285 латиною). Робота ілюстрована 33 рисунками та 8 таблицями.

РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Низькомолекулярні тіолові сполуки як антиоксиданти

Як відомо, кисень є потенційно токсичною молекулою, оскільки його відновлення під час життєво важливих біохімічних реакцій провокує утворення проміжних метаболічних продуктів, відомих як активні форми кисню (АФК), які викликають окисне пошкодження багатьох тканин (Kükürt et al., 2021). До АФК належать супероксид ($O_2^{\cdot-}$), гідроксил ($\cdot OH$), пероксил (RO_2^{\cdot}) і алкоксил ($RO\cdot$), а також озон (O_3), синглетний кисень (1O_2) та перекис водню (H_2O_2), які є нерадикалами, але легко можуть перетворюватися на радикали (Ozcan and Ogun, 2015). Їх електронна структура відіграє важливу роль у нормальному функціонуванні судин, підтримці регуляції їх діаметру, диференціації, проліферації, апоптозі, регуляції скорочення та контролі запальної відповіді шляхом стимуляції фактора росту, клітинній сигналізації та затримці старіння. При цьому, вільні радикали можуть відокремлювати інші електрони у молекул, пошкоджуючи оболонки клітин та запускаючи вільнорадикальну ланцюгову реакцію. Тому за нормальних умов існує рівновага між швидкістю утворення та виведення вільних радикалів, тобто окисний баланс. Якщо окисний баланс порушується на користь вільних радикалів, виникає окисний стрес, який є одним із факторів, що спричиняє пошкодження клітин і тканин (Ozcan and Ogun, 2015; Czerska et al., 2015).

За звичайних умов, $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 і гідроксильні ($\cdot OH$) радикали утворюються в мітохондріях як нормальні побічні продукти метаболізму в ланцюгу транспортування електронів у мітохондріях та системі цитохром Р450. Проте вони і інші види АФК можуть вироблятися клітинами імунної системи, такими як нейтрофіли та макрофаги, в результаті зараження організму бактеріями та грибками (Cenesiz, 2020). Зокрема, при респіраторному вибуху, який відбувається в активних фагоцитах для розщеплення бактерій та який відіграє важливу роль в імунній системі (Kükürt et al., 2021). Концепція хронічної або тривалої продукції АФК вважається центральною для прогресування запального захворювання (Griffith et al., 2009).

Доведено, що під час активації Т-клітин, презентації антигену та опосередкованої рецепторами клітинної сигналізації значно підвищуються клітинні рівні АФК (Tse et al., 2007). Багато аутоімунних захворювань і хронічних запальних захворювань пов'язані з підвищеним рівнем окисного стресу, проте досі неясно, чи окислювальний стрес є причиною чи наслідком цих станів. АФК при прогресуванні багатьох запальних захворювань діють і як вторинні месенджери у внутрішньоклітинній передачі сигналів, і як медіатор запалення. Перша функція виконується завдяки посттрансляційній модифікації редокс-чутливих залишків цистеїну у протеїні, які можуть піддаватися окисненню. Однак наявні чіткі докази того, що надмірне їх виробництво призводить до пошкодження клітин і тканин та може сприяти хронічному запаленню (Hussain et al., 2016).

Задля забезпечення окисно-відновного балансу існують захисні механізми, які представляються «системами антиоксидантного захисту» або «антиоксидантами». Вони здійснюють поглинання АФК та споріднених сполук, відновлення перекису водню та гідропероксидів, пригнічують окиснювальну модифікацію протеїнових молекул шляхом секвестрування іонів металів, контролюють рівні вільних радикалів, утворених у результаті нормального метаболізму або патологічних станів і запобігають або відновлюють пошкодження, які можуть бути спричинені цими радикалами. Одними з таких сполук є тіоли.

Тіольні антиоксиданти, котрі містять а сульфгідрильну (тіолову) групу (-SH), діють за допомогою різноманітних механізмів: (1) як компоненти загального тіол/дисульфідного окисно-відновного буфера, (2) як хелатори металів, (3) як гасники радикалів, (4) як субстрати для специфічних окисно-відновних реакцій (GSH) і (5) як відновники індивідуальних протеїнових дисульфатних зв'язків (тіоредоксин) (Ulrich and Jakob, 2019).

Модифікації тіолів. Широко відомо, що АФК функціонують як вторинні месенджери для внутрішньоклітинної передачі сигналів і модулюють окисно-відновний стан тіолу. SH-група цистеїну (Cys) завдяки хімічній реакційній

здатності може зазнавати широкий спектр модифікацій у відповідь на генерацію активних форм кисню/азоту/сірки (АФК/АФА/АФС), кожна з яких може надати молекулі, що містить цей залишок, іншу властивість або функцію. Було описано, що залишки Cys модифікуються 18 різними способами. Зокрема, АФА, такі як NO, сприяють нітрозилуванню протеїнових тіолів (R-SNO), а певні АФК (такі як H₂O₂) запускають сульфенілювання сполук (R-SOH). Додаткові реакції цих окиснених тіолових груп можуть призвести до тіолового глутатіонілування (R-SSG) або генерувати інші види дисульфідів (R-SSR) (Lorenzen et al., 2021). Зокрема, останнім часом підвищений рівень S-глутатіонілування протеїну пов'язують з розвитком захворювань. У деяких ситуаціях, пов'язаних з високим рівнем АФК, тіоли можуть зазнавати «гіперокиснення», утворюючи сульфінні (R-SO₂H) і сульфонові (R-SO₃) похідні (Рис. 1.1), що у більшості випадків, є необоротними модифікаціями та ведуть до деградації протеїну (Filipovic et al., 2018; Venhar, 2020). Тим не менш, багато форм окиснення тіолів є оборотними. Ймовірно, клітинні окисно-відновні рецептори початково не сприймають зміни окисно-відновного середовища при реакціях тіол-дисульфідного обміну, проте передбачають виявлення окиснювачів більш радикальними реакціями, наприклад, утворенням сульфенових кислот або S-нітрозильованих похідних. Зрозуміло, що ці модифікації представляють інтерес з точки зору окисно-відновної регуляції, а не тільки окисного стресу (Ghezzi, 2005; Dóka et al., 2020).

Модифікації тіолів є важливими у вродженій та адаптивній імунній відповіді. При запаленні багато позаклітинних і мембранних протеїнів зазнають дитіол-дисульфідного обміну, S-глутатіонілування та S-нітрозилування. Серед іншого, ці тіолові перемикачі необхідні для передачі сигналів запалення, регуляції експресії генів, вивільнення цитокінів, функції імуноглобулінів і варіації ізоформ, а також презентації антигену (Brücksken et al., 2022).

Саме амінокислота Cys є найбільш головним редокс-активним компонентом тіолів (Moran et al., 2001; Jensen et al., 2009). Модифікації Cys викликають конформаційні зміни всередині протеїну та індукують перемикання

між (більш) активною та менш активною/неактивною його структурами, регулюючи зміну активності та функції у відповідь на зміни навколишнього середовища (Sies and Jones, 2020). Зміни тіол-дисульфідного гомеостазу відіграють певну роль і у кількох патологічних станах, включаючи серцево-судинні захворювання (Kundi et al., 2015), хронічні захворювання нирок (Rodrigues et al., 2012) та цукровий діабет (Ates et al., 2016).

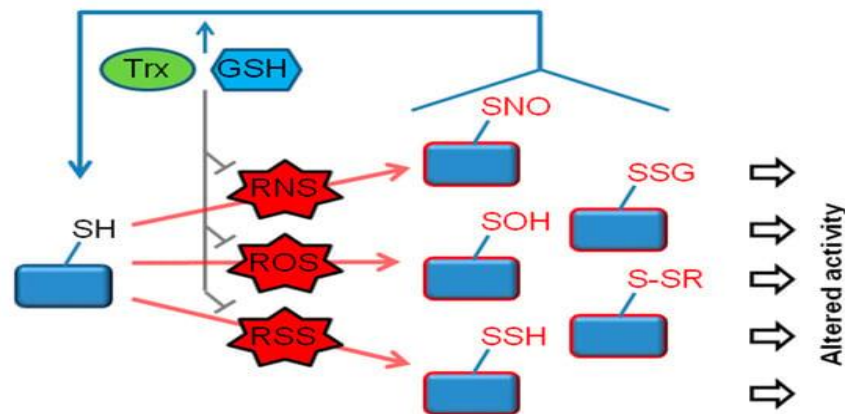


Рис. 1.1. Функціональні модифікації тіолового протеому (Benhar, 2020)

За звичайних обставин, внутрішньоклітинне біологічне середовище знаходиться переважно у відновному стані, тому тіольні групи сильно "буферизовані" проти окиснення високо відновним середовищем всередині клітини, що підтримується кількома низькомолекулярними сполуками і контролюється ензимами. Саме GSH є домінуючим тіолом серед цих низькомолекулярних речовин у більшості видів організмів, який підтримується у клітинах у відновленому стані завдяки коензимам НАДН і НАДФН (Jensen et al., 2009). Однак, в результаті окисного стресу змінюється загальний окисно-відновний баланс, що сприяє пригніченню захисних механізмів, виникненню окиснювальних пошкоджень та можливим глибоким біологічним змінам (Moran et al., 2001).

Загалом, є два цитозольні шляхи, які відповідають за відновлення протеїнових тіолів — система тіоредоксину і система GSH, які є поглиначами АФК та регуляторами окисно-відновних станів протеїну з використанням НАДФН як донора електронів (Jensen et al., 2009). Вони є одними з основних

засобів захисту від АФК і дослідження показують, що дві окисно-відновні системи контролюють цільові протеїни вибірково (Lu, 2013).

Повсюдно поширені ендogenous тіоли GSH і тіоредоксин регулюють окисно-відновний стан протеїнів двома механізмами: шляхом усунення АФК/АФА/АФС або каталізуючи відновлення окиснених/нітрозильованих/персульфідованих тіолів. Відповідно, баланс між окиснювачами та тіолами визначає величину та тривалість кожної з окисно-відновних модифікацій і, таким чином, подальші функціональні наслідки (Benhar, 2020).

GSH (γ -глутамілцистеїнілгліцин) є внутрішньоклітинною тіоловою сполукою з низькою молекулярною масою, яка, в основному, синтезується в печінці та міститься у всіх типах клітин. Будучи регулятором внутрішньоклітинного окисно-відновного гомеостазу, більша його частина зберігається в ядрі, ендоплазматичному ретикулумі та мітохондріях. В організмі існує дві форми: відновлена (GSH) і окиснена (GSSG). Всередині клітин цей тіол підтримується у формі GSH дією глутатіонредуктази та НАД(Ф)Н. Внутрішньоклітинна концентрація його знаходиться в діапазоні від 0,5-10 мМ, та при умовах окисного стресу, кількість GSH значно знижується. GSH може поглинати вільні радикали безпосередньо або діяти як кофактор для захисних ензимів (Moran et al., 2001; Noguchi et al., 2023).

Система глутатіону складається з глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази і GSH. Останній зберігає свою антиоксидантну здатність у відновленій формі. Глутатіонпероксидаза каталізує відновлення H_2O_2 до води, використовуючи GSH як косубстрат. Потім GSSG відновлюється до GSH за допомогою глутатіонредуктази з використанням НАДФН. Цикл між цими двома станами сприяє метаболізму вільних радикалів і токсичних речовин (Maher et al., 2008).

Як підтверджує досвід науково-дослідної лабораторії (НДЛ) порівняльної біохімії та молекулярної біології Тернопільського національного педагогічного університету, GSH є потужним антиоксидантом, який відіграє важливу роль у

регуляції внутрішньоклітинного окисно-відновного статусу і співвідношення GSH/GSSG (редокс-індекс) є інформативним показником редокс-статусу клітини і присутності окисного чи відновного стресу за впливу токсикантів чи підвищеної температури у ектотермних видів (Столяр та ін., 2016; Khoma et al., 2021; Khoma et al., 2022; Martyniuk et al., 2022b). Окрім антиоксидантного захисту, GSH виконує інші функції, наприклад, детоксикації фармацевтичних препаратів та ксенобіотиків, а також окисно-відновної регуляції сигнальної трансдукції, регуляції імунної відповіді, контролі клітинної проліферації та метаболізмі простагландинів (Moran et al., 2001). Внутрішньоклітинні рівні GSH і GSSG, а також співвідношення GSH/GSSG є ключовими параметрами, які регулюють перехід між основними клітинними процесами, включаючи проліферацію, диференціювання, старіння і запрограмовану смерть (Lv et al., 2019).

Виснаження GSH через аномальне виробництво АФК лежить в основі ряду патологічних станів, таких як надмірний апоптоз, дегенерація та хронічне запалення, а також трансформація пухлини і поширення вірусу (Aquilano et al., 2014). Дані, представлені Haddad (2011) доводять, що внутрішньоклітинне виснаження цього тіолу нерозривно пов'язане з підвищеними рівнями прозапальних цитокінів. Дослідження Santangelo (2003) показує, що пул GSH сильно змінюється під час запалення. Доведено, що GSH має важливе значення для регуляції життєвого циклу клітини і зменшення внутрішньоклітинного GSH сприяє хронічному запаленню.

Система тіоредоксину також є однією з центральних антиоксидантних систем у клітинах, яка каталізує потік електронів від НАДФ через тіоредуксинредуктазу до тіоредоксину. Вона складається з тіоредоксину, тіоредоксину-2, сімейства мітохондріальних тіоредоксинів, трансмембранного тіоредоксин-спорідненого протеїну та родину, специфічну для ендоплазматичного ретикулуму. Тіоредоксин з'єднується з пероксидазами, щоб поглинати перекис водню. Але також він діє як важливий регулятор реакції на окисний стрес через протеїн-протеїнову взаємодію (Lee et al., 2013).

Тіоредоксин може сприяти передачі сигналів апоптозу шляхом реверсування процесу нітрозилування або персульфідатації апоптотичних каспаз. Зокрема, опосередковане тіоредоксин-2 денітрозилування каспази-3 регулює апоптоз у лімфоцитах, клітинах меланоми і клітинах гіпокампу (Sun et al., 2021), а за деяких умов може відбуватися протилежний процес нітрозоперенесення – від тіоредоксину до прокаспази-3, що призводить до зниження апоптозу. Це підкреслює важливість окисно-відновного контролю тіолів у регулюванні неапоптозної функції каспази. Загалом, тіольні редокс-модифікації каспаз можуть позитивно або негативно модулювати апоптоз, некроптоз або піроптоз. Окиснювально-відновна регуляція постає як потенційно важливий механізм для перемикання між модальностями регульованої клітинної смерті, що може мати різні патофізіологічні ефекти, такі як сприяння або пригнічення запалення, оскільки окисно-відновний стрес і нерегульована загибель клітин широко пов'язані з імунною дисфункцією і різними дегенеративними захворюваннями (Benhar, 2020).

Таким чином, низькомолекулярні сполуки, що містять тіол, відіграють важливу роль у багатьох біохімічних і фармакологічних реакціях завдяки легкості, з якою вони окиснюються, і швидкості, з якою вони можуть регенеруватися. При цьому, основний пул низькомолекулярних тіолвмісних сполук у клітині становлять GSH та тіоредоксин, які є основними компонентами процесу захисту від токсичності повсякденних впливів ксенобіотичних сполук і оксидантів. GSH, окрім антиоксидантного захисту, виконує й ряд інших функцій, наприклад, детоксикація фармацевтичних препаратів та ксенобіотиків, регуляція імунної відповіді, контроль клітинної проліферації та метаболізм простагландинів.

1.2. Металотіонеїни та їх роль при запальних процесах

1.2.1. Структура та властивості металотіонеїнів

Металотіонеїн (МТ) – це низькомолекулярний (6–20 кДа) протеїн з високим вмістом цистеїну (до ~30%), який є термостабільним та зустрічається у

всіх еукаріотів (Dai et al., 2021). Особливістю МТ є те, що первина структура не містить ароматичних амінокислот, а залишки цистеїну розташовуються в характерні мотиви (Cys-x-Cys, Cys-xx-Cys, де x – відмінна від цистеїну амінокислота), утворюючи домени (α - і β), що зв'язують метал. Відповідно до цих мотивів, МТ були розділені на три класи. Клас I включає МТ двостулкових молюсків, ракоподібних і ссавців та містить 60–73 амінокислотних залишки (23 цистеїни) з 9 мотивами Cys-X-Cys без ароматичного залишку. Клас II наявний у нематод, грибів, комах і морських їжаків, а клас III сімейства МТ з'являється в дріжджах і рослинах. Розташування цистеїнів має вирішальне значення, оскільки ці залишки відповідають за утворення двох доменів (α і β) у молекулі та утворюють метал-тіолатні кластери. α - і β -домени розділені ділянкою, яку часто називають спейсером або лінкером та яка не містить цистеїну. Атоми сірки цистеїну тетраедрично координують катіон металу в обох вищезгаданих кластерах (Babula et al., 2012).

Як правило, у ссавців представлені чотири основні ізоформи МТ: МТ-1, МТ-2 (також відомий як МТ-2А), МТ-3 і МТ-4 (Isani and Carpenè, 2014; Dai et al., 2021). МТ-1 має 61 амінокислоту, зокрема, наявні сім пар Ser-Cys і асоціація цистеїнів з основними амінокислотами в чотирьох парах Cys-Lys, трьох Lys-Cys і одній парі Cys-Arg. Протеїн МТ-1 відрізняється від МТ-2 різницею зарядів, завдяки наявності амінокислоти Asp(D) у МТ-2 (Krežel and Maret, 2021). МТ-1 і МТ-2 дуже легко індукуються важкими металами, глюкокортикоїдами та запальним стресом, різними хімічними речовинами. Вони зустрічаються у різних видів безхребетних та хребетних тварин, а також і у людини (Inoue et al., 2009). Хоча, МТ-2 має до 90 % ідентичності з МТ-1, однак він має власні унікальні функції. Наприклад, згідно дослідження Comes et al. (2019), щоденна ін'єкція МТ-2, але не МТ-1, значно полегшує втрату ваги та захищає від демієлінізації в мишачій моделі аутоімунного енцефаломієліту. У МТ-3 наявна характерна вставка семи додаткових амінокислот (шість в α -домен і додатковий треонін у β -домен), та вперше він був відкритий як інгібітор росту нейронів, який пригнічує ріст нейрональних клітин. МТ-3 експресується не

тільки в нейронах, як вважалось раніше, але також у серці, сітківці, нирках, молочних залозах, передміхуровій залозі, сечовому міхурі, репродуктивних органах і шкірі (Inoue et al., 2009; Dai et al., 2021). Хоча МТ-3 є першим МТ, знайденим завдяки своїй біологічній активності, молекулярна основа його функціонування залишається невідомою. Проте, було виявлено, що він не індукується іонами металів або іншими поширеними індукторами МТ, але його можна індукувати гіпоксією (Krężel and Maret, 2021). МТ-4 були знайдені у мозку та в диференційованих багатосарових плоских епітеліальних клітинах (Inoue et al., 2009; Rahayu and Prihatini, 2020). При цьому, МТ-1 є найбільш вивченою ізоформою МТ, оскільки він експресується майже у всіх органах для підтримки гомеостазу (Vignesh and Deere, 2017; Dai et al., 2021).

МТ молюсків має дві ізоформи – МТ-10 і МТ-20, які різняться за молекулярною масою та містять 72 і 71 амінокислоту (21 і 23 цистеїни відповідно). Додатковий цистеїн, який наявний у МТ-20, може брати участь у міжмолекулярному містку між двома мономерними субодиницями, причому МТ-10 є більш стабільним. МТ-10 експресується на фізіологічному рівні, тоді як МТ-20 присутній у дуже низьких концентраціях за нормальних умов. Було виявлено, що ген МТ-10 давав швидку відповідь після експозиції Zn, тоді як МТ-20 був підвищений за впливу Cd (Nam and Kim, 2017).

Різні ізоформи МТ, ймовірно, відіграють різні фізіологічні ролі. Наприклад, первинна роль МТ-2 – це підтримка гомеостазу іонів Zn та Cu, в той час як МТ-1 має функцію детоксикації завдяки своїй вищій спорідненості до токсичних важких металів, таких як кадмій. Проте участь МТ у процесах детоксикації різниться в навколишньому середовищі та між зоологічними групами (Amiard et al., 2006).

Тіонеїни не представляють вторинних структур та набувають свою специфічну тривимірну структуру після зв'язування іонів металу, що забезпечує утворення триядерних та чотирядерних тіюлатних кластерів з іонами двовалентних металів. Кожен іон металу секвеструється чотирма залишками цистеїнів з утворенням тетраедра, при цьому, іони одновалентних і

двовалентних металів МТ можуть зв'язуватися з різною стехіометрією. Ці комплекси характеризуються високою термодинамічною стабільністю, тоді як метали в кластері перебувають у безперервному перерозподілі іонів, чому сприяє нежорсткість структури МТ (Isani and Carpenè, 2014).

МТ локалізуються в цитоплазмі та деяких органелах, переважно в мітохондріях, де їх присутність чутливо та строго регулюється окисним станом, індукованим мітохондріальним диханням (Babula et al., 2012). Також було виявлено, що МТ є органоспецифічними, особливо в печінці та нирках. У молюсків і ракоподібних, як правило, МТ знаходяться в гепатопанкреасі і зябрах, причому в гепатопанкреасі концентрація МТ є значно вищою (Rahayu and Prihatini, 2020).

Отже, структурна організація МТ визначає його як сильного хелатуючого агента та є ключовим фактором, який регулює доступність $Zn(II)$ для різних біологічних процесів як у безхребетних, так і у вищих хребетних тварин.

1.2.2. Функціонування металотіонеїнів за фізіологічних умов

На сьогоднішній день важливість функцій МТ є незаперечною, проте чи мають вони надлишкові чи розбіжні функції як за фізіологічних, так і за патологічних умов, до кінця не з'ясовано (Inoue et al., 2009).

Загалом, МТ індукуються внаслідок різноманітних ініціаторів, включаючи двовалентні важкі метали, ендотоксини, інтерферон, глюкокортикоїди, фактор некрозу пухлини- α , інтерлейкін-1 (IL-1) та IL-6, АФК, АФА та токсичні органічні сполуки (Lynes et al., 2006; Fujie et al., 2020; Tamura and Fuangtharnthip, 2021). Передбачувані функції МТ включають внутрішньоклітинний метаболізм і/або зберігання металів, донорство металів для цільових апометалопротеїнів (особливо протеїнів і ензимів цинкового пальця), детоксикацію металів, полегшення отруєння важкими металами і захист від окиснювачів і електрофілів (Inoue et al., 2009; Dai et al., 2021). Крім того, МТ впливає на низку клітинних процесів, таких як експресія генів, апоптоз, проліферація та диференціація (Inoue et al., 2009). Посилений синтез

МТ спостерігається у швидко проліферуючих тканинах, що означає їх вирішальну роль у нормальному та неопластичному розвитку клітин (Lynes et al., 2006). Інтеграція знань щодо регуляції МТ на запропоновані функції є необхідною для з'ясування того, як МТ впливає на клітинні процеси.

За фізіологічних умов МТ модулює зв'язування та обмін/транспортування важких металів, таких як Zn, Cd або Cu і бере участь у цитозахисті від їх токсичності (Inoue et al., 2009). При цьому, розподіл металів серед термостабільних протеїнів та інших компонентів у травній залозі, зябрах та мантиї двостулкових молюсків залежить від умов навколишнього середовища та є тканинспецифічним (Stoliar et al., 2004). МТ можуть бути індуковані металами Cu і Zn, Cd, Ag і Hg як у хребетних, так і у безхребетних, проте їхня індукція різниться (Won et al., 2016; Melvin et al., 2021). Така варіація є внутрішньовидовою та міжвидовою, і зумовлена різноманітністю екологічних та фізіологічних причин. Шлях індукції МТ металами було встановлено з відкриттям транскрипційного фактора-1, який зв'язує елемент відповіді на метал (MTF-1). MTF-1 має шість цинкових пальців, які, як вважають, беруть участь у сприйнятті надлишку Zn(II) в клітинах (Krežel and Maret, 2021). Для реалізації функції МТ, MTF-1 регулює експресію МТ, щоб підтримувати точність розміру внутрішньоклітинного пулу вільного Zn. МТ мобілізують Zn у ядро, мітохондрії, апарат Гольджі, лізосоми, ендоплазматичний ретикулум, цитозоль і, можливо, цинкосоми (Lee et al., 2010; Vignesh et al., 2013).

Індукція МТ корелює з концентрацією важких металів у навколишньому середовищі, що може вказувати на їх кількість у цьому середовищі, реакцію на стрес і здатність організмів детоксикувати важкі метали. Таким чином, МТ розглядаються як індикатори забруднення металами у багатьох організмах із різних зоологічних груп та як маркери біосередовища для прогнозування забруднення важкими металами на основі рівня їх експресії (Melvin et al., 2021).

Дані досліджень показують, що МТ регулює внутрішньоклітинну здатність як до есенціальних металів (Cu та Zn), так і до неесенціальних (Hg і Pb). МТ може передавати Cu та Zn відповідним рецепторам (наприклад,

металоензимам і факторам транскрипції), контролюючи метаболічну активність через дуже специфічні молекулярні взаємодії (Jenny et al., 2004). Досвід НДЛ порівняльної біохімії та молекулярної біології Тернопільського національного педагогічного університету свідчить, що зв'язування есенціального елемента Zn МТ та порівняння показників загального протеїну МТ та Zn-зв'язаної його форми є інформативною та цінною характеристикою при оцінці впливу різних токсикантів на водні організми, та яка, проте, дуже рідко визначається у межах закордонних біохімічних шкіл, і не визначається в межах українських (Столяр та ін., 2016; Khoma et al., 2020).

Зв'язування металу залежить від спорідненості металу та його доступності, оскільки іони «м'яких» металів віддають перевагу зв'язуванню з «м'якими» основами (відповідно до концепції «твердих і м'яких» кислот і основ), такими як донори сірки. Іони «найм'якших» металів, такі як Hg(II) і Cu(I), мають найвищу спорідненість до МТ, Cd(II) має набагато «м'якший» характер, ніж Zn(II), і тому утворює більш стабільні комплекси. Zn(II) має помірно «м'який» характер, тому іони металів Cu(I) і Cd(II), мають більш високу тенденцію до утворення тіолатних кластерів (Kreżel and Maret, 2021).

Обмін Zn(II) повинен бути на порядок повільнішим, порівняно з іншими іонами (Kreżel and Maret, 2021). Вважалося, що константа зв'язування Zn тіонеїном є найвищою ($>3 \times 10^{13}/M$) у біологічних системах, але нещодавно було показано, що МТ послідовно зв'язують іони Zn із градуйованою афінністю та існують у метаморфічних станах (Kreżel and Maret, 2017).

Варто зазначити, що Zn(II) є інертним відносно окисно-відновного стану в біологічному середовищі, так як не вважається іоном перехідного металу згідно з рекомендацією IUPAC, у той час як іони перехідних металів, такі як Fe(II)/Fe(III) і Cu(I)/Cu(II), беруть безпосередню участь в окисно-відновних реакціях. Враховуючи різну спорідненість і стереохімічні переваги Zn(II) і Cu(I), ймовірно, що часткова зайнятість одним іоном металу вплине на спорідненість іншого. Тіольні групи цистеїну можуть зв'язувати 7 моль іонів

двовалентних металів на 1 моль МТ, а молярне співвідношення іонів одновалентних металів (Cu, Ag) становить дванадцять (Krężel and Maret, 2021).

У кількох видів риб було досліджено, що від 30 до 50 % цитозольного Zn в печінці зв'язано з МТ (Melvin, 2021). За впливу низьких концентрацій металів МТ їх зв'язує, оскільки вони необхідні для підтримки гомеостазу в клітині, тоді, як за впливу високих рівнів концентрація МТ корелює з концентрацією металів у тканинах, підданих впливу (Gagné et al., 2007).

МТ-1 і МТ-2 секвеструють Zn і легко вивільняють лише 1 іон металу, а метал-тіолатний кластер МТ-3 приймає «відкриту конформацію» для легкого вивільнення Zn (Ding et al., 2010). Таким чином, МТ-1/МТ-2 і МТ-3 мають спільну основу в регуляції Zn, але також виконують дискретні функції у масштабуванні внутрішньоклітинного пулу Zn. Літературних даних про функції МТ-4 відомо недостатньо. Координація Zn за допомогою МТ-4 призводить до слабшого згортання протеїну порівняно з МТ-1; було припущено, що ця ізоформа може функціонувати як Cu-тіонеїн (Tio et al., 2004). Проте важливо визнати, що біологія МТ є дуже складною і на їх поведінку в різних біохімічних і клітинних середовищах, ймовірно, сильно впливає природа подразника, склад металу та окисно-відновне середовище (Vignesh and Deere, 2017).

МТ як антиоксиданти. Антиоксидантна функція МТ залежить від металевого їх навантаження і дисоційованих іонів Zn(II), які є потужними ефекторами функції протеїну та мають власний непрямий вплив на окисно-відновну регуляцію (Maret, 2019). Тобто, залежно від концентрації дисоційованих іонів Zn(II), вони можуть виконувати або антиоксидантні, або прооксидантні функції в клітині (Krężel and Maret, 2021).

МТ здатен поглинати широкий спектр АФК, включаючи супероксид, перекис водню, гідроксильні радикали, радикали реактивних видів азоту та радикали оксиду азоту (Inoue et al., 2009; Juárez-Rebollar et al., 2017). Тіолатні ліганди в залишках цистеїну можуть окиснюватися клітинними окисниками, і під час цього процесу Zn вивільняється, впливаючи на рівень перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ). На особливу увагу в окисно-відновних циклах МТ

заслугує біологічна редокс-пара GSH/GSSG, що взаємодіє з МТ та іонами металів. Зміна співвідношення GSH/GSSG впливає на дисоціацію Zn(II) від МТ і перехід Zn(II) на апоформи протеїнів Zn. GSSG вивільняє Zn(II) з МТ, тоді як GSH модулює перенесення (Juárez-Rebollar et al., 2017).

Зокрема, рівні МТ у печінці гризунів підвищувалися після ін'єкції сполук, які призводять до утворення вільних радикалів. Ін'єкція нітрилотриацетату заліза, який виробляє АФК, індукує рівень транскрипції МТ у печінці та нирках (Min et al., 2005). Багато агентів, які індукують окиснювальний стрес, такі як хлороформ, скипидар, паракват, також можуть індукувати МТ *in vitro* та *in vivo*. У молюсків *Mytilus galloprovincialis* експозиція Cd²⁺ у концентрації <40 мкг·л⁻¹ виявляла всі ознаки окисного стресу та одночасне помітне збільшення виробництва МТ, що свідчить про участь МТ у захисті від окисного пошкодження. І навпаки, клітини ссавців, які експресують надлишок МТ, виявляються стійкими до токсичного впливу оксиду азоту і багатьох електрофільних протипухлинних агентів (Inoue et al., 2009), які здатні реагувати з цистеїнами МТ.

Було показано, що здатність МТ захоплювати гідроксильні радикали у триста разів більша, ніж у GSH, найпоширенішого антиоксиданту в цитозолі (Sato and Kondoh, 2002). МТ також може діяти як антиоксидант і у позаклітинних середовищах (Lynes et al., 2006).

Саме внутрішньоклітинний пул МТ може діяти як резервуар необхідних важких металів, поглинач АФК/АФА, антагоніст токсичних металів і органічних молекул і як регулятор активності фактора транскрипції. Відомо кілька повідомлень про наявність МТ у тканинах позаклітинного простору, секретах і виділеннях, зокрема, МТ виявляли в сироватці крові при стресі. Проте неясно, чи вони активно секретуються чи пасивно вивільняються в результаті порушення цілісності мембрани і поки що немає переконливих даних, які змогли б запропонувати конкретний механізм виходу МТ з клітин, при цьому, механізм може відрізнятись в залежності від індивідуальних обставин стресу, розвитку та інших умов (Lynes et al., 2006).

Таким чином, МТ відіграють важливу роль у гомеостазі металів і захисті від їх токсичності, пошкодження ДНК і окисного стресу. Різноманітність їх функцій вказує на велике значення для нормального функціонування організму в різних умовах середовища.

1.2.3. Металотіонеїни як імунорегулятори. Роль металотіонеїнів при запальних процесах

Як відомо, запалення – це захисна імунна відповідь організму, направлена проти чужорідних патогенів. У хребетних є дві взаємодоповнюючі імунні системи, які розпізнають і усувають патогени: вроджена та адаптивна (Clark and Kupper, 2005). Перша розпізнає широкий спектр хвороботворних вірусів та бактерій за допомогою спеціальних рецепторів, які експресуються різними імунними клітинами, включаючи макрофаги, моноцити, дендритні клітини і нейтрофіли (Takeuchi and Akira, 2010). Останні при зустрічі з патогенами запускають гостру запальну реакцію, що забезпечує секрецію цитокінів і хемокінів. Однак, якщо захисна функція вродженої імунної системи стає обмеженою, вона залучає адаптивну відповідь, активуючи специфічні Т- і В-клітини для очищення патогенів. Якщо цей процес тривалий або неефективний, запалення прогресує до хронічного стану, з яким пов'язані багато аутоімунних захворювань (Clark and Kupper, 2005).

Імунна система безхребетних організмів, зокрема двостулкових молюсків, представляється лише вродженим імунітетом, який опирається на активні імунні клітини (гемоцити) у взаємодії з відповідними гуморальними факторами, такими як лектини, антимікробні пептиди, система комплементу та профенолоксидази (Younes, 2019).

Інформація про те, що МТ індукуються такими гормонами, як інтерлейкін і глюкокортикоїди, рівні яких підвищуються під час інфекції (Vignesh et al., 2016), дало змогу спрогнозувати, що МТ можуть брати участь у захисних механізмах.

Досліджено, що МТ-1 впливає на диференціацію та функцію імунних клітин різними шляхами. Однією з можливих причин такого включення може бути потенційна функція МТ як поглиначка вільних радикалів, що продукуються внаслідок відповіді організму на інфекцію. Проте є й інші можливі методи впливу. *Рис. 1.2* схематично узагальнює основні шляхи, які пояснюють участь МТ у запаленні. Зокрема, він експресується на клітинній мембрані дендритних клітин, що виробляють ІЛ-10, який опосередковано може сприяти проліферації біомаркера FoxP3 через Т-клітини, що сприяє пригніченню імунної відповіді. При цьому, регуляція МТ-1 під час цих процесів сильно залежить від сигналізації Zn^{2+} (Dai et al., 2021). Інші шляхи впливу МТ-1 на диференціацію та функцію імунних клітин можуть опосередковуватися через макрофаги, Т-клітини або базофіли.

МТ і макрофаги. Макрофаги, які є одними з перших клітин, що зіштовхуються з грамнегативними бактеріями, синтезують МТ в умовах стресу і можуть накопичувати Zn. Такий перерозподіл Zn може бути залучений у підвищення стійкості до інфекції (Dunn et al., 1987). Згідно дослідження Vignesh et al. (2016), макрофаги виділяли велику кількість прозапальних цитокінів (фактор некрозу пухлини (TNF- α), ІЛ- β та ІЛ-6), які відповідальні за запальне пошкодження та захист від інфекції, після введення бактеріального ендотоксину-ліпополісахариду, тоді як макрофаги з дефіцитом МТ-1 і МТ-2 пригнічували експресію цих цитокінів, що безпосередньо пов'язано з регуляцією активності ядерного фактора каппа В (NF- κ B). Крім того, МТ-1 і МТ-2 були суттєво підвищені в гранулоцитарно-макрофагальних колонієстимулюючих факторах (GM-CSF) макрофагів, залежних від STAT3 і STAT5, під час інфікування *Histoplasma capsulatum*, що покращує антимікробну активність шляхом інгібування лабільного Zn^{2+} (*Рис. 1.2*). Як показує дослідження Lynes et al. (2006), МТ не змінюють фагоцитоз макрофагами, але посилюють продукування супероксид-аніону активованими макрофагами та кандидоцидними активностями цих клітин. Крім того, МТ також придушував здатність макрофагів стимулювати проліферацію Т-клітин (Lynes et al., 2006).

Загалом, ці висновки підтверджують важливість дії МТ на макрофаги для захисту від інфекції та запалення через залучення багатьох сигнальних шляхів (Dai et al., 2021).

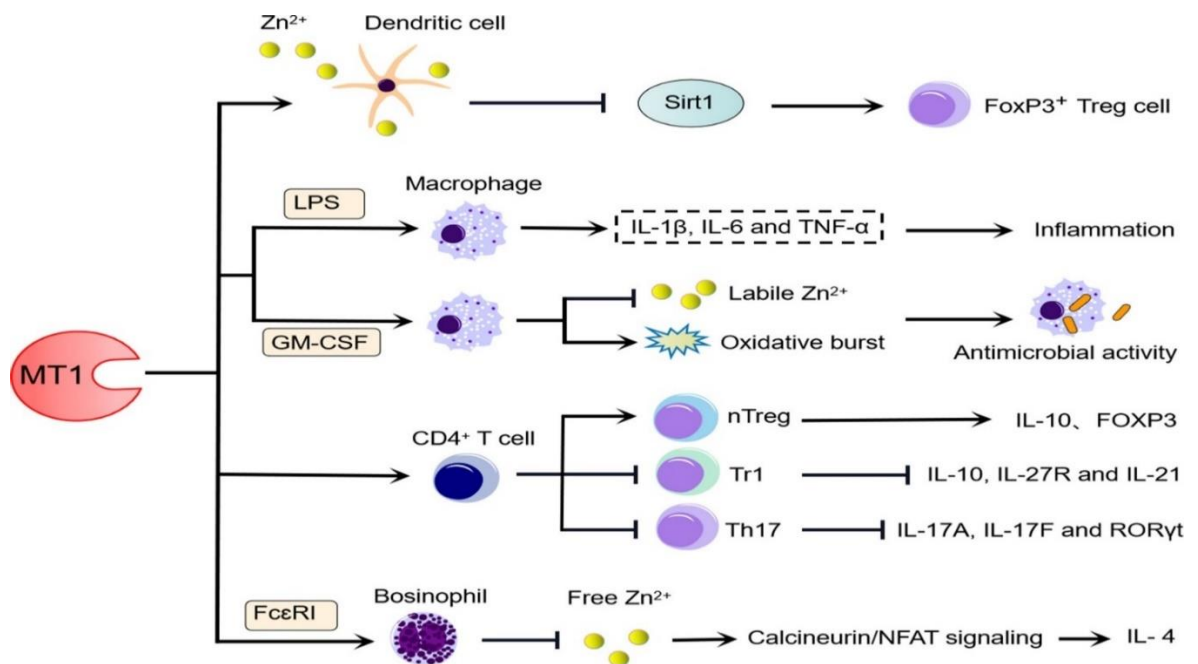


Рис. 1.2. Шляхи впливу МТ-1 на диференціацію та функцію імунних клітин (Dai et al., 2021)

МТ і Т-клітини. Результати досліджень Dai et al. (2021) демонструють, що МТ-1 може регулювати програми диференціації Т-клітин за допомогою різноманітних потенційних механізмів (Рис. 1.3). Як відомо, клас регуляторних Т-клітин типу I (Tr1) пригнічують запалення тканин при аутоімунитеті та регулюють реакцію «трансплантат проти хазяїна». Tr1 продукують IL-10 у відповідь на IL-27 (Roncarolo et al., 2006), тоді як IL-27 може індукувати експресію МТ-1 в Tr1-клітинах миші та людини. Таким чином, МТ негативно регулюють диференціювання клітин Tr1.

Дослідження Canrolat and Lynes (2001) довело, що позаклітинний МТ вивільняється під час нормального імунного завдання, яке стосується пом'якшення інтенсивності гуморальної реакції. При цьому, пригнічення гуморальної відповіді *in vivo* можна заблокувати моноклональним анти-МТ антитілом, і за відсутності екзогенного МТ, те саме антитіло підсилює гуморальну відповідь. Цей висновок підтверджується спостереженням

виявлених рівнів поверхневого МТ на лейкоцитах мишей, імунізованих у присутності ад'юванту (Lynes et al., 2006).

Загалом, доступність тіолових груп на МТ має вирішальне значення для стимулювання лімфопроліферативної відповіді. Швидка проліферація Т-клітин супроводжується спалахом супероксиду, тоді як промотор МТ має елемент антиоксидантної відповіді, який запускає експресію МТ у відповідь на АФК та повертає до контролю внутрішньоклітинне окисно-відновне середовище (Jackson et al., 2004). Такий механізм може працювати для захисту Т-клітин від окисного руйнування внутрішньоклітинних процесів і покращення життєздатності Т-клітин (Vignesh and Deere, 2017).

Цікаво, що в той час як арс-МТ, Zn-МТ і Cd-МТ порівнянно запускають проліферацію Т-клітин, додавання Cu-МТ пригнічує цю відповідь, тобто, МТ надають різні ефекти залежно від металу, зв'язаного з тіонеїном (Vignesh and Deere, 2017).

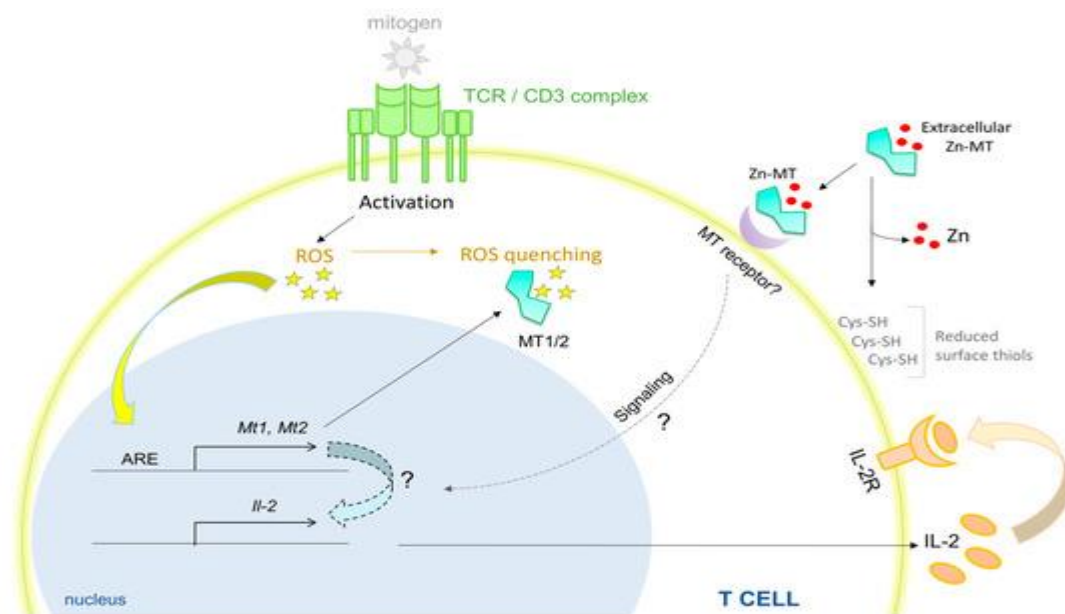


Рис. 1.3. МТ сприяють виживанню та гіперпроліферації Т-клітин (Vignesh and Deere, 2017).

МТ і базафіли. Недавні дослідження продемонстрували значну імунорегуляторну функцію МТ-1 у базафілах. Як було продемонстровано, активація або базафілів кісткового мозку, або первинних базафілів у відповідь

на стимуляцію високоафінного рецептора IgE (FcεRI) на поверхні клітини може ефективно індукувати експресію MT-1. Підсилювальна роль MT-1 у базофілах полягає у підтримці внутрішньоклітинних рівнів Zn для регулювання активності кальциневрину та ядерного фактора сигналізації активованих T-клітин (*Рис. 1.2*) (Ugajin et al., 2015). Ці результати вказують на те, що MT-1 може бути цінною терапевтичною мішенню для опосередкованих базофілами імунних відповідей і алергічного запалення.

MT і Zn при різних видах запальних реакцій. Експресія MT, асоційована з лімфатичними вузлами, стає прогностичним маркером у діагностиці захворювань, особливо у пацієнтів з пухлинами. Наприклад, MT демонструють значне підвищення в біопсіях лімфатичних вузлів, отриманих у пацієнтів з раком молочної залози та меланою. Втім, це можна пояснити участю MT у регуляції метаболізу Zn, проліферативних, апоптотичних та окиснювальних реакціях у макрофагах, дендритних клітинах, T-клітинах та природних кіллерів, які входять і виходять з лімфатичних вузлів (Vignesh and Deere, 2017).

У мишачому тимусі, первинному лімфоїдному органі, експресія MT досягає максимуму перед зростанням тимуса і слабшає під час інволюції тимуса. Ці зміни відповідають впливу Zn на масу цього органа, оскільки дефіцит елемента сприяє інволюції тимуса під час старіння (Moschegiani et al., 2006). Експресія MT в епітеліальних клітинах тимуса, котрі виділяють Zn-залежний гормон тимулін, корелює з експресією цього гормону у людей, що можна пояснити доставкою MT Zn до тимуліну, функція якого критично залежить від наявності цього іона. Таким чином, аномальна регуляція MT може впливати на процеси, контрольовані секрецією тимуліну, такі як вибір T-клітин, диференціація та функція лімфоцитів (Vignesh and Deere, 2017).

Результати досліджень Ma et al. (2022) продемонстрували взаємозв'язок між індукцією MT та запальною реакцією на прикладі анкілозуючого спондиліту, що є типом спондилоартриту. Рівень MT-1 у сироватці позитивно корелював з активністю захворювання. Важливо, що MT-1 може бути індукований прозапальними цитокінами TNF-α та IL-6, тоді як пов'язані з

анкілозуючим спондилітом прозапальні цитокіни TNF- α , IL-6 та IL-17 пригнічуються MT-1 при імунозапальних захворюваннях. Під час активної стадії запалення провокує респіраторний спалах з утворенням великої кількості супероксиду; окисний стрес посилює запальну реакцію та вивільняє Zn²⁺ із пулу MT-зв'язаного Zn в клітинах. Рівень MT-1 можна різко підвищити шляхом прямого зв'язування перекису водню (H₂O₂) з реагуючим на антиоксиданти елементом промотору гена MT-1, тоді як Zn²⁺ посилює виробництво MT-1 через активацію металом. Таким чином, високий рівень MT-1 є результатом організації складної взаємодії між прозапальними цитокінами, АФК та іонами Zn, у якій ці елементи утворюють позитивну петлю зворотного зв'язку для ефективного підвищення рівня MT-1. Індукований АФК та важкими металами MT-1, у свою чергу, пригнічує запалення та відновлює імунний гомеостаз, послаблюючи апоптоз шляхом інгібування активності каскаду при неінфекційних запальних захворюваннях (Inoue et al., 2009; Ruttkay-Nedecký, 2013). Таким чином, експресія MT-1 відіграє роль імунного супресора для опосередкування запалення і розвитку патогенів через антиоксидантний стрес (Ma et al., 2022).

Нещодавно повідомлялося, що MT-2 відіграє важливу роль у запальних захворюваннях дихальної та нервової систем і раку, що свідчить про те, що ця ізоформа є новою терапевтичною мішенню. Фармакологічна індукція експресії MT-2 захищає від запальних захворювань, тоді як знижений рівень MT-2 може бути біомаркером для таких захворювань, як астма (Wang et al., 2023).

У центральній нервовій системі ці протеїни вивільняються астроцитами і пов'язані з нейропротекцією. Використовуючи метод штучної трансдукції, було встановлено, що MT-1 відіграє нейропротекторну роль при хворобі Паркінсона шляхом підвищення експресії тирозингідроксилази, зміни мітохондріальної активності та зменшення продукції АФК (Kang et al., 2018).

Рівні експресії MT-1 і MT-2 були значно підвищені при ураженнях головного мозку пацієнтів з розсіяним склерозом. При цьому, тканини з неактивними ураженнями мали дещо вищу експресію MT, ніж з активними, що

вказує на те, що МТ може бути залучений до ремісії цього захворювання (Penkowa et al., 2003).

Отже, беручи до уваги накопичений об'єм інформації, можемо підсумувати різноманітні шляхи впливу МТ при запаленні, які реалізуються як через виконання функцій скавенджера вільних радикалів, буферизацію есенціального імунореактивного цинку, так і через безпосередні зв'язки з вродженою та адаптивною ланками імунної відповіді (Рис. 1.4).

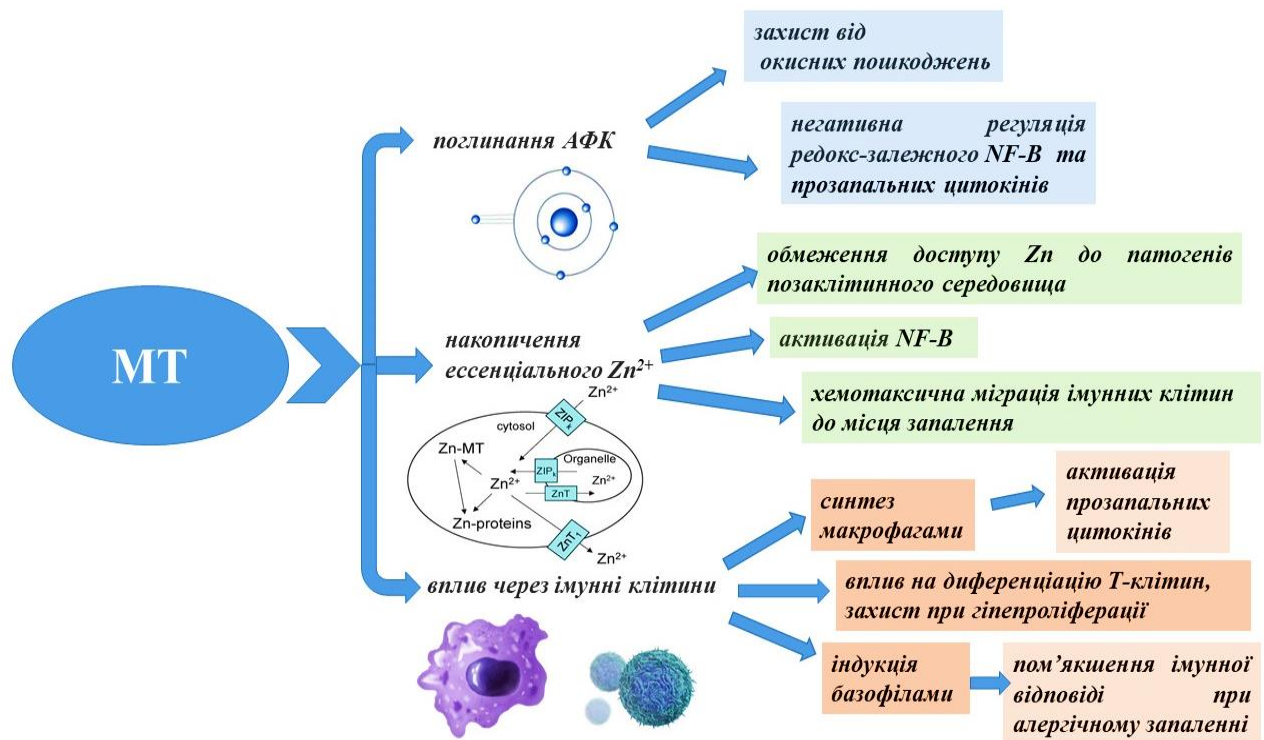


Рис. 1.4. Різноманітність відповідей металотіонеїнів при запаленні

Таким чином, можемо припустити, що продукція МТ є швидкою імунною відповіддю на запалення та є значимою при гострій його формі. При цьому, ці протеїни мають різноманітні імунологічні функції. Тим не менш, необхідні подальші дослідження для з'ясування молекулярних механізмів дії МТ для потенційної розробки терапевтичних засобів.

1.3. Імуноактивні ксенобіотики водного середовища. Кофеїн та мікропластик

Внаслідок значного споживання їжі, напоїв і ліків, що містять кофеїн, ця речовина вважається найбільш поширеним фармацевтично-активним

забруднювачем у всьому світі та є індикатором антропогенного забруднення водойм фармацевтично-активними сполуками (ФАС) (Li et al., 2020).

Кофеїн (1,3,7-триметилксантин) є природним алкалоїдом, який діє як потужний стимулятор центральної нервової системи. Його хімічна формула $C_8H_{10}N_4O_2$ (Asgar et al., 2018), структурна формула представлена на *Рис.1.5*. Кофеїн природним чином міститься приблизно в 60 видах рослин (Moore et al., 2008). Він є конкурентним антагоністом аденозинових рецепторів та дозволяє зменшити втому, підвищити концентрацію, пильність і фізичну витривалість, а останні дослідження продемонстрували його внесок у втрату ваги (Nesckman et al., 2010).

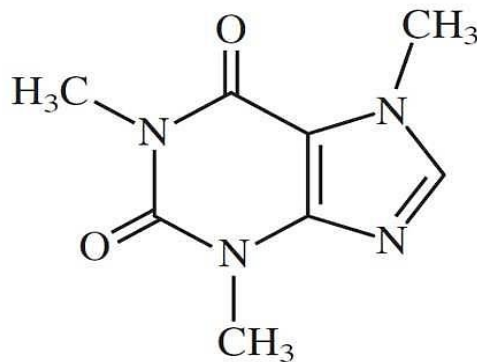


Рис. 1.5. Структурна формула кофеїну (American Chemical Society, 2023)

Після вживання кофеїну менше п'яти відсотків виводиться в незмінному вигляді, інша частина, в основному, розпадається на моно- або диметилксантини. Завдяки подібній хімічній структурі, ці ксантини часто мають схожий вплив на людину. Параксантин (1,7-диметилксантин) є основним метаболітом кофеїну та має багато тих же стимулюючих ефектів, але потенційно менш токсичний (Magkos and Kavouras, 2005).

Як поширений інгредієнт харчових продуктів, напоїв і фармацевтичних препаратів, кофеїн вважається найпоширенішою ФАС у світі, а також однією із найбільш часто виявленою ФАС у водному середовищі (Pires et al., 2016). Ця речовина є відносно стабільною у різних умовах, включаючи морську воду, має високу розчинність у воді (приблизно $13,0 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$), низьке октанолове число ($\log k_{ow} = -0,07$), низьку летючість та надзвичайну стабільність із періодом

напіввиведення від 100 до 240 днів (Edwards et al., 2015), що чинить сприятливий ефект на його розповсюдження у водному середовищі.

Незважаючи на те, що кофеїн показує відмінну ефективність видалення під час очищення стічних вод, завдяки значному обсягу споживання кількість цієї сполуки, яка потрапляє у воду, є набагато більшою за кількість, що деградує. Беручи до уваги ще відносну стабільність в умовах навколишнього середовища, наразі кофеїн є визнаним маркером антропогенної діяльності (Buerge et al., 2003).

Результати дослідження Li et al. (2020) показали, що понад 70 % повідомлень про забруднення водою кофеїном надходили з Азії та Європи, які мають густонаселені та промислово розвинені території. Однак було виявлено, що забруднення кофеїном також впливає на території, ізольовані від впливу людини, таких як Антарктида. Вищевказане дослідження наводить дані про максимальні концентрації кофеїну в стічних водах, очищених стічних водах, річках, питній воді, підземних водах, озерах та у пробах дощової води, які сягали $3,60 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$, $55,5$, $19,3$, $3,39$, $0,683$, 174 , $44,6$ і $5,40 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ відповідно.

Моніторингові дослідження водного середовища показують високий вміст кофеїну у зразках тканин, які відповідали концентраціям від $0,001 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ до $753 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ (Canela et al., 2014). У двостулкових молюсків, *Mytilus edulis*, зібраних вздовж узбережжя Каліфорнії (США), були зареєстровані концентрації від 19 до $68 \text{ нг}\cdot\text{г}^{-1}$ (Maruya et al., 2014). Концентрації від $2,5$ до $73,6 \text{ нг}\cdot\text{г}^{-1}$ спостерігалися у риб Червоного моря (*Gerres oyena*, *Chanos chanos* і *Lethrinus nebulosus*) (Ali et al., 2018) та від $1,76$ до $64,78 \text{ нг}\cdot\text{г}^{-1}$ у риб Південної Африки (*Pterogymnus laniarius*, *Sarda orientalis* і *Pachymetopon blochii*) (Ojemaye and Petrik, 2019). Враховуючи, що зазначені організми споживаються людиною, виявлені концентрації кофеїну викликають занепокоєння щодо потенційного негативного впливу на здоров'я.

Основні визнані джерела цієї ФАС у водному середовищі включають залишки виділення стічних вод, невідповідне осадження прострочених або небажаних фармацевтичних продуктів, що містять кофеїн, відходи виробничих

підприємств, лікарняні відходи тощо (Cruz et al., 2016). Кофеїн часто використовується в усьому світі в якості інгредієнта багатьох ліків, що відпускаються за або без рецепту (анальгетиків, ліків від застуди, заборонених наркотиків і стимуляторів), а також у вигляді кофеїн-вмісних їжі та напоїв (наприклад, кава, чай і шоколад, молочні десерти) (Temple et al., 2017). Середня добова доза споживання кофеїну коливається від 80 до 400 мг на людину (Gokulakrishnan et al., 2005). При цьому, Європа, Азія та Північна Америка лідирують у світі за кількістю споживання кофеїну протягом останнього десятиліття (Vieira et al., 2022).

З огляду на вищесказане, фізіологічний та біохімічний вплив кофеїну на прісноводних організмів став предметом значного інтересу в останні роки. У стічних водах, де зазвичай найвищі концентрації кофеїну, ці концентрації все ж недостатньо високі, щоб створити ризик гострого отруєння для тварин і людей. Однак, порогові значення для потенційно токсичних концентрацій кофеїну є нижчими при хронічному впливі (Cantwell et al., 2016).

Деякі дослідження впливу кофеїну на хребетних щодо його біохімічних і фізіологічних ефектів вказують на прооксидантну дію (Olcina et al., 2008), тоді як інші демонструють антиоксидантну дію (Nikolic et al., 2003) або відсутність ефекту (Olcina et al., 2006).

Кофеїн, як і інші члени сімейства метилксантину, має протизапальні властивості та діє як імуномодулятор, впливаючи на вроджену та адаптивну імунні відповіді (Kovács et al., 2021). Імуномодулюючий ефект цієї сполуки пов'язаний із імуносупресією та негативною регуляцією запальних реакцій завдяки інгібуючій дії на проліферацію, активацію та секрецію цитокінів лімфоцитами та, зокрема, на секрецію прозапального цитокіну TNF- α (Ritter et al., 2005). Такий вплив можна пояснити інгібуванням цАМФ-фосфодіестерази та, відповідно, підвищенням внутрішньоклітинних концентрацій цАМФ і активацією протеїнкінази А. цАМФ є дуже потужним імуномодулятором, який чинить, загалом, супресивний ефект на функції імунних клітин. Активація цАМФ/протеїнкінази А сприяє інгібуванню вивільнених прозапальних

цитокінів, таких як TNF- α і інтерлейкіну-12, та підвищує вироблення антизапальних цитокінів, зокрема, інтерлейкіну-10, у мишачих макрофагах. Було показано, що кофеїн виявляє інгібуючі ефекти на передачу сигналів STAT1, яка є важливим регулятором виробництва цитокінів IL-10 (Kovács et al., 2021). цАМФ також пригнічує проліферацію лімфоцитів. Тим не менш, вплив кофеїну на секрецію інших запальних цитокінів (IL-1 β , IL-6 та IL-8), є до кінця незрозумілим (Al Reef and Ghanem, 2018).

Велика кількість досліджень підтверджують, що кофеїн може регулювати вроджений та набутий імунітет, впливаючи на продукування цитокінів (Ritter et al., 2005), підвищення продукції вільних радикалів (Jafari and Rabbani, 2000), збільшення маси імунних органів (Ramanaviciene et al., 2004), підвищення кількості лейкоцитів (Ramanaviciene et al., 2004) та зниження їх хемотаксису (Horrigan et al., 2003), вивільнення гістаміну (Shin et al., 2000), зниження проліферації лімфоцитів (Horrigan et al., 2005), пригнічення вироблення антитіл (Kovács et al., 2021) та стимулювання апоптозу імунних клітин (Jafari and Rabbani, 2000). Відтак, кофеїн відіграє функцію негативного регулятора імунної відповіді, який опосередковує протизапальну реакцію (Kovács et al., 2021).

Таким чином, виходячи з фармакокінетики кофеїну, ми припускаємо, що багато з його імуномодулюючих ефектів виникають у концентраціях, які відповідають нормальному споживанню людиною (Horrigan et al., 2003).

Кофеїн має дозозалежні ефекти, з позитивними ефектами при менших дозах та шкідливими при більш високих. Серед позитивних результатів, відзначається можливе зниження кофеїном окисного стресу, викликаного іншими ксенобіотиками (Diniz et al., 2020). Дослідження Cunha (2016) виявило, що миші, які піддавались стресу та яким вводили кофеїн, продемонстрували кращу пам'ять, ніж миші, піддані стресу без впливу кофеїну. Це може означати, що кофеїн діє як нормалізатор, який допомагає зменшити негативний вплив стресу, але не покращує нормальну когнітивну функцію.

Дані літератури свідчать, що в присутності фармацевтичних препаратів, включаючи кофеїн, організми посилюють свою метаболітичну активність та

зменшують запаси енергії (глікогену), які використовуються для боротьби з окиснювальним стресом у сукупності із індукцією антиоксидантного захисту, щоб запобігти клітинним пошкодженням (Cruz et al., 2016).

У ссавців ензими комплексу цитохрому P450 (CYP) I фази біотрансформації надзвичайно важливі для метаболізму кофеїну. В основному, ензими сімейства CYP1A відповідають за перетворення кофеїну в параксантин спільно з перетвореннями іншими CYP на теобромін і теофілін. На додаток до I фази, ще одним важливим етапом біотрансформації кофеїну є ацетилювання (II фаза) через дію N-ацетилтрансферази. Ці шляхи діють разом, щоб полегшити виведення кофеїну та його метаболітів (Burdan, 2015).

Нещодавні дослідження показали, що кофеїн може індукувати окисний стрес у клітинах (Li et al., 2020; Pires et al., 2016). Саме процеси біотрансформації кофеїну потенційно можуть генерувати АФК, які в надлишку стають токсичними для організму, викликаючи стан окисного стресу (Lesser et al., 2011). Незважаючи на вже відомі антиоксидантні ефекти для ссавців (Azam et al., 2003), дослідження з двостулковими молюсками продемонстрували, що кофеїн може призводити до посилення ліпопероксидації (Cruz et al., 2016) і пошкодження ДНК (Aguirre-Martínez et al., 2015), що демонструє необхідність подальших досліджень прооксидантної дії кофеїну на водні організми.

Pires et al. (2016) спостерігали нездатність антиоксидантів і ензимів біотрансформації запобігання клітинам від ПОЛ після 28-денного впливу кофеїну. Gagne et al. (2007) повідомили, що *in vitro* інкубація кофеїну (14 мкМ) з мікросомами форелі збільшила швидкість ПОЛ і окиснення НАДФН, припускаючи, що вплив кофеїну може призвести до значного окиснювального пошкодження при низьких концентраціях. Дослідження Cruz et al. (2016) засвідчили, що загальний вміст протеїну в *R. philippinarum* був значно підвищений після впливу кофеїну, що можна пояснити збільшенням кількості метаболічних захисних ензимів для запобігання пошкодженню клітин. Beck et al. (2006) також повідомили, що високі дози кофеїну (від 150 до 200 мг/кг маси тіла) у пошкодженій корі головного мозку мишей викликають ПОЛ і окисний

стрес. Ці дослідження показали, що тривале вживання кофеїну сприяє окисним ушкодженням та зниженню антиоксидантного захисту, а в деяких випадках – пошкодженню клітин.

Пластик усіх розмірів став основною формою забруднювачів водного середовища. Коли пластик потрапляє в морське середовище, він розщеплюється на дрібніші частинки за допомогою процесів фрагментації. Ці фрагментовані частинки, які змінюються в діапазоні розмірів від 1 мкм до 5 мм, визначаються як мікропластик (MP). За даними Асамблеї ООН з навколишнього середовища (ЮНЕП) у 2017 році, щорічно в океани потрапляє 4,8-12,7 мільйонів метричних тонн пластику (Alfaro-Núñez et al., 2021). Повідомляється, що MP (частинки розміром менше 5 мм) становить 92,4 % морського пластикового сміття та був виявлений у багатьох екологічних матрицях у всьому світі (Li et al., 2019). Полістирол, поліетилен, поліпропілен, полівінілхлорид і поліаміди – це п'ять MP, які найчастіше зустрічаються у водному середовищі (Martinho et al., 2022).

З'являється все більше наукових доказів потенціалу перенесення частинок пластику через планктонні організми на вищий трофічний рівень, що зрештою, впливає на людину (Walkinshaw et al., 2020). Крім того, MP піддається біологічному обростанню, що призводить до колонізації мікроорганізмами та безхребетними, полегшуючи транспортування чужорідних видів на великі відстані та збільшуючи ризики забруднення MP водних організмів та екосистем (Alfaro-Núñez et al., 2021). Дрейсени представляють надзвичайний інтерес у цьому питанні, їх активна фільтраційна діяльність піддає ці види безпосередньо впливу MP, присутньому в навколишньому середовищі (Li et al., 2019).

Вплив пластику часто пов'язують із закупоркою кишечника, зниженням норми харчування та зменшенням доступності необхідних організму ресурсів. Однак, більш дрібні частинки пластику можуть викликати імунну відповідь у безхребетних (Triebkorn et al., 2019). Накопичення пластикових частинок призводить до імунної відповіді клітин, такої як фагоцитоз, інкапсуляція, утворення вузликів і апоптоз. Крім того, різні гуморальні фактори активуються

через сигнальні шляхи, такі як антимікробні пептиди та система профенолоксидази (Bergami et al., 2016). МР може провокувати імунну відповідь кількома шляхами, кожен з яких призводить до імуносупресії або імуностимуляції. Зокрема, імунна відповідь може виникнути через зміни різноманітності та функцій кишкових мікроорганізмів (Limonta et al., 2019), механічні пошкодження травного тракту (Lei et al., 2018) або зміни у якості їжі (Pascual et al., 2004). Крім безпосереднього впливу частинок МР, пластикові добавки, які виділяються з МР також можуть опосередковано викликати зміни в імунних параметрах, зокрема, бісфенол А, який часто входить до складу полістиролу (Yang et al., 2022).

Полістирол широко використовується щоденно для упаковки харчових продуктів, покриття поверхонь, пляшок для напоїв та інших побутових виробів. Бісфенол А, який додають у ці вироби для затвердіння пластмас, є сильним канцерогеном і може потрапити у воду та навколишнє середовище через розкладання пластику (Van Cauwenberghe et al., 2015). Дослідження Yamashita et al. (2003) вказує, що бісфенол А стимулює прозапальні цитокіни, включаючи ІЛ-1, ІЛ-6, ІЛ-12 і підвищує експресію CD86 в мишачих перитонеальних макрофагах, який діє як стимулюючий фактор для активації та виживання Т-лімфоцитів (Yamashita et al., 2003).

Найбільш вивченим ефектом впливу МР у водних видів є відповідь на окисний стрес, і існують добре відомі зв'язки між окиснювальним стресом і запальною реакцією (Yang et al., 2020). Після впливу на рибу МР з полістиролу було виявлено такі фізіологічні ефекти, як запалення та накопичення ліпідів у печінці. Після вторгнення МР клітини вродженого імунітету, такі як макрофаги та нейтрофіли, опосередковують вивільнення запальних цитокінів (наприклад, ІЛ-1 β TNF- α) задля усунення потенційної небезпеки (Lu et al., 2016).

У прісноводних моллюсків після впливу мікрогранул полістиролу було виявлено зниження глутатіонпероксидази та підвищення активності каталази (Magni et al., 2018). Проте згідно з дослідженням Alomar et al. (2017), в печінці риби *Mullus surmuletus*, яка поглинула МР у польових умовах, спостерігалось

незначне підвищення активності глутатіон-S-трансферази, що відображає індукцію системи детоксикації. Значне зниження маси тіла та індексу маси тіла у личинок *Danio rerio* після впливу МР полістирольного типу спостерігалося в дослідженні Yang et al. (2020). Це додатково демонструє, що цей вид МР негативно впливає на ріст і розвиток водних організмів.

Останні дослідження Zhang et al. (2018) та Chen et al. (2019) задокументували значну роль МР як переносника забруднень. Насправді існує невелика кількість досліджень, які стосуються фізіологічних ефектів впливу МР та пов'язаних з ним хімічних речовин (Alomar et al., 2017). МР може адсорбувати гідрофобні забруднення (засоби особистої гігієни, фармацевтичні препарати та метали) з води та відігравати роль їх переносника (Li et al., 2019; Martinho et al., 2022). Коли організм поглинає ці частинки, розвивається стресова реакція не тільки на МР, але й на забруднювачі, які використовують МР як вектор (Cole et al., 2011). Деякі дослідники стверджують, що між забруднювачами та поверхнею МР може виникнути сильна взаємодія, оскільки гідрофобність забруднювачів сприяє адсорбції цих речовин через фізичні або хімічні взаємодії (Martinho et al., 2022). Гідрофобність є ключовою властивістю в цих процесах, оскільки деякі ксенобіотики мають більшу спорідненість із пластиком ніж природні відкладення, а частинки МР можуть виступати переносниками забруднювачів для організмів, забезпечуючи їх проникнення в клітини та спричиняючи ендокринні порушення через реакцію з важливими біомолекулами (Alfaro-Núñez et al., 2021; Walkinshaw et al., 2020). Крім того, пластик здатний не тільки транспортувати хімічні речовини, але також може підвищити свою екологічну стійкість (Teuten et al., 2009). Функціональні групи МР (наприклад, $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$ та $-\text{NH}_2$) грають критично важливу роль у контролі екологічної поведінки, агрегації та осадження (Galloway et al., 2017).

Через надзвичайно широке використання МР та кофеїну, вони одночасно співіснують у стічних водах. Гідрофобність МР збагачує його здатність взаємодіяти з кофеїном у воді, але дослідження векторного транспортування

кофеїну, пов'язаного з МР, все ще знаходяться в зародковому стані (Sewwandi et al., 2022).

Таким чином, загальні наявні дані вказують на те, що кофеїн, який традиційно сприймається як сполука, що становить низьку загрозу для водного середовища, може заслуговувати на додаткову увагу, враховуючи наявні концентрації та його впливи на біоту. Особливої уваги заслуговує вивчення прооксидантних ефектів кофеїну. Гідрофобність МР є ключовою властивістю, яку необхідно враховувати при дослідженні експозиційних впливів на живі організми, оскільки у водному середовищі завжди присутня суміш мікрополітантів, які можуть адсорбуватися на його поверхні та виявляти синергетичні чи антагоністичні ефекти.

Відтак, клітинні тіоли відомі як реакційно здатні сполуки, залучені у антиоксидантний захист та координацію цинку, що обґрунтовує їх внесок у реакцію організму на запальний процес. Разом з тим, металотіонеїни, для яких у клітинному тіоломі найбільш яскраво виражене поєднання цих функцій, за впливу запальних станів та їх модуляторів майже не досліджені. Універсальність функціонування металотіонеїнів у живому світі може стати підґрунтям у оцінці їх філогенетично зумовленої ролі у цих процесах з урахуванням особливостей комбінованих екологічних ризиків та локалізації запального процесу.

РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Відбір дослідних груп тварин

Дослідження проводилось на моделях інвазивного двостулкового молюска родини Dreissenidae, дрейсени (тригранки) *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) та лабораторних щурів. Для відбору екземплярів молюсків використовували дві популяції, одну з яких вважали аборигенною із Понто-Каспійського регіону, іншу – інвазивною з територіально віддаленим розташуванням із середніми довжинами мушлі $1,8 \pm 0,2$ та $2,7 \pm 0,2$ см, середніми значеннями маси $1,3 \pm 0,2$ і $2,3 \pm 0,3$ г у аборигенних та інвазивних особин відповідно. З метою здійснення серії досліджень на хребетних організмах, використовували лабораторних щурів-альбіносів лінії Вістар віком 3-4 місяці масою 200-220 г.

Загалом, в лабораторних умовах проведено дві серії досліджень:

I. Дослідження дії мікрополітантів-імуномодуляторів кофеїну, МР та їх суміші при двох температурних режимах на інвазивних і аборигенних особин двостулкового молюска *D. polymorpha* задля порівняння стійкості імунної та стресової реактивності у двох популяціях стосовно участі МТ.

II. Дослідження функціональності МТ при запальних процесах на моделі карагенан-індукованого гонартрити (ГА) у щурів-альбіносів лінії Вістар.

Для проведення I-ї серії досліджень, молюсків виду *D. polymorpha* відбирали у червні місяці одночасно з двох територіально-віддалених ділянок. Особини аборигенної популяції відбирали з річки Дніпро поблизу м. Херсон (Kh, $46^{\circ}60'24.13''$ пн. ш. та $32^{\circ}58'35.4''$ сх. д.; показники середньодобових температур у червні становлять $15^{\circ}\text{C} - 27^{\circ}\text{C}$ (Seatemperature, 2013)), інвазивної – у верхній частині річки Серет (притока Дністра, західна Україна) біля міського ставу Тернополя (Tn, $49^{\circ}33'12.6576''$ пн. ш. та $25^{\circ}35'41.1612''$ сх. д.; середньодобові температури у червні – $16,1^{\circ}\text{C} - 21,7^{\circ}\text{C}$ (Seatemperature, 2013)) (Рис. 2.1). Молюсків з двох популяцій відбирали траловим методом на глибині до 1 м. Близько 600 особин з кожної ділянки транспортували до лабораторії в резервуарах об'ємом 25 л, наповнених нативною аерованою водою та

попередньо акліматизували до лабораторних умов протягом семи днів після вилову в 80-літрових резервуарах в аерованій, дехлорованій та пом'якшеній водопровідній воді ($18 \pm 1^\circ\text{C}$, $\text{pH } 7,3 \pm 0,2$, рівень CaCO_3 $86,8 \pm 1,0 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$, рівень розчиненого кисню $8,67 \pm 0,51 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$, рівні аміаку ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$) і нітритів нижче $0,1 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$). Годували 500 мг Tropical SuperVit Basic, що містить бета-1,3/1,6-глюкан. Зміна води у резервуарах та годівля здійснювалися кожних дві доби з метою уникнення токсичної дії продуктів життєдіяльності організмів.



Рис. 2.1. Розташування місць відбору зразків: місце відбору аборигенної популяції молюсків – р. Дніпро (популяція Kh, поблизу м. Херсона); місце відбору інвазивної популяції – Тернопільське озеро, р. Серет (Tn-популяція). Використовувалася карта: GAMEO (2013)

Після періоду акліматизації (сім діб) молюсків з кожного місця відбору рівномірно розподіляли по шість груп у акваріуми, наповнені водою, об'ємом у 25 л (попередньо описані фізико-хімічні показники якості води підтримувалися незмінно). Були створені експериментальні групи:

1. вплив МР мікрокульками полістиролу при 18°C (МР, постачальник Sigma Aldrich; концентрацією $1 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$, розмір пор 2 мкм , що відповідає $2,4 \times 10^8$ частинок $\cdot\text{л}^{-1}$);

2. дія кофеїном фармацевтичного походження (Caf, постачальник ТОВ НВФ "СІНБІАС"; 20,0 мкг·л⁻¹, що відповідає 0,11 нМ або $6,3 \times 10^{18}$ молекул);
3. підвищена температура (Т-групи, 25 °С);
4. поєднання мікропластику та кофеїну за 18 °С (Міх);
5. поєднання мікропластику та кофеїну за 25 °С (МіхТ).

Для забезпечення теплового впливу температуру підвищували поступово протягом доби. Одну групу з кожної популяції піддавали впливу тільки акваріумної води та вважали контрольною (С) і також досліджували після однакового часу перебування в лабораторних резервуарах. Експозиція тривала протягом 14 днів. Впродовж періоду експозиції зміну води та поповнення концентрації речовин здійснювали кожних дві доби. При цьому, було використано дві повторності на групу (50 зразків на 25-літровий резервуар).

Концентрація МР відповідала типовій концентрації в забруднених ділянках річок (Lasee et al., 2017; Scherer et al., 2020) та обмеженням, які застосовуються в експериментальних експозиціях (Martyniuk et al., 2022a,b; 2023). Частинки розміром 1-10 мкм не визначаються поточними методами моніторингу в прісних водах. Однак, при тій самій масовій частці, кількість частинок у воді різко зростає зі зменшенням їх розміру, і очікується, що МР малого розміру будуть мати високу біологічну активність (Beiras and Schönemann, 2020).

З допомогою металографічного мікроскопу та УФ-освітлення аналізували присутність МР поокремо та у суміші з кофеїном у товщі води в резервуарах, де перебували молюски при експозиції (Рис. 2.2А,Б) та наявність МР у м'якій тканині після періоду експозиції (Рис. 2.2В). Для виявлення МР у м'яких тканинах молюска використовували модифіковану методику, описану Martyniuk et al. (2023), яка базується на розщепленні біоорганічних речовин тканини гідроксидом калію та перекисом водню. При цьому, враховуючи розміри МР, нашою метою не було кількісне визначення, але дослідження акумуляції його у тканині та середовищі, де перебували молюски.

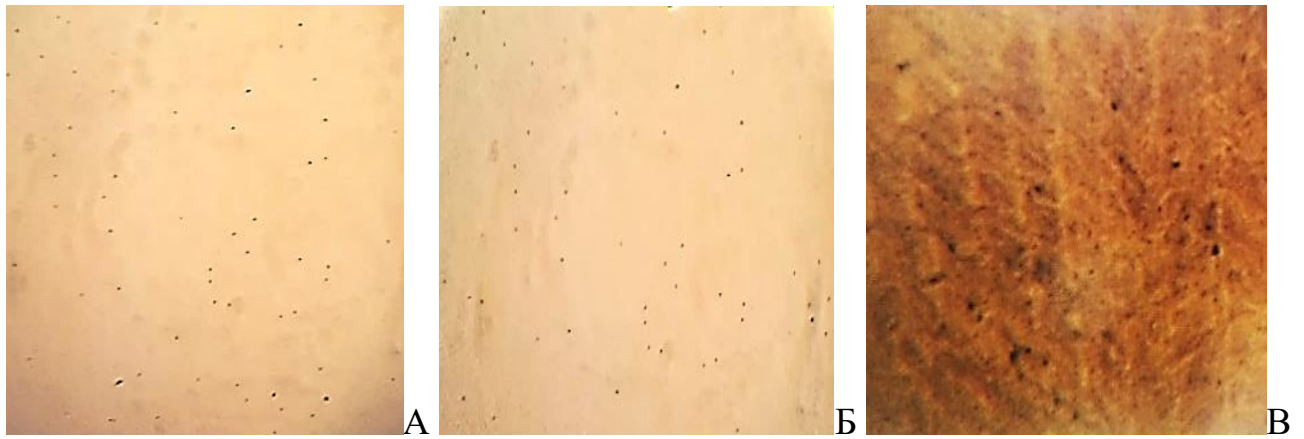


Рис. 2.2. Виявлення мікропластику (розміром 2 мкм) під металографічним мікроскопом МЕТАМ-П1 («АСМА-Прилад», Україна) (спостереження на склі при збільшенні 187,5×): А – у воді з резервуару, де перебували молюски під час експозиції (1 мг·л⁻¹); Б – у воді з резервуару, де перебували молюски (1 мг·л⁻¹) за присутності кофеїну (20 мкг·л⁻¹); В – у м'якій тканині молюсків.

Концентрація кофеїну була обрана на основі даних, наданих для прісної води, де вона може сягати 20 мкг·л⁻¹ у необроблених стічних водах, річках, питній воді, підземних водах, озерах, беручи до уваги дані з найменш і найбільш забруднених місць Європи (0,05 мкг·л⁻¹-59,5 мкг·л⁻¹) (Vystavna, 2011; Li et al., 2020; Wilkinson et al., 2022).

Смертність під час експозиції становила 13,7 % від загальної кількості особин з Тп- та 10,7 % з Кh-популяції. Зокрема, найбільша смертність спостерігалась у Т-групах (26 % та 20 % у Тп- та Кh-популяціях відповідно), МіхТ-групах (21,5 % та 24 % у Тп- та Кh-популяціях) та Міх-групах (15,5 % та 8,5 % у Тп- та Кh-популяціях). Меншу смертність спостерігали в у екпозиціях Caf (11,5 % і 7 % в Тп- і Кh-популяціях) та МР (7,5 % і 4,5 % в Тп- і Кh-популяціях).

Після періоду експозиції молюсків умертвляли, відбирали м'яку тканину та зберігали в морозильній камері при температурі -40 °С для подальшого проведення аналізів. Перед відбором м'якої тканини, в кожній групі реєстрували морфологічні індекси. Кондиційний індекс (ІК) м'яких тканин розраховували як співвідношення: (суха маса м'яких тканин/загальна маса тіла) × 100 %, а коефіцієнт кондиції (КК) як співвідношення: (загальна

маса/(довжина ракушки)³) × 100 %. У зразках також досліджували стать і наявність паразитів під світловим мікроскопом. Для дослідження використовували м'які тканини *D. polymorpha* вільних від паразитів самців молюсків. З метою забезпечення статистично коректних результатів, при дослідженні кожного показника кількість зразків становила 8.

Для реалізації другої серії досліджень, зразки синовіальної тканини від 20 самців щурів-альбіносів лінії Вістар були отримані з віварію Навчально-наукового інституту прикладної фармації (Національний фармацевтичний університет, Харків, Україна). Згідно протоколу, тварини отримували стандартну дієту для щурів і воду *ad libitum*. Щурів поміщали в стандартних лабораторних умовах у добре провітрюваному приміщенні при $25 \pm 1^\circ\text{C}$ і відносній вологості $55 \pm 5\%$ із регулярно діючим циклом 12 годин світла/12 годин темряви (Guide for the care and use of laboratory animals, 2011). Усі дослідження проводилися відповідно до Директиви Ради ЄС 2010/63/EU від 22 вересня 2010 року про захист тварин, які використовуються в наукових цілях (Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes, 2010). Протоколи експериментів затверджено Комісією з біоетики НФаУ (Затвердження № 5 від 25.03.2021).

Щурів було поділено на 2 експериментальні групи наступним чином:

1 група – інтактний контроль (здорові щурі (C), n = 10);

2 група – контрольна патологія (особини із карагенан-індукованим ГА (GA), n = 10).

На початку експерименту всі тварини інтактної контрольної групи отримували 25 мкл носія (стерильного фізіологічного розчину) в обидва коліна. Одночасно у щурів контрольної патологічної групи індукували запалення в обох колінах одноразовим внутрішньосуглобовим введенням 25 мкл 2 % карагенану, попередньо розчиненого в стерильному фізіологічному розчині. На 7-й день після введення карагенану тварин умертвляли, оскільки в цей момент

спостерігаються очевидні зміни патології колінного суглоба, спричинені ГА (Valenti et al., 2010; Sur et al., 2019).

Наприкінці експерименту тварин поміщали в CO₂-бокс. Зразки крові відбирали з нижньої порожнистої вени та центрифугували при 1500 × g при 4 °C протягом 10 хвилин за допомогою охолоджуваної центрифуги Eppendorf 5702R (Eppendorf, Німеччина). У сироватці крові попередньо визначали рівень сіалових кислот (результати отримано у Навчально-науковому інституті прикладної фармації). Супернатанти синовіальних тканин у замороженому вигляді транспортувались у НДЛ порівняльної біохімії та молекулярної біології ТНПУ (Тернопіль) та використовували для оцінки концентрації загального протеїну MTSN та Zn-зв'язаного MT (Zn-MT), рівня загального Zn у тканині, показників окисного стресу та холінестеразної активності.

Усі етапи відбору зразків тканини та проведення досліджень здійснювали на холоді. Для реалізації усіх аналізів використовували реактиви, які за ступенем чистоти відносять до Reagent (реактивної чистоти) та вище та які були отримані від компаній Sigma-Aldrich (США) або Синбіас (Україна). Значення світлопоглинання вимірювали з використанням спектрофотометра UV/Vis ULAB 102UV.

2.2. Дослідження низькомолекулярних тіолів

2.2.1. Виділення металотіонеїнів з допомогою гель-проникної хроматографії

З метою виділення термостабільної MT-вмісної фракції, використовували гель-проникну хроматографію, що базується на принципі розділення молекул за молекулярними масами за рахунок їх здатності проникати в пори гелю, який відіграє роль нерухомої фази та який поміщається у хроматографічну колонку. Для хроматографічного дослідження готували 10 % (мас./об.) гомогенат м'яких тканин дрейсени або колінних суглобів щурів у охолодженому 10 mM трис-HCl буфері, pH 8,0, що містив 10 mM 2-меркаптоетанол («Sigma-Aldrich») як інгібітор окиснення MT і 0,1 mM фенілметилсульфонілфторид (ФМСФ, «Sigma-

Aldrich») для запобігання активності протеази (Roesijadi and Fowler, 1991; Coyle et al., 2001). Для кожного етапу дослідження було підготовлено дві повторності від групи. Гомогенат центрифугували при $14500 \times g$ протягом 1 год при 4°C . Для отримання термостабільної фракції, отриманий супернатант інкубували при 85°C протягом 5 хвилин та піддавали повторному центрифугуванню.

Хроматографічну колонку з холодильним кожухом, яка мала розміри $1,5 \times 35$ см, заповнювали гелем Сефадекс G-50 («Sigma-Aldrich») (нерухома фаза). В якості елюента використовували 10 мМ трис-НСІ буфер, (рН 8,0), який містив 10 мМ 2-меркаптоетанол, але для запобігання втраті зв'язаних з протеїнами металів не додавали динатрієвої солі етилендіамінтетраоцтової кислоти (ЕДТА). Контролювали швидкість проходження елюента, яка становила 0,33 мл/хв. Фракції (по 5 мл) збирали та вимірювали оптичну густину досліджуваних зразків при довжині хвилі 280 і 254 нм. При цьому, фракції з низькою молекулярною масою (приблизно 7 кДа), найбільш високим світлопоглинанням при 254 нм і найвищим співвідношенням оптичних густин D_{254}/D_{280} були ідентифіковані як передбачуваний пік, що містить МТ. Дві МТ-вмісні фракції об'єднували, реєстрували УФ-спектр зразка та в подальшому використовували для визначення концентрації Zn в МТ та для електрофорезу МТ у поліакриламідному гелі. Калібрування хроматографічної колонки було виконано шляхом застосування суміші протеїнів відомої молекулярної маси: сироваткового альбуміну (67,0 кДа), хімотрипсину (25,0 кДа), цитохрому С (12,3 кДа) та інсуліну (5,8 кДа) (маркери фірми «Sigma-Aldrich»).

2.2.2. Визначення концентрації металотіонеїнів у тканинах

Концентрацію протеїну МТ (MTSH) визначали, базуючись на властивостях 5,5'-дитіо-біс-2-нітробензойної кислоти (ДТНБ) взаємодіяти з SH-групами протеїнів з утворенням 5-тіо-2-нітробензойної кислоти (Viarengo et al., 1997). Зразки м'яких тканин дрейсени або колінних суглобів щурів гомогенізували в 20 мМ трис-сахарозному буфері (рН 8,6) з 0,01 % β -меркаптоетанолом у суміші з інгібіторами протеаз 0,5 мМ ФМСФ та 6 мкМ

лейпептином (30 % гомогенат) та піддавали центрифугуванню з метою отримання фракції, що містить МТ, але не містить уламків ядер і мітохондрій. Для екстракції МТ з отриманої надосадової речовини використовували охолоджену суміш етанолу та хлороформу, яку зберігали у морозильній камері, з подальшим центрифугуванням зразків. Оптичну густину реєстрували при 412 нм, а відновлений глутатіон (GSH) («Sigma-Aldrich») використовували як еталонний зразок. Для розрахунку концентрації МТ використовували молярний коефіцієнт екстинкції 5-тіо-2-нітробензолу (ТНБ, $14\ 150\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Концентрацію МТ виражали в мкг^{-1} вологої тканини та у $\text{нмоль SH-груп}\cdot\text{г}^{-1}$ вологої тканини.

2.2.3. Визначення концентрації металів у металотіонеїнах та тканині

Концентрацію Zn досліджували в загальній м'якій тканині (100 мг) та в об'єднаному МТ-вмісному елюаті (10 мл) після виділення металотіонеїнів за допомогою гель-проникної хроматографії на сефадексі G-50. Метод базується на спектрофотометричному вимірюванні продукту реакції, який утворюється при взаємодії Zn (II) з 2-(5-бром-2-піридилазо)-5 [N-пропіл-N-(3-сульфопропіл)аміно] фенолу динатрієвої солі дигідрату (5-Br-PAPS) (Karaman and Menek, 2012; Wang et al., 2018). При цьому, діапазон рН був у межах 5-11, оскільки такі значення є оптимальними для уникнення потенційного розкладання 5-Br-PAPS у кислому середовищі (Karaman and Menek, 2012). Зразки тканини або елюат висушували при 105 °C протягом 24 год та піддавали обробці HNO_3 , після чого випарювали для отримання золи. Після етапу випарювання золи розчиняли в 1 % трихлороцтовій кислоті та додавали 36 нМ 5-Br-PAPS («Sigma-Aldrich») (кінцева концентрація) у 200 мМ бікарбонатному буфері (рН 9,8). Суміш далі піддавали інкубації протягом 30 хв при 20 °C. Концентрацію металу оцінювали за абсорбцією комплексу метал-5-Br-PAPS при 550 нм та розраховували за калібрувальною кривою. Присутні у зразках іони Fe та Cu зв'язували саліцилальдоксимом («Sigma-Aldrich»),

дефероксаміном («Sigma-Aldrich») та цитратом натрію. Концентрацію металу виражали як $\text{нмоль} \cdot \text{г}^{-1}$ вологої тканини.

Визначення вмісту купруму (Cu) у м'яких тканинах дрейсени проводили згідно методу Peterson and Boiler (1955) за допомогою спектрофотометричного аналізу з використанням купризону (Copper Test. 1..14767 - Merck Millipore, «Sigma-Aldrich»). Для вивільнення Cu та перетворення Cu (I) на Cu (II), подрібнену тканину гомогенізували в 2 н HCl у співвідношенні 1:2 (мас./об.) і додавали такий же об'єм 20 % ТХО. Для визначення Cu в термостабільному екстракті супернатант інкубували при 85 °C протягом 5 хв з подальшим центрифугуванням. рН супернатанту доводили до 8,0 за допомогою NH_4OH (концентрованого). Далі отриману надосадову речовину піддавали аналізу, як описано у Copper Test та аналізували на спектрофотометрі через 5 хвилин при 600 нм проти контрольного зразка. Розрахунок проводився з використанням молярного коефіцієнта екстинції $16\ 000\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$ при 600 нм (Marczenko and Balcerzak, 2000). Вміст Cu виражали як $\text{нмоль} \cdot \text{г}^{-1}$ вологої тканини.

2.2.4. Електрофорез термостабільних протеїнів у поліакриламідному гелі

Електрофорез термостабільних протеїнів у поліакриламідному гелі проводили згідно методу Haider et al. (2012), використовуючи МТ-вмісний пік, попередньо виділений шляхом хроматографії. Отриманий після гелерозподільчої хроматографії елюат концентрували, змішуючи у співвідношенні 2:1 з сефадексом G-50. Для подальшого дослідження використовували свіжоприготовлені розчини реактивів: 2,5 М трис-HCl буфер (рН 8,8), розчин акриламід:бісакриламід у співвідношенні 29:1 («Sigma-Aldrich») розчин поліакриламідного гелю: 30 % (мас./об.).

Для приготування буферу для нанесення зразків до 100 мМ Трис-HCl (рН 6,8) додавали 1 % (мас./об.) SDS, 4 % (об./об.) 2-меркаптоетанол, 24 % (мас./об.) гліцерин, барвник 0,02 % (мас./об.) Coomassie Brilliant Blue та 3 % розчин

персульфату калію. Буфер для електрофорезу містив 25 мМ Трис, 25 мМ трицин та 0,05 % (мас./об.) натрій додецисульфат.

Для концентрування та розділення використовували 15 % та 4 % (мас./об.) гелі відповідно. Коли гель повністю застигав, лунки заповнювали зразком (по 10 мкл у лунку), касети завантажували у прилад для електрофорезу. Електрофорез здійснювали при напрузі 100 В та силі струму 20 А. Після проходження електрофорезу, фарбування барвниками Кумасі Синій та нітратом срібла та фіксування пластин проводили за протоколом (Otsuka et al., 1988). Електрофорограми опрацьовували, використовуючи програмне забезпечення GelAnalyzer 19.1.

2.2.5. Визначення концентрації глутатіону

Загальну концентрацію глутатіону (GSht, який є сумою відновленого і окисненого, GSH і GSSG, відповідно) кількісно визначали за допомогою глутатіонредуктази за методом Griffith (1980). Для отримання безпротеїнового екстракту до 20 % (мас/об) гомогенату м'якої тканини дрейсени та колінних суглобів щурів у 50 мМ фосфатному буфері з рН 7,4, що містить 100 мМ КСl і 1 мМ ЕДТА, а також 0,1 мМ ФМСФ, додавали сульфосаліцилову кислоту до отримання 5 % її розчину у пробі. Суміш піддавали центрифугуванню при $6000 \times g$, 4 °С протягом 10 хв. Аліквоту супернатанту (300 мкл) додавали до буферу Трис-НСl (0,4 М, рН 8,9), який містив 200 мкМ β -НАДФН («Sigma-Aldrich») і 1 мМ ДТНБ. Зразки перемішували і нагрівали до 30 °С на водяній бані протягом 10 хв. Для ініціації ензиматичної реакції додавали глутатіонредуктазу (50 одиниць/мл). Швидкість утворення 5-тіонітробензойної кислоти реєстрували спектрофотометрично при 412 нм кожні 60 с протягом 360 с.

Щоб оцінити рівень GSSG, попередньо депротеїнізований зразок (600 мкл) обробляли 2-вінілпіридином («Sigma-Aldrich») у кінцевій концентрації 1,43 мкМ та інкубували протягом 1 год. Вміст GSH у тканинах розраховували шляхом віднімання концентрації GSSG від концентрації GSht. Стандарти готували з GSH і GSSG, а концентрації виражали як $\mu\text{mоль} \cdot \text{г}^{-1}$ вологої

тканини. Редокс-індекс глутатіону (RI GSH) розраховували як відношення концентрацій GSH/GSSG.

2.3. Аналіз стану системи антиоксидантного захисту та імунореактивності

Для дослідження системи антиоксидантного захисту визначали показники загальної антиоксидантної активності (Total antioxidant capacity, TAC), активностей супероксиддисмутази (SOD), каталази (CAT), утворення продуктів окисної деструкції протеїнів (Protein Carbonyls, PC) та ліпідів (Thiobarbituric Acid Reactive Substances, TBARS). Визначення проводили у розчинній фазі 10 % гомогенату (мас./об.) м'яких тканин дрейсени або колінного суглобу щурів (синовіальна тканина) у 50 мМ KH_2PO_4 - K_2HPO_4 буфері (pH 7,4). Активність фенолоксидази (PhO) оцінювали як показник імунореактивності у молюсків, використовуючи для визначення розчинну фазу 10 % гомогенату (мас./об.) м'якої тканини дрейсени у 0,1 М Трис-буфері (0,1 М Трис, 0,45 М NaCl, 26 мМ MgCl_2 , 10 мМ CaCl_2 , pH=7,0).

2.3.1. Загальна антиоксидантна активність

TAC в м'яких тканинах дрейсени та синовіальній тканині щурів визначали за методом Re et al. (1999). При цьому, катіони-радикали ABTS ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) попередньо генерували взаємодією 14 мМ розчину 2,2'-азино-ді-[3-етилбензтіазолінсульфонату] (ABTS) («Sigma-Aldrich») з 4,9 мМ розчином персульфату калію у співвідношенні 1:1, піддаючи 16-ти годинній інкубації у темряві. Знебарвлення $\text{ABTS}^{\bullet+}$ вимірювали після додавання супернатанту до розчину $\text{ABTS}^{\bullet+}$ і зменшення світлопоглинання реєстрували через 1 хв і 6 хв при 734 нм проти дистильованої води. Отримані дані порівнювали з початковою оптичною густиною розчину $\text{ABTS}^{\bullet+}$, яка становила близько 0,7. Це значення використовували як контроль та результати обчислювали за різницею оптичних густин розчину і дослідної проби, виражаючи при цьому у % інгібування вільної радикальної активності: $\% = (\text{D}_{\text{ABTS}^{\bullet+}} - \text{D}_{\text{проби}}) / \text{D}_{\text{ABTS}^{\bullet+}} \times$

100%, де $D_{\text{ABTS}^{*+}}$ представляє оптичну густину розчину катіон-радикалу ABTS^{*+} ; $D_{\text{проби}}$ представляє оптичну густину розчину ABTS^{*+} після додавання дослідної проби через 6 хв.

2.3.2. Супероксиддисмутазна активність

Активність SOD (КФ 1.15.1.1) аналізували відповідно до методу Fried (1975). Принцип методу: відновлення нітротетразолію синього супероксидними радикалами з утворенням продукту диформазану синього кольору. Як відомо, нітротетразолій синій конкурує з ензимом SOD за супероксид-аніони. За присутності SOD в реакційній суміші він має здатність утворювати меншу кількість забарвленого комплексу, порівняно з контролем. Реакційна суміш містила 50 мМ калій-фосфатний буфер (pH 7,8), 30 мМ L-метіонін («Sigma-Aldrich»), 0,1 мМ ЕДТА, 750 мкМ нітротетразолій синій («Sigma-Aldrich»), 50 мкл супернатанту та 20 мкМ рибофлавін («Sigma-Aldrich»). При цьому, рибофлавін додавали останнім і проби піддавали опроміненню флуорисцентною лампою (400 люкс, 15 Вт) протягом 20 хв у боксах, покритих алюмінієвою фольгою. Опроміненню піддавали також контроль, у який не додавали субстрату, та стандарт, котрий не містив супернатанту. Відновлення нітротетразолію синього вимірювали при 560 нм. Холоста проба, де використовувалися всі реагенти, за винятком супернатанту та субстрату (бланк), опроміненню не піддавалась і проти неї міряли світлопоглинання дослідних проб. Для оцінки активності Mn-SOD супернатант попередньо інкубували протягом 60 хв при 0 °C у присутності 15 % ацетонціаногідрину у співвідношенні 1:1, що викликало повне інгібування Cu,Zn-SOD. Для розрахунку активності використовували формулу: $A = (D_{\text{стандарту}} - (D_{\text{дослід}} - D_{\text{контроль}})) \times d / C_{\text{протеїну}}$, де $D_{\text{стандарту}}$ – це світлопоглинання стандартної проби, $D_{\text{дослід}}$ – світлопоглинання дослідної проби, $D_{\text{контроль}}$ – світлопоглинання контрольної проби, d – розведення дослідної проби, $C_{\text{протеїну}}$ – концентрація протеїну в досліджуваному супернатанті. Активність Cu,Zn-SOD розраховували як різницю активностей ензиму за відсутності та присутності

ацетонціаногідрину. Результати виражали в одиницях SOD на мг розчинного протеїну (одна одиниця SOD визначається як кількість ензиму, що викликає зменшення світлопоглинання при 50 % відновленні нітротетразолію синього в розрахунку на 1 мг протеїнів супернатанту).

2.3.3. Каталазна активність

Каталазну активність (КФ 1.11.1.6) вимірювали відповідно до методики Аebi (1974), яка базується на розкладанні H_2O_2 за впливу ензиму у розчинній фазі гомогенату, що реєструється спектрофотометрично при довжині хвилі 240 нм. Реакцію ініціювали, додаючи 20 мкл супернатанту до 50 мМ К-фосфатного буфера (рН=7,0), який містив 15 мМ H_2O_2 , та вимірювали кожні 15 секунд протягом однієї хвилини проти холостого зразка. Для обчислення використовували мілімолярний коефіцієнт екстинції H_2O_2 , який дорівнює $0,04 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Активність виражали як $\text{мкмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ розчинного протеїну.

2.3.4. Утворення продуктів перекисного окиснення ліпідів та протеїнів

Для дослідження утворення продуктів окисної деструкції ліпідів та протеїнів у м'яких тканинах дрейсени та синовіальних тканинах щурів, 10 % гомогенат у 50 мМ KH_2PO_4 – K_2HPO_4 буфері (рН 7,4) змішували з 20 % сульфосаліциловою кислотою у співвідношенні 1:2 та піддавали центрифугуванню протягом 15 хв при $4000 \times g$, 4 °С.

Для вимірювання TBARS, отриману надосадову речовину піддавали взаємодії з 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК, «Sigma-Aldrich») в 0,1 М HCl у кінцевій концентрації 0,3 мМ, згідно методу Ohkawa et al. (1979). Зразки нагрівали у водяній бані при 100 °С протягом 20 хв. Контрольна проба, проти якої вимірювали дослідні зразки, замість супернатанту містила 50 мМ К-Р буфер (рН 7,4). Утворення ТБК-активних продуктів реєстрували спектрофотометрично при 532 нм, обраховували за молярним коефіцієнтом

екстинції комплексу, який дорівнює $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ та виражали в нмоль \cdot г $^{-1}$ тканини.

Рівень РС вимірювали у сформованому при центрифугуванні осаді відповідно до кількості утворених 2,4-динітрофенілгідразонів (Reznick and Packer, 1994). Для цього, до осаду додавали 1 мл попередньо профільтрованого 100 мМ розчину 2,4-динітрофенілгідразину («Sigma-Aldrich») у 2 М НСІ. У контрольну пробу замість субстрату додавали 2 М розчин НСІ без субстрату. Після чого, зразки інкубували при 37 °С протягом 1 години зі змішуванням кожні 10 хв та піддавали центрифугуванню. Осад, який утворився, тричі промивали 5 % трихлороцтовою кислотою. Після третього промивання осад ресуспензували у розчині 8 М сечовини (розчинений у 2 М НСІ) та витримували при 100 °С на водяній бані протягом 15-20 хв і повторно центрифугували для позбавлення каламуті. Вимірювання світлопоглинання надосадової речовини проводили при 370 нм. Концентрацію РС розраховували з використанням молярного коефіцієнта поглинання $22\,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ та виражали в мкмоль РС \cdot мг $^{-1}$ протеїну або в мкмоль \cdot г $^{-1}$ тканини.

2.3.5. Активність фенолоксидази

Активність PhO (КФ 1.14.18.1) досліджували спектрофотометрично шляхом реєстрації утворення о-хінонів з використанням п-фенілендіаміну як субстрату (Luna-Acosta et al., 2010). Дослідна проба містила 0,1 мл зразка у Трис-буфері (0,1 М трис-НСІ, 0,45 М NaCl, 26 мМ MgCl₂, 10 мМ CaCl₂, рН 7,0) і п-фенілендіамін («Sigma-Aldrich») як субстрат у кінцевій концентрації 3,33 мМ (об'єм проби 1,5 мл). Субстрат розчиняли у метанолі. Систематично використовували кілька контрольних лунок: «буферний контроль», що містив лише буфер, «контроль зразка», що містив лише зразок і буфер і «неензиматичний контроль», що містив лише субстрат і буфер. Зміну активності PhO відстежували протягом 2 год, реєструючи збільшення поглинання при 420 нм. Оскільки субстрат має здатність до аутоокиснення, результати неензиматичного окиснення виражали як середнє значення

приросту поглинання за хвилину ($\Delta A \cdot \text{хв}^{-1}$). Для підрахунку ензиматичного окиснення результати коригували відповідно до неензиматичного автоокиснення субстрату. Питома активність була виражена в міжнародних одиницях (МО) на мг розчинного протеїну. Одна МО визначається як кількість ензиму, який каталізує утворення 1 мкмоль продукту за хвилину. Використовували молярний коефіцієнт екстинкції продукту реакції $43\,160\text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

Інгібування лакказної активності PhO (Lc) проводили шляхом попередньої інкубації супернатанту і специфічного інгібітора лаккази цетилтриметиламоній броміду (ЦТАБ) у співвідношенні 1:1. Ензиматичне окиснення (у присутності інгібітора) систематично коригували відповідно до неензиматичного автоокиснення субстрату (у присутності ЦТАБ).

2.4. Визначення показників цитотоксичності

2.4.1. Активність каспази-3

Для визначення каспазної-3 активності (Cas-3, КФ 3.4.22.56) використовували протокол Kaushal et al. (2014), який базується на ензиматичному розщепленні тетрапептиду ацетил-Асп-Глу-Вал-Асп-п-нітроаніліду з утворенням забарвленого продукту реакції п-нітроаніліну. Для цього готували гомогенат із загальної м'якої тканини дрейсени на основі лізуючого буферу у співвідношенні 1:3 (мас./об.), який містив 4 % Тритон X-100, 5 мМ ЕДТА, 5 мМ дитіотреїтол («Sigma-Aldrich»), 150 мМ NaCl, 1 мМ ФМСФ та центрифугували при $12000 \times g$ 10 хв. Далі до отриманого супернатанту додавали лізуючий буфер та субстрат ацетил-Асп-Глу-Вал-Асп-п-нітроанілід («Sigma-Aldrich») у кінцевій концентрації 0,1 мМ. Вивільнення продукту п-нітроаніліну з субстрату реєстрували спектрофотометрично при 405 нм протягом 2 год при 37 °С. Ензиматичну активність розраховували з використанням мілімолярного коефіцієнта екстинкції $10,5\text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ і виражали в пмоль $\cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ протеїну.

2.4.2. Активність катепсину Д

Катепсин Д (CtD, КФ 3.4.23.5) – лізосомальна протеаза, вихід якої з лізосом свідчить про пошкодження їх мембран, які часто спостерігаються за патологічних станів. Аналіз активності ензиму базується на спектрофотометричному визначенні продуктів ензиматичного гідролізу гемоглобіну при 280 нм (Barrett, 1977). Для визначення активностей загального та екстралізосомального CtD, м'яку тканину дрейсени гомогенізували (1:2 мас./об.) у 0,1 М натрій-ацетатному буфері (рН 5,0), що містив 0,25 М сахарозу з або без 1 % Тритоном Х-100 відповідно. До отриманого гомогенату додавали 2,5 % (мас./об.) розчин гемоглобіну в 0,1 М натрій-ацетатному буфері (рН 5,0) у співвідношенні 1:1. Далі проби інкубували протягом 30 хв при 37 °С і реакцію зупиняли, занурюючи пробірки в лід та додаючи 10 % охолодженого розчину трихлороцтової кислоти та дистильованої води. Вільну (позалізосомальну) активність CtD (CtDe) оцінювали в гомогенаті без додавання Тритону Х-100, тоді як загальну активність (CtDt) визначали після вивільнення ензиму за допомогою детергенту. Активність розраховували з використанням молярного коефіцієнта екстинції $1490 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ та виражали як нмоль тирозину $\cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ протеїну.

2.4.3. Визначення стабільності лізосомальних мембран

Стабільність лізосомальної мембрани (цілісність лізосом) м'яких тканин дрейсени, як індекс життєздатності клітин, визначали за допомогою аналізу утримання барвника нейтрального червоного (NRR-тест). Метод базується на спостереженні, що в умовах загибелі клітини або при формуванні більш кислого середовища, нейтральний червоний не здатен накопичуватися у лізосомах (Repetto et al., 2008). Крім того, поглинання нейтрального червоного може регулюватися змінами клітинної поверхні або лізосомальних мембран. Таким чином, це дає змогу відрізнити життєздатні, пошкоджені або мертві клітини згідно здатності їх лізосом поглинати барвник. Спектрофотометрична версія аналізу була розроблена Vabich and Borenfreund (1990) та адаптована до тканин

моллюсків Naj et al. (2019). Зразки тканини (30 мг) інкубували протягом 2 годин із сольовим розчином, що містить барвник нейтральний червоний з подальшим промиванням фізіологічним розчином. Далі проби фіксували у розчині формальдегіду (0,5 % в 1 % CaCl_2) та знову інкубували протягом 1 години. Екстракцію барвника проводили розчином 1 % оцтової кислоти в 50 % етанолі з отриманням гомогенату (у підкисленому спирті), супернатант якого аналізували спектрофотометрично при 550 нм. Наведена обробка тканин призводить до руйнування ушкоджених мембран та, відповідно, виходу барвника, тоді як неушкоджені мембрани утримують його у лізосомах. Відтак, чим більше поглинання барвника – тим менша стабільність мембран лізосом. Результати виражали як величину світлопоглинання у розрахунку на г тканини.

2.4.4. Активність кислої фосфатази

Лізосомальну кисло-фосфатазну активність (АсР, КФ 3.1.3.2) оцінювали за Lin and Steichen (1994). Для визначення використовували 10 % гомогенат м'якої тканини дрейсени в охолодженому 0,25 М розчині сахарози, буферизованому лимонною кислотою/0,1 М K_2HPO_4 (рН 8,0). Зразок фракціонували кількаразовим центрифугуванням (1000 × g 10 хв; 3300 × g 10 хв; 16300 × g 20 хв). Отриманий осад ресуспензували в буферизованому розчині сахарози та піддавали повторному центрифугуванню. Супернатант розподіляли на дві окремі проби для визначення вільної (АсРf) та загальної (АсРt) активностей ензиму. Для аналізу АсРf додавали суміш 5 мМ п-нітрофенілфосфату («Sigma-Aldrich»), розчиненого в 50 мМ Na-ацетатному буфері (рН = 5,0), 0,25 М сахарозу та 1 мМ ЕДТА. З метою визначення АсРt, у іншу пробу додавали ту ж суміш з використанням Тритону Х-100 у концентрації 0,125 мг/мл до загального об'єму зразка 500 мкл. Зразки інкубували протягом 30 хв при 25 °С. Реакцію зупиняли додаванням 0,1 н гідроксиду натрію у співвідношенні 1:2. Оптичну густину реєстрували спектрофотометрично при 410 нм проти контрольної проби, яка містила всі компоненти, крім супернатанту. Активність АсР кількісно визначали за

допомогою молярного коефіцієнта екстинкції п-нітрофенолу ($16000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ у присутності ЕДТА (Zhang et al., 1992)) і виражали в $\mu\text{моль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ протеїну.

Визначення стабільності лізосомальної мембрани за функціональною активністю кислої фосфатази включає визначення таких показників як активність вільного ензиму (AcP_f), активність мембрано-зв'язаного ензиму (AcP_b), загальну активність (AcP_t) і лізосомальну мембрано-зв'язану латентність (L). Активність ензиму в первинному зразку визначається як активність AcP_f. Тритон X-100, неіонний детергент, який доданий до зразка, розчиняє лізосомальні мембрани та вивільняє майже всі мембранно-зв'язані ензими. Активність, виміряна після додавання детергента, визначається як $\text{AcP}_t = \text{AcP}_f + \text{AcP}_b$. Таким чином, латентність (L) визначає відсоток загальної кількості AcP, яка зв'язана (латентна): $L = \text{AcP}_b / \text{AcP}_f \times 100 \%$ (Lin and Steichen, 1994). У нашому дослідженні L, а не AcP_f, використовувалася як показник лізосомального стресу.

2.4.5. Активність холінестерази

Холінестеразну активність (ChE, КФ 3.1.1.7) визначали з метою аналізу ймовірної нейротоксичності за патології гонартрити у щурів, використовуючи розчинну фазу 10 % (мас./об.) гомогенату колінних суглобів у 50 мМ фосфатному буфері рН 7,4, що містив 100 мМ КСІ і 1 мМ ЕДТА згідно колориметричного методу Ellman et al. (1961) при температурі 25 °С. Зважаючи на те, що субстратом для реакції виступав ацетилхолінйодид, ензим був засвідчений як ацетилхолінестераза. Реакційна суміш складала 50 мкл супернатанту, розчин ДТНБ в 0,1 М фосфатному буфері (рН 8,0), який використовували як тіоловий індикатор, кінцевою концентрацією у пробі 0,313 мМ. Реакцію ініціювали додаванням 2 мМ ацетилхолінйодиду до загального об'єму проби 3,2 мл. Активність ензиму розраховували за молярним коефіцієнтом екстинкції $14150 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

2.5. Визначення вмісту протеїну у тканині

Для розрахунку активності ензимів аналізували вміст протеїнів в розчинній фазі 10 % гомогенату м'яких тканин дрейсени колінних суглобів щурів у 50 мМ $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{--K}_2\text{HPO}_4$ буфері (рН 7,4) згідно методу Lowry et al. (1951). Метод заснований на використанні реактиву Фоліна, який має здатність відновлювати мідні похідні протеїну, утворюючи забарвлені продукти реакції, які реєстрували спектрофотометрично. Вміст протеїну обчислювали з використанням калібрувальної кривої, побудованої на бичачому альбуміні. Результати виражали в мг протеїну на г маси тканини.

2.6. Статистичні методи оцінки результатів дослідження

Результати виражали як середнє значення \pm SD. Для аналізу Zn в складі МТ здійснювали чотири повторності для кожного з двох незалежних зразків об'єднаних наважок тканин п'яти екземплярів з групи, в результаті чого для кожної групи було отримано $n = 8$. Для всіх інших параметрів кількість осіб у вибірці становила 8. Нормальність дисперсії оцінювали за допомогою тесту Шапіро-Вілка. Коли це було можливо, дані були нормалізовані загальним методом трансформації Бокса-Кокса. Для аналізу використовували параметричний t-критерій Стюдента зі значущими значеннями при $p < 0,05$. Вірогідна відмінність між групами вважалась при $p < 0,05$. Взаємозв'язок між біохімічними показниками оцінювали за допомогою кореляційного аналізу (коефіцієнт кореляції Пірсона r за вірогідності значення $p < 0.05$ і $p < 0.01$).

Нормалізовані дані, перетворені Бокс-Кокс методом, були піддані аналізу головних компонентів (РСА) для оцінки взаємозв'язків між виміряними параметрами з використанням методу обертання Varimax з нормалізацією Кайзера, а канонічний дискримінантний аналіз використовувався для визначення ступеня специфічності реакції кожної з експонованих груп. Адекватність даних аналізували, використовуючи значення КМО та критерій сферичності Бартлетта. Для розрахунків використовували програмне забезпечення IBM SPSS Statistics версії 24 для Windows.

Використовуючи дані показників системи антиоксидантного захисту, обчислювали індекс антиоксидантно-прооксидантного балансу (АПБ). Після проведення уніфікації результатів дослідження, індекс АПБ вираховували як відношення сум показників антиоксидантного (А) та прооксидантного (П) статусу: $АПБ = \Sigma A / \Sigma П$. При цьому, кожний показник визначали, використовуючи формулу: $(M_d - M_k) / M_k$, де M_d і M_k – це середньоарифметичні значення показників дослідної та контрольної серій відповідно. До “А” відносили показники активностей SOD, CAT, PhO, лаккази та рівні GSH, MTSN і TAC; до “П” – рівні TBARS, PC та GSSG.

РОЗДІЛ ІІІ. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Вплив імуномодуляторів на властивості металотіонеїнів аборигенних і інвазивних молюсків виду *D. polymorpha* та лабораторних щурів

3.1.1. Морфологічні характеристики молюсків *D. polymorpha* з двох популяцій за експериментального впливу

Визначення морфологічних параметрів молюсків двох популяцій після періоду інкубації показало, що контрольні екземпляри з аборигенної Kh-популяції мали меншу довжину та масу, але приблизно вдвічі вищий кондиційний коефіцієнт (КК) ніж екземпляри з інвазивної Tn-популяції (Табл. 3.1). Морфологічні показники чутливо відбувають стан метаболічних реакцій організму на стресорні впливи, що було відзначено і у нашому експерименті.

Таблиця 3.1.

Морфологічні показники *D. polymorpha* двох популяцій (Tn та Kh) за впливу мікропластику (MP), кофеїну (Caf), їх суміші (Mix), підвищеної температури (T) та суміші мікропластику та кофеїну при підвищеній температурі (MixT), $M \pm SD$, $n=8$

Група	Довжина тіла, см	Загальна маса тіла, г	Маса мушлі, г	КІ м'якої тканини, %	КК, %
TnC	2,70±0,17	2,34±0,26	1,24±0,26	46,75±11,71	12,02±1,97
KhC	1,79±0,17 [#]	1,28±0,19 [#]	0,77±0,15 [#]	38,33±17,13	23,35±6,81 [#]
TnMP	2,86±0,14	3,26±0,20*	1,56±0,25	51,98±8,01	13,99±1,73
KhMP	1,98±0,17	1,33±0,22	0,69±0,17	48,04±5,91	18,36±8,10
TnCaf	2,83±0,12	3,30±0,20*	1,61±0,18*	51,30±4,20	14,80±2,47*
KhCaf	1,83±0,24	1,38±0,36	0,67±0,15	50,04±12,40	24,61±12,17
TnT	2,71±0,11	3,00±0,16*	1,35±0,17	54,95±4,62	15,14±1,95*
KhT	1,96±0,12	1,56±0,26*	0,79±0,20	49,14±9,38	20,64±2,95
TnMix	2,64±0,17	2,61±0,42	1,22±0,22	52,17±13,30	14,48±3,35
KhMix	1,89±0,12	0,90±0,11*	0,47±0,09*	47,38±9,43	13,63±2,56*

Продовження таблиці 3.1

Група	Довжина тіла, см	Загальна маса тіла, г	Маса мушлі, г	КІ м'якої тканини, %	КК, %
TnMixT	2,94±0,18*	3,58±0,36*	1,56±0,18*	56,42±2,17	14,30±2,56
KhMixT	1,95±0,12	0,74±0,09*	0,37±0,07*	50,61±5,36	9,98±1,17*

Примітка: * – вказує на істотно різні значення між групою і контролем; # – істотно різні значення між двома контрольними групами (P<0,05).

Важливо вказати на значний вплив експозицій на морфологічні індекси, такі як маса зразків, яка різнилася у аборигенній та інвазивній популяціях. Експозиції спровокували значне збільшення маси тіла молюсків та, відповідно, її відношення до довжини (КК) у всіх групах інвазивної популяції (за винятком MP- та Міх-груп), тоді як аборигенні молюски втратили свою вагу, масу раковини та КК ~ у два рази в Міх і, зокрема, МіхТ-групах. При цьому, кондиційний індекс (КІ) молюсків не змінювався за жодного з впливів. Відтак, було продемонстровано відмінність у морфологічних реакціях двох популяцій на однаковий вплив, причому вони вказують на фізіологічний рівень діапазону змін за характеристикою КІ, проте більшу здатність адекватної відповіді до додаткових викликів у інвазивній популяції.

3.1.2. Характеристика металотіонеїнів аборигенної та інвазивної популяцій *D. polymorpha* за впливу на організм мікропластику, кофеїну, температури поокремо та у поєднанні

MT являють собою родину протеїнів, що генетично запрограмовані та експресуються у значній кількості організмів, забезпечуючи швидку відповідь на стресорні чинники навколишнього середовища (Isani and Carpenè, 2014; Krezel and Maret, 2017). Хоча у наш час відомо, що це мультифункціональні протеїни, та для доведення їх участі у відповідь організму за впливу запальних/антизапальних чинників, доцільно здійснити порівняльний аналіз їх тіол-реактивної та металодепонувальної відповідей з використанням різних модельних схем. Тому одним із основних завдань цього дослідження було

оцінити вплив стресорних чинників хімічної та екологічної природи поокремо та у поєднанні на організм молюска виду *D. polymorpha*. Крім того, важливо порівняти відповідь термостабільних протеїнів аборигенних та інвазивних груп молюсків, оскільки швидкі темпи розповсюдження інвазивних представників актуалізують питання щодо розуміння ролі МТ у цих процесах та участь їх у гомеостазі металів, зважаючи на те, що ці особини проходять період адаптації до нового(их) середовища(ів). У окремих дослідженнях показано, що інвазивні види, адаптуючись до нового середовища, зазвичай підвищують свою стійкість і виявляють знижену специфічність відповіді на додаткові екологічні виклики. Проте доказова база таких досліджень вкрай обмежена (Burgiel and Muir, 2010).

Хроматографічний аналіз термостабільних протеїнів тканин дрейсени показав (Рис. 3.1А), що за всіх експозицій він представлений двома фракціями – високомолекулярною (масою близько 66 кДа), яка може бути наслідком неповного видалення високомолекулярних протеїнів при підготовці досліджуваних зразків, та низькомолекулярною, яка за всіма характеристиками відповідала МТ-вмісній фракції, оскільки володіла високою термостабільністю (денатурація не відбувалася протягом 5-10 хв при 85-90 °С) та молекулярною масою близько 7 кДа. Крім того, у кожній групі УФ-спектр цього піку мав типовий максимум поглинання при 245–255 нм і не виявляв максимуму при 280 нм, що відображає відсутність амінокислотних залишків з ароматичними групами в цих унікальних протеїнах (Kägi and Schäffer, 1998) (Рис. 3.1Б). Індекс поглинання світла D_{254}/D_{280} у всіх зразках був у межах 1,5-3,2 для інвазивної Тп-популяції та 1,2-3,1 для аборигенних Кh-молюсків, що свідчить про наявність металтіолатних кластерів у структурі низькомолекулярної фракції. При цьому, в жодній групі з двох популяцій утворення димерів МТ чи їх розпад на окремі кластери не спостерігалось.

Досліджуючи особливості функціонування МТ за впливу на організм *D. polymorpha* МР, кофеїну, підвищеної температури та їх поєднання, припускалося, що вказані фактори можуть впливати на хроматографічні

характеристики МТ, зокрема шляхом димеризації або деструкції молекул з утворенням похідних відповідної молекулярної маси.

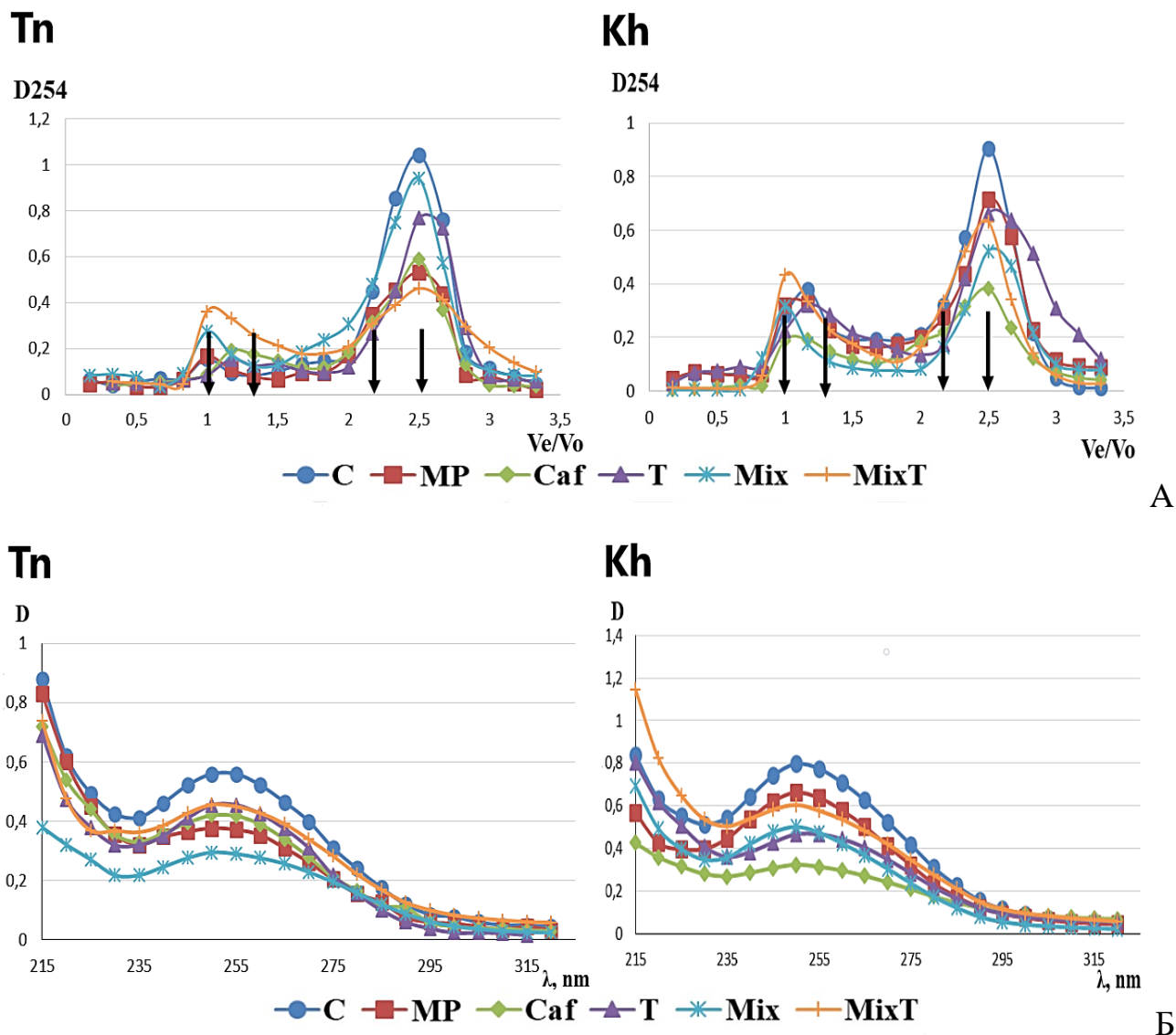


Рис. 3.1. Профілі елюції (А) та УФ-спектри (Б) термостабільних протеїнів з м'яких тканин *D. polymorpha* двох популяцій за впливу мікропластику (MP), кофеїну (Caf), нагрівання (Т) та сумішей кофеїну і мікропластику при 18 °С (Mix) та 25 °С (MixT)

Примітка: На рис. А: стрілками виділено об'єм елюції маркерів: альбумін (66,0 кДа), хімотрипсин (25,0 кДа), цитохром с (12,3 кДа), інсулін (5,8 кДа), які мають параметри елюції 1,0; 1,3; 2,2; 2,5 V_e/V_o відповідно; V_e – об'єм елюції; V_o – зовнішній об'єм гелю.

Відомо, що УФ-спектри МТ залежать як від поліпетидної природи ланцюга, так і від виду металу, що зв'язується з комплексами. Метал-тіолатні кластери у комплексі з відповідними металами в області 250 нм дають специфічні широкі діапазони світлопоглинання. При дослідженні гетерометалічних МТ часто виникають труднощі у розумінні конкретного внеску кожного з металів. Проте дослідження гомометалічних МТ продемонстрували, що Cu-тіолатні кластери проявляють смугу поглинання вище 250 нм, тоді як Zn-тіолатні формують плече з максимумом при менше 240 нм (Wilhelmsen et al., 2002; Scheller et al., 2018). Згідно отриманих нами результатів видно, що у спектрах дрейсени обох популяцій присутній гетерохромний ефект у дальньому ультрафіолеті (при 215-220 нм), який може бути провокований різною часткою Zn в складі цих тіолів у межах груп. Тим не менш, згідно спектральних характеристик, усі експоновані групи виявляли типовий спектральний пік, властивий метал-тіолатним доменам, проте з різним ступенем вираження. Зокрема, для інвазивної Міх- та аборигенної Саf-груп характерний для МТ пік проявлявся найменш чітко.

Наявність МТ у складі термостабільних протеїнів елюату м'якої тканини, виділених шляхом хроматографії на сефадексі G-50, підтверджено методом електрофорезу в поліакриламідному гелі у денатуруючих умовах (Рис.3.2).

Таким чином, згідно отриманих результатів, можемо стверджувати про відсутність екстремального впливу умов середовища, оскільки у жодній з експонованих груп молюсків утворення різних за молекулярною масою форм МТ через їх гідроліз, розпад на димери чи утворення олігомерів не спостерігалось.

Загальний рівень протеїну МТSH був подібним у двох контрольних групах (KhC та TnC) (Рис. 3.3А). Експозиції викликали низку відмінних відповідей між популяціями: в інвазивній популяції підвищення концентрації МТSH спостерігалось у групах Саf та Міх, тоді як у аборигенній Kh-популяції такі зміни викликались впливом МР та Т. Проте тепловий комбінований вплив

одинаково викликав збільшення концентрації МТSH у МіхТ-групах обох популяцій.

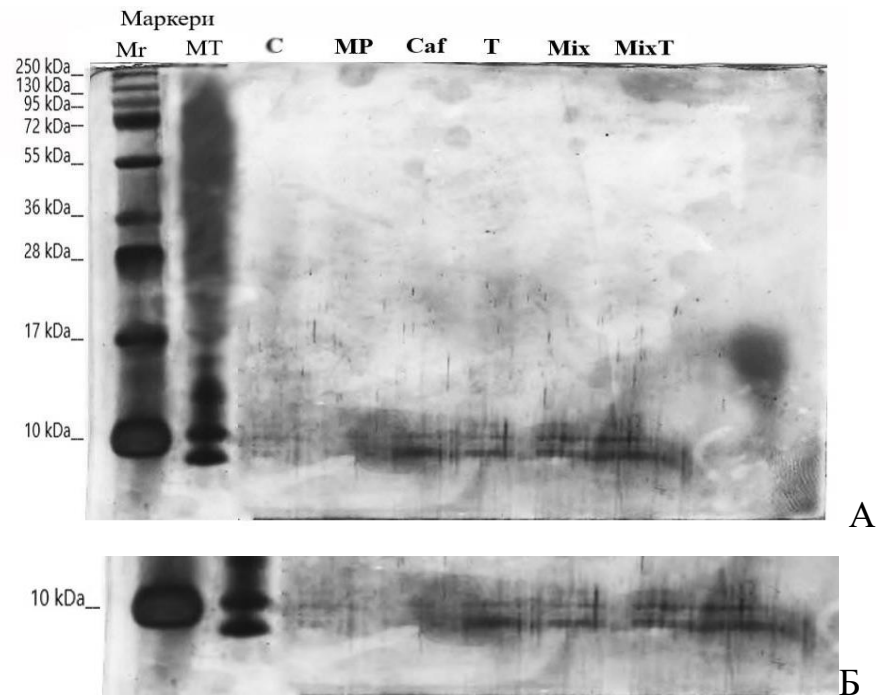


Рис 3.2. Електрофорез у поліакриламідному гелі в денатуруючи умовах термостабільного екстракту м'якої тканини моллюска *D. polymorpha* Тп-популяції за впливу мікропластику (MP), кофеїну (Caf), нагрівання (Т) та сумішей кофеїну та мікропластику при 18 °С (Міх) та 25 °С (МіхТ) протягом 14 днів: А – відокремлені термостабільні протеїни, забарвлені аргентум нітратом; Б – відокремлена металотіонеїнова смуга, забарвлена аргентум нітратом.

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

Оскільки МТ є метало-буферними протеїнами і зв'язують переважно Zn, ми проаналізували їх участь у розподілі цього металу в м'яких тканинах. Було помітно, що Zn-зв'язана частина МТ, отримана за допомогою гель-розподільчої хроматографії, була більш ніж у два рази меншою в аборигенній контрольній групі, порівняно з інвазивною С-групою (Рис. 3.3Б). У аборигенних представників рівень металювання МТ становив 50 %, у той час як у інвазивних цей показник сягав 82 %. Це може вказувати на різний ступінь поляризації тіолів у Zn-тіолатних кластерах МТ та, відповідно, відмінності в Zn-залежному

редокс-відновленні, передачі сигналів, а також, у залученні спорідненого до МТ тіолу в антиоксидантний захист (Krezel et al., 2007).

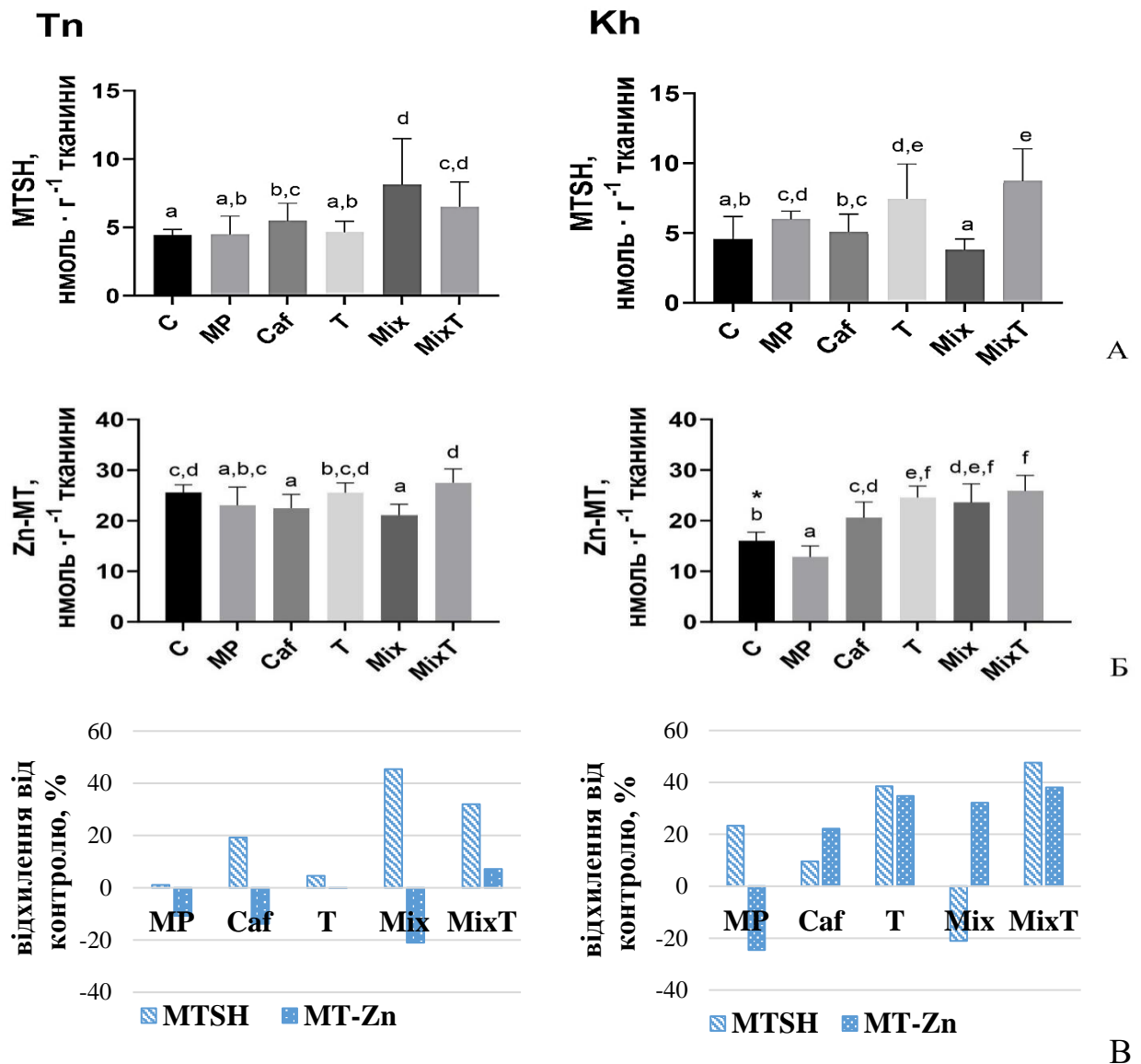


Рис. 3.3. Рівні загального протеїну металотіонеїну (А), металотіонеїн-зв'язаного цинку (Б) та зміни концентрації металотіонеїнів (загальної та металованої форм) (В) в м'яких тканинах двостулкового моллюска *D. polymorpha* за впливу мікропластику (MP), кофеїну (Caf), нагрівання (Т, 25 °С) та сумішей кофеїну та мікропластику при 18 °С (Mix) та 25 °С (MixT) протягом 14-ти днів, $M \pm SD$, $n=8$.

Примітка. Тут і далі: різні літери над колонками вказують на значні відмінності між групами, що піддавалися впливу у межах популяції, а * вказують на різницю між контрольними групами з двох популяцій, $P < 0,05$.

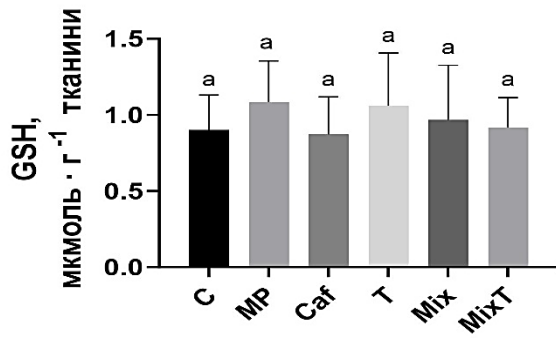
Деякі з впливів змінили розподіл металів у м'яких тканинах молюсків, зокрема концентрація цинку у складі МТ зменшувалася в групах Саf і, більш відчутно, у групі Міх (до 63 % порівняно з контролем) інвазивної популяції.

Зменшення концентрації Zn-МТ спостерігалось також і в аборигенній МР-групі, проте у всіх інших експонованих молюсків Кh-популяції концентрація металізованого протеїну збільшилася майже вдвічі (Рис. 3.3В). Таким чином, у Кh-групах частка неметалізованих МТ була в межах 42-69 % і знизилася до 11 % у Міх-групі. Крім того, реакція молюсків, що спостерігалася в групі МіхТ, узгоджується з попереднім досвідом досліджень у НДЛ, де комбінований тепловий ефект викликав помітне збільшення концентрації низькомолекулярних тіолів (Khoma et al., 2022).

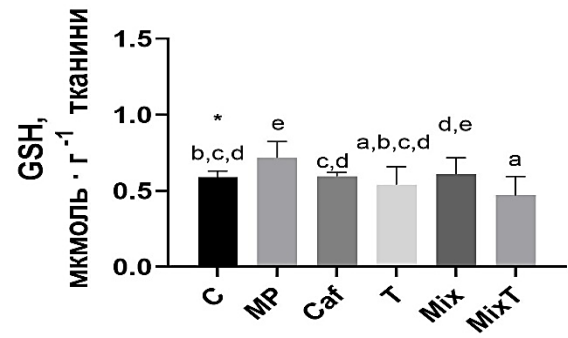
Низькомолекулярний клітинний тіол GSH є головним регулятором редокс-стану клітини. Це обумовлюється його безпосередньою участю у каталітичному розкладі пероксидів. Як відомо, у цитозолі гідроксильні OH^\cdot -радикали переважно зв'язуються МТ, тоді як гідрофільні очищувачі, такі як GSH, активні при зв'язуванні O_2^\cdot (Viarengo et al., 2000; Noguchi et al., 2023). Окиснюючись до дисульфїду, GSH сприяє захисту мембранних ліпідів від перекисного окиснення (Gaucher et al., 2018). Рівні GSH є особливо важливим параметром з огляду на його участь у процесах детоксикації ксенобіотиків, які присутні у навколишньому середовищі та можуть потрапляти в організм молюсків. Крім того, цей низькомолекулярний тіол специфічно бере участь у обміні есенціального Zn між МТ та іншими металопротеїнами, що є важливим в умовах стресу та розвитку запальної відповіді організму.

Показник GSH вірогідно відрізнявся у контрольних групах двох популяцій та виявляв у 1,5 раза вищі значення в інвазивній С-групі. Це може сприяти вищій здатності протекції протеїнів та ліпідів від окисних ушкоджень у інвазивних молюсків. При цьому, рівні GSSG та RI GSH були подібними в обох контрольних групах (Рис. 3.4).

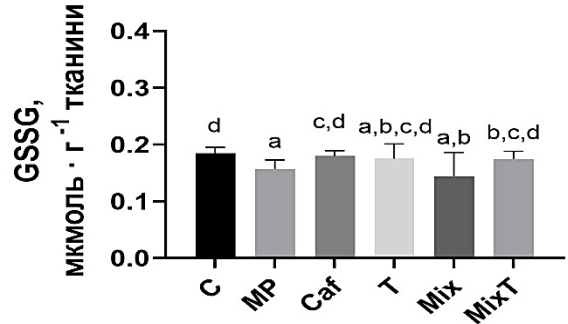
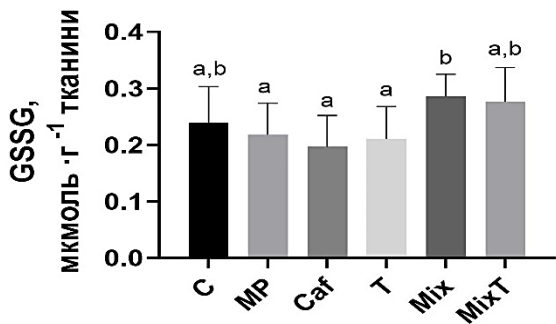
Tn



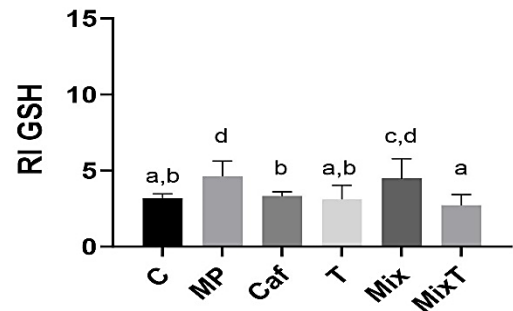
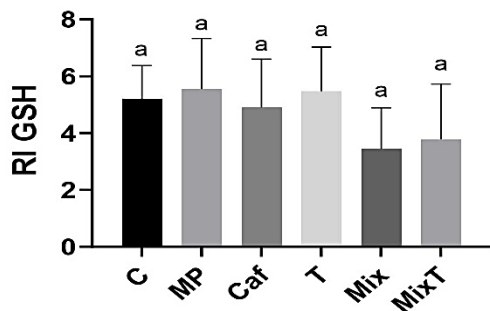
Kh



A



Б



В

Рис. 3.4. Концентрація глутатіону в м'яких тканинах двостулкового молюска *D. polymorpha* за впливу мікропластику (MP), кофеїну (Caf), нагрівання (Т, 25 °С) та сумішей кофеїну та мікропластику при 18 °С (Mix) та 25 °С (MixT) протягом 14 днів: А – GSH; Б – GSSG; В – RI GSH (GSH/GSSG), $M \pm SD$, $n=8$.

Вплив експозицій показав, що в аборигенних представників реакція GSH була більш чутливою до умов існування, порівнюючи з інвазивною популяцією. Жодна з експозицій не впливала на зміну параметрів цього показника в Tn-групах. З іншого боку, в аборигенних молюсків відповіді GSH були різними: концентрація його підвищувалась за впливу MP та знижувалась за теплового комбінованого впливу. Крім того, у цих представників експозиція MP та Mix

сприяла підвищенню RI GSH у 1,4 рази за рахунок зниження рівня окисненої його форми.

Отже, отримані результати доводять залучення МТ у відповідь на стрес. Схожі тенденції в обох популяції проявлялись у збільшенні концентрації МТ та одночасного зниження рівня їх металювання за впливу імуномодуляторів у інвазивних Caf, Mix, MixT та аборигенній МР-групах, що сприяло зростанню частки апо-форми МТ та може сприяти антиоксидантній активності цих тіолів (Buico et al., 2008). Тим не менш, у аборигенних представників склад МТ виявляв чутливість відповіді і до інших чинників, проте відповідь проявлялась у накопиченні ними Zn (окрім МР-групи). Відмінність аборигенної популяції простежується також у чутливості відповідей глутатіону за впливу МР та суміші.

3.1.3. Вміст металів у тканинах молюсків за впливу мікропластику та кофеїну поокремо та у суміші за двох температурних режимів

Виходячи з експериментальних умов, концентрацію металів у м'яких тканинах молюсків ми визначали лише в інвазивній популяції. Дослідження акумуляції металів у тканинах вважається інформативним показником стану організму, оскільки різні ксенобіотики та фізико-хімічні фактори впливають на порушення їх транспорту та метаболізму, зокрема для Zn і, як наслідок, можуть викликати дефіцит цього елемента у тварин (Kreżel and Maret, 2016).

У нашому дослідженні вплив імуномодулятора МР спричиняє зниження рівня Zn, що потенційно може призвести до зменшення цього металу в різних клітинних формах. Однак його поєднаний вплив із кофеїном у Mix-групі виявив протилежний ефект та сприяв підвищеній акумуляції Zn в тканинах у 1,4 раза порівнюючи з контролем. Вплив інших досліджуваних чинників не проявляв відмінних від контролю ефектів. Таким чином, у сукупності з фармацевтиком, МР виявляв кумулятивну дію, а нагрівання послабило цей прояв (у MixT-групі) (Рис. 3.5А).

Незважаючи на те, що Cu є важливим кофактором у багатьох ензиматичних процесах, які відбуваються в клітині, та в транспортних протеїнах гемолімфи (у безхребетних), він може бути токсичним у високих концентраціях завдяки своїй високій реакційній здатності (Ibrahim et al., 2015). Збільшення акумуляції Cu в м'яких тканинах проявлялося при всіх експозиціях. Крім того, найвищі показники спостерігалися за теплового впливу (інвазивні T- і MixT-групи, в 2,9 і 3,0 рази вище контрольної групи відповідно) (Рис. 3.5Б).

Підвищення концентрації Cu в тканинах спричинило різке зниження співвідношення Zn/Cu за всіх впливів, а особливо за нагрівання (Рис. 3.5В), що може суттєво спотворювати окисно-відновний баланс і регуляцію обміну речовин в організмі, сприяти окисненню низькомолекулярного тіолому та ініціювати радикальні процеси в клітині (Atrián-Blasco et al., 2017).

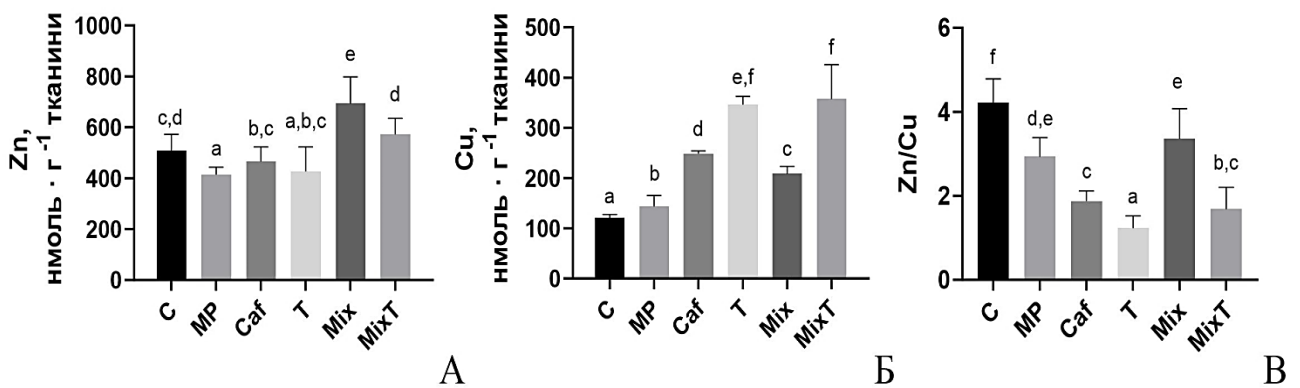


Рис 3.5. Концентрації металів у м'яких тканинах двостулкового молюска *D. polymorpha* за впливу мікропластику (MP), кофеїну (Caf), нагрівання (T, 25 °C) та сумішей кофеїну та мікропластику при 18 °C (Mix) та 25 °C (MixT) протягом 14 днів: А – концентрація цинку; Б – концентрація купруму; В – співвідношення Zn/Cu, $M \pm SD$, $n=8$.

Зазвичай, індекс співвідношення Zn/Cu не використовується в оцінці екотоксичності для водних видів, однак це є добре відомий індекс здоров'я людини і дисбаланс Zn/Cu у сироватці крові може свідчити про запалення (Kazi Tan et al., 2021). Попередньо, в НДЛ порівняльної біохімії та молекулярної біології ТНПУ було показано зниження співвідношення Zn/Cu під час дії пестициду Раундапу протягом 14 днів на *Unio tumidus* (Khoma et al., 2021), що

узгоджується з нашими результатами і свідчить про уніфікований характер цієї реакції на стрес.

3.1.4. Отримання та властивості металотіонеїнів синовіальної тканини щурів із карагенан-індукованим гонартритом

На сьогоднішній день, чимала кількість досліджень вказують на участь МТ при різних запальних станах (Lynes et al., 2006; El Ghazi et al., 2010; Vignesh and Deere, 2017). Одним із найяскравіших спостережень, які пов'язують ці термостабільні протеїни із запаленням, є їхня швидка відповідь, тому часто МТ класифікують як протеїни саме гострої фази. Відтак, наступним завданням цього дослідження було дослідити особливості відповіді МТ на запалення на прикладі карагенан-індукованого ГА. При цьому, було припущено, що індукція запального процесу може впливати на відтік цих протеїнів із клітин та змінювати металодепонувальну та антиоксидантну здатності МТ прямо чи опосередковано, впливаючи на хроматографічні та відновні їх властивості.

Використовуючи гель-розподільчу хроматографію, нам вдалося виявити присутність протеїнів з ознаками, які відповідають МТ, у синовіальних тканинах колінних суглобів щурів обох груп. Індекс поглинання світла D_{254}/D_{280} у обох груп був у межах 1,3-1,6, що свідчить про відсутність ароматичних амінокислотних залишків у їх складі (Рис. 3.6А).

Порівнюючи хроматографічні характеристики щурів з групи ГА та контрольних тварин (Рис. 3.6Б), можемо відмітити, що у перших профіль термостабільних протеїнів був більш вираженим, порівнюючи з контрольною групою, тобто індукований запальний процес викликав збільшення об'єму виділення МТ.

Ймовірно, функції МТ у клітинах і в позаклітинному просторі можуть бути різними (Lynes et al., 2006). У цьому дослідженні присутність МТ у синовіальній тканині та підвищення їх концентрації в ГА-групі свідчить про їх участь у відповіді на запалення. Крім того, у тварин з патологією хроматограма містила додатковий пік речовин з більшою молекулярною масою. Це може бути

результатом зниження стабільності МТ у пошкодженій тканині та частковою окиснювальною їх олігомеризацією (Wilhelmsen et al., 2002). Причиною цієї модифікації може бути окисне руйнуванням зв'язку між двома метал-тіолатними доменами та окиснення тіолів з утворенням олігомерів. Крім того, наслідком цього окиснення може бути втрата властивостей зв'язування металу і, як результат, порушення гомеостазу Zn.

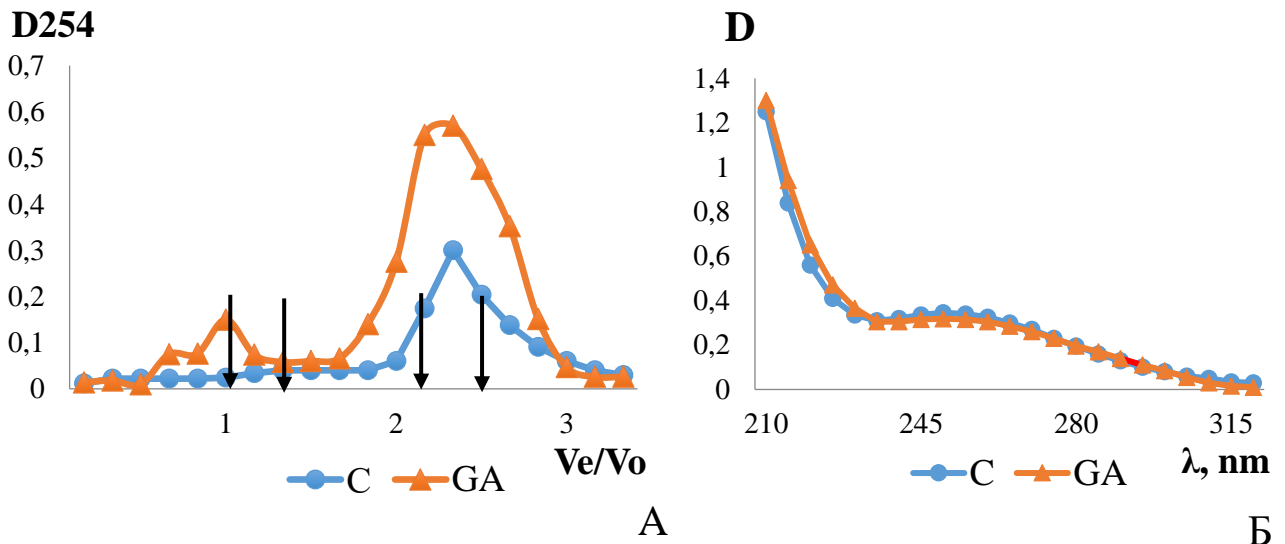


Рис. 3.6. Профілі елюції (А) та УФ-спектри (Б) термостабільного супернатанту синовіальних тканин колінного суглоба щурів із гострим гонартритом (GA) та контрольних тварин (С), отриманих методом хроматографії на сефадексі G-50

Примітка: На рис. А: стрілками виділено об'єм елюції маркерів: альбумін (66,0 кДа), хімотрипсин (25,0 кДа), цитохром с (12,3 кДа), інсулін (5,8 кДа), які мають параметри елюції 1,0; 1,3; 2,2; 2,5 V_e/V_o відповідно; V_e – об'єм елюції; V_o – зовнішній об'єм гелю.

Загалом, при патології ГА нами передбачалося два напрями функціонування МТ у тканині суглоба щурів. Перш за все, збільшення концентрації МТ при запаленні може свідчити про їх участь у реакції на окисний стрес. У нашому дослідженні рівень загального протеїну МТ (MTSH) у ГА-групі був значно підвищений (на 79 %) (Рис. 3.7А). Дослідження Sun et al. (2018) продемонструвало локальне підвищення рівня МТ у суглобі при

індукованому колагеному артриті, яке впливало на пригнічення синовіального запалення та зміщувало баланс субгруп лімфоцитів із протилежними діями.

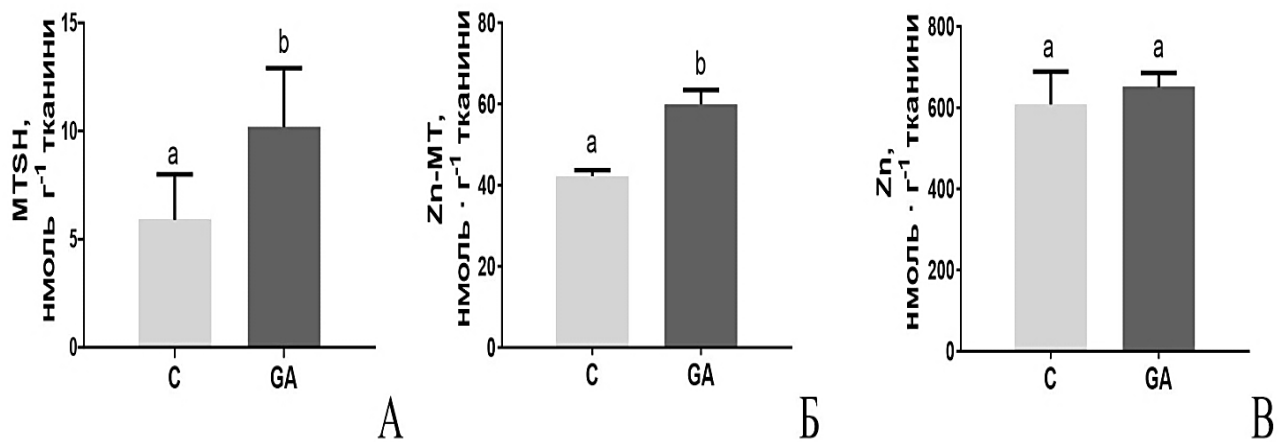


Рис. 3.7. Концентрація металотіонеїнів (А), металотіонеїн-зв'язаного цинку (Б) та концентрація загального цинку (В) в тканинах колінного суглоба щурів із гострим гонартитом (GA) та контрольних тварин (C), $M \pm SD$, $n=8$.

Інша важлива функція МТ, яка може мати місце при досліджуваній патології – це участь у зв'язуванні Zn. Структура МТ дозволяє буферизувати Zn усередині клітини та забезпечувати його регуляторну передачу до інших клітинних мішеней. Запальні процеси доволі часто супроводжуються дефіцитом цього есенціального елемента в організмі. МТ зв'язували близько 6,95 % загального Zn у тканинах у С-групі та 9,21 % у тварин із патологією. А втім, зіставлення отриманих нами результатів демонструє, що збільшення загальної концентрації МТ в GA-групі супроводжувалося їх недовантаженням Zn, оскільки рівень Zn-МТ хоч і був підвищений, але у відносно меншій кількості (на 46 %), ніж рівень загального МТSH (Рис. 3.7Б). Відповідно, частка недостатньо металюваних МТ у загальному пулі цього протеїну зросла в GA-групі, порівнюючи з контролем, що можна пояснити частковим окисненням тіолових груп у МТ. Ці термостабільні протеїни захищають клітини від тривалого виробництва прозапальних цитокінів у підвищеній кількості, чому сприяє виділений МТ Zn, який встановлює перехресний зв'язок між МТ і запальними цитокінами (Gonzalez-Iglesias et al., 2014). Відтак, вивільнення Zn для оптимальної імунної відповіді (зокрема, екстратимічний Т-клітинний шлях)

є одним із механізмів захисної ролі МТ при запаленні (Mocchegiani et al., 2006). На дисбаланс МТSH та їх металюваної форми вказувалося в нечисленних дослідженнях на добре відомих модельних організмах, двостулкових моллюсках, які піддавалися різним стресовим впливам у нативних умовах проживання або при експериментальних впливах (Gnatyshyna et al., 2020b; Khoma et al., 2021).

Відтак, попри збільшення відсотку апо-форми МТ у тварин із запаленням, порівнюючи з контрольною групою, причиною підвищення показника Zn-МТ може служити підвищена експресія термостабільного протеїну.

Участь Zn в імунній резистентності добре відома, і у пацієнтів із артритом спостерігалось зниження рівня Zn у плазмі крові (Krezel and Maret, 2016; Gammoh and Rink, 2017), що пояснюється опосередкованим цитокінами зниженням здатності альбуміну зв'язувати Zn (Silva et al., 2016). У нашому дослідженні загальна концентрація Zn у тканинах GA-групи істотно не відрізнялася, порівнюючи з контрольною групою (Рис. 3.7B). Отже, загальне збільшення частки металювання МТ мало місце завдяки розподілу есенціального Zn між МТ та іншими металопротеїнами.

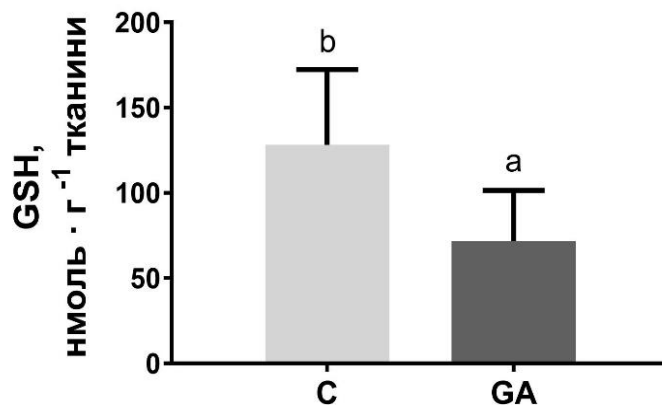


Рис. 3.8. Концентрація загального глутатіону (GSHt) у тканинах колінного суглоба щурів із гострим гонартритом (GA) та контрольних тварин (C), $M \pm SD$, $n=8$.

Рівень GSH також знизився на 28 %, що може сприяти його неспроможності захистити ліпіди від окисних ушкоджень (Рис. 3.8). Відтак, зниження концентрації цього низькомолекулярного тіолу може служити

вирішальним фактором, який впливає на порушення стабільності металтіолатних кластерів у МТ та послабленню їх буферної функції.

Отже, проведені дослідження довело присутність МТ у колінних суглобах щурів та зміну їх властивостей при патології гострого ГА. Згідно дослідженої нами літератури, можемо зробити висновок, що у сучасних роботах дуже рідко порівнюються індекси МТSH і Zn-МТ (Krezel and Maret, 2016). Проте використання такого поєднання дає змогу виявити недостатню металізацію МТ, що є прогностичним маркером при багатьох станах. Крім того, було виявлено, що інші Zn-зв'язуючі протеїни недостатньо металізовані Zn. Оцінка рівня МТ та хроматографічний профіль може бути використаний для оцінки пошкодження синовіальних тканин при дегенеративному захворюванні колінного суглоба.

Висновок до підрозділу

Таким чином, функціонування МТ аборигенних молюсків при впливі однакових викликів довкілля мало відмінності, порівнюючи з інвазивною популяцією, які проявлялися у залученні МТ при усіх еспозиціях (за винятком МР) до посиленого накопичення Zn, що сприяє його депонуванню та вилучає із пулу лабільної форми для забезпечення інших молекулярних мішеней цим есенціальним металом. Крім того, за впливу експозицій аборигенні молюски (у групах МР, Міх) залучали GSH як низькомолекулярний клітинний тіол, що сприяє посиленню Zn-буферних властивостей МТ. Отже, МТ аборигенної та інвазивної популяції властива різна стратегія у метаболізмі цинку, яка пояснюється відмінностями у стабільностях тіолів як похідному від редокс-стану в тканинах. Відповідно, кінцеві несприятливі шляхи, пов'язані з Zn-залежними процесами, можуть бути різними у двох популяціях. На моделі гострого запального процесу у щурів було виявлено дисбаланс метальованої та апоформ МТ та пригнічення рівня GSH. На прикладі інвазивних молюсків було продемонстровано, що зменшення співвідношення Zn/Cu у тканинах свідчить

про зростання ризику посилення окисних та модуляцію цинк-залежних сигнальних процесів.

Тим не менш, у двох серіях дослідження уніфікована роль МТ виявляється у зростанні концентрації/частки апо-форми МТ у інвазивних *Ca*, *Mix*, *MixT* та аборигенній *MP*-групах молюсків, а також, при ГА у щурів, що свідчить про їх здатність проявляти антиоксидантний потенціал за впливу імуномодуляторів та запалення. Така їх участь може бути пов'язана із необхідністю компенсування інших антиоксидантних чинників. Саме тому, наступним нашим завданням було оцінити систему антиоксидантного захисту двостулкових молюсків та лабораторних щурів за умов еспозиції імуномодуляторами та впливу запалення.

Представлені у підрозділі 3.1. результати опубліковано у статтях (Matskiv et al., 2021; Matskiv and Stoliar, 2023; Matskiv et al., 2024).

3.2. Дослідження проявів окисного/відновного стресу в інвазивних і аборигенних молюсків та лабораторних щурів за впливу на організм імуномодулюючих стресорів

3.2.1. Вплив мікропластику та кофеїну поокремо та в суміші за двох температурних режимів на стан системи окисного/відновного стресу в аборигенній та інвазивній популяціях *D. polymorpha*

Відомо, що за стресових умов можуть утворюватися надлишкові рівні АФК, які усуваються антиоксидантними ензимами у високоспецифічних реакціях зі специфічними субстратами (Regoli and Giuliani, 2014). АФК можуть утворюватися в клітинах і тканинах із внутрішніх (таких як запалення), зовнішніх джерел (вплив ксенобіотиків), або як наслідок зниження захисної здатності організму. Цитотоксичні ефекти впливу АФК включають ПОЛ клітинної мембрани через окиснення поліненасичених жирних кислот, інактивацію ензимів та зміну окисно-відновного балансу (Luna-Acosta et al., 2011a; Luna-Acosta et al., 2011b). Оцінка стану окисного/відновного стресу рекомендована як індикатор раннього попередження токсичних ефектів у

водних організмів (Aguirre-Martinez et al., 2015). При цьому, відповіді організму опосередковуються ензимами антиоксидантного захисту, включаючи супероксиддисмутазу та каталазу (Aguirre-Martinez et al., 2013)

Порівняння двох контрольних груп молюсків після періоду експозиції показало менший рівень прояву антиоксидантів у аборигенній Kh-популяції, що відзначалося для Cu,Zn-SOD, Mn-SOD та каталази (Рис. 3.9).

Особливий інтерес серед застосованих до молюсків чинників викликав вплив саме кофеїну, оскільки останнім часом часто повідомляється про антиоксидантний потенціал цієї сполуки та її проявів, пов'язаних з окисним стресом (Tellone, 2015). У нашому дослідженні серед усіх впливів лише кофеїн у аборигенній групі не викликав змін антиоксидантів, порівнюючи з контролем.

Загалом, дія досліджуваних чинників на реакцію окисного стресу проявлялась у двох популяціях дрейсени з подібними закономірностями за виключенням SOD. Для Cu,Zn-SOD вплив чинників на організм поокремо майже не викликав змін активності за виключенням інвазивної Caf-групи. Разом з тим, у групах T, Mix обох популяцій та у MixT інвазивної спостерігалась значна її активація, що особливо виявлялось за впливу суміші (до 2,5 рази в інвазивній Mix-групі) (Рис. 3.9А).

У молюсків інвазивної Tn-популяції Mn-SOD мало змінювала свою активність при експозиціях (за винятком пригнічення у T і MP-групах), тоді як у аборигенній популяції спостерігалась різноманітність відповідей, які проявлялись у її інгібуванні за теплового та комбінованих впливів та зростанні активності за впливу MP (Рис. 3.9Б). Відтак, за найбільш екстремальних умов (тепловий чинник та дія сумішей) спостерігалось пригнічення мітохондріальної та активація цитозольної ізоформ SOD, що мало місце в обох популяціях, проте у більшій мірі аборигенній.

Активність каталази змінювалась найбільш послідовно в обох популяціях за впливу суміші (зростала), тоді як поодинокий вплив кофеїну сприяв зниженню її активності в інвазивних представників, а вплив теплового чинника

поодинокі та у суміші пригнічував її активність у аборигенних молюсків (Рис. 3.9В).

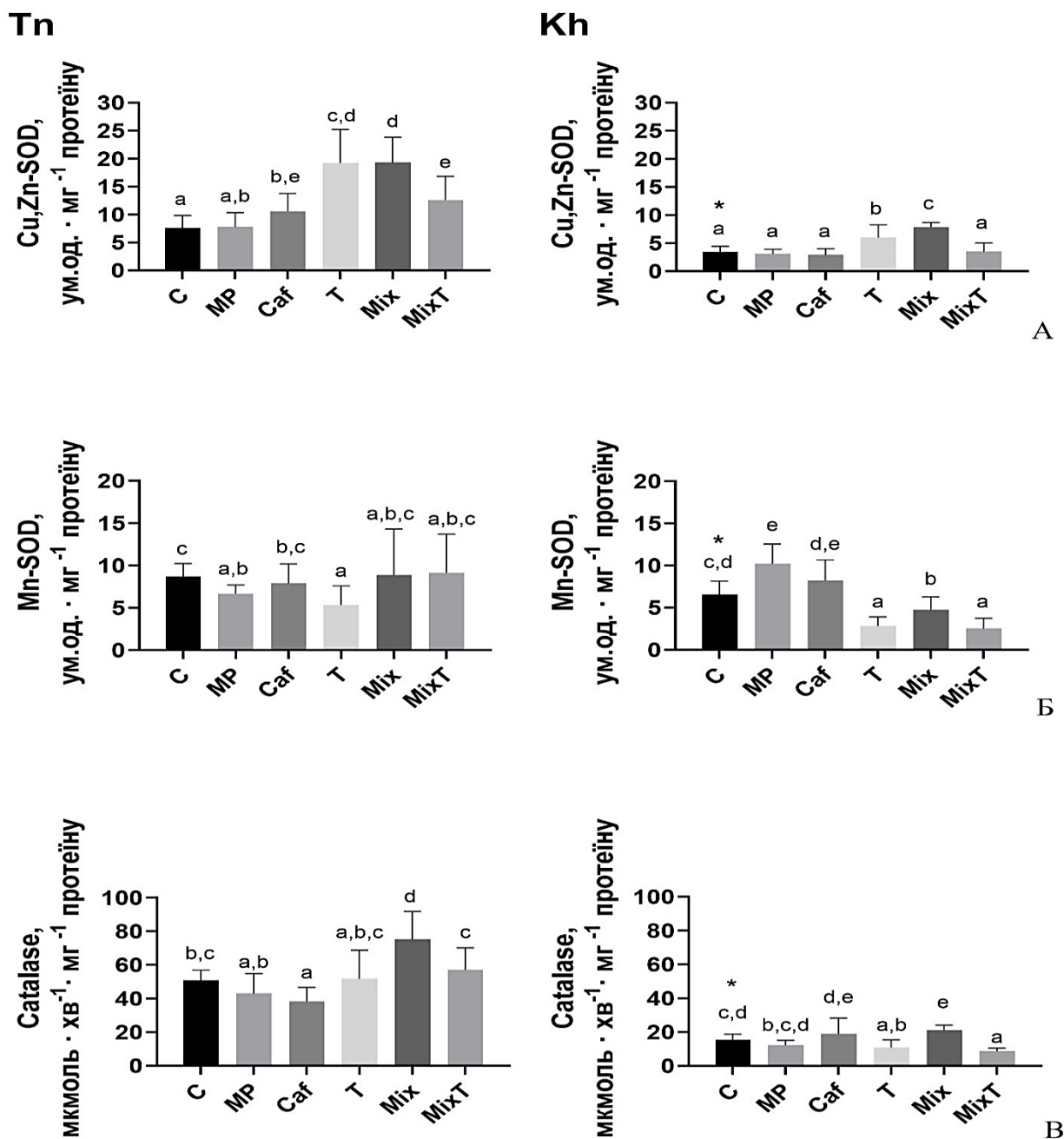


Рис. 3.9. Антиоксидантна активність в м'яких тканинах двостулкового молюска *D. polymorpha* за впливу мікропластику (MP), кофеїну (Caf), нагрівання (Т, 25 °С) та сумішей кофеїну та мікропластику при 18 °С (Mix) та 25 °С (MixТ) протягом 14 днів: А – активність Cu,Zn-SOD; Б – активність Mn-SOD; В – активність каталази, $M \pm SD$, $n=8$.

Відтак, серед впливів окремих чинників експозиція кофеїном викликала більш помітну відповідь антиоксидантів у інвазивній популяції та проявлялася

в активації Cu,Zn-SOD та інгібуванні активності каталази. Разом з тим, у аборигенній популяції, як і у випадку МТ, змін активностей антиоксидантів при цьому впливі не спостерігалось.

Дослідження та порівняння прооксидантних процесів у контрольних груп молюсків двох популяцій виявило відмінності з вищим значенням окисних ушкоджень ліпідів (TBARS), але меншим рівнем утворення протеїнових карбонілів (PC) у аборигенній контрольній групі, порівнюючи з інвазивною (Рис. 3.10).

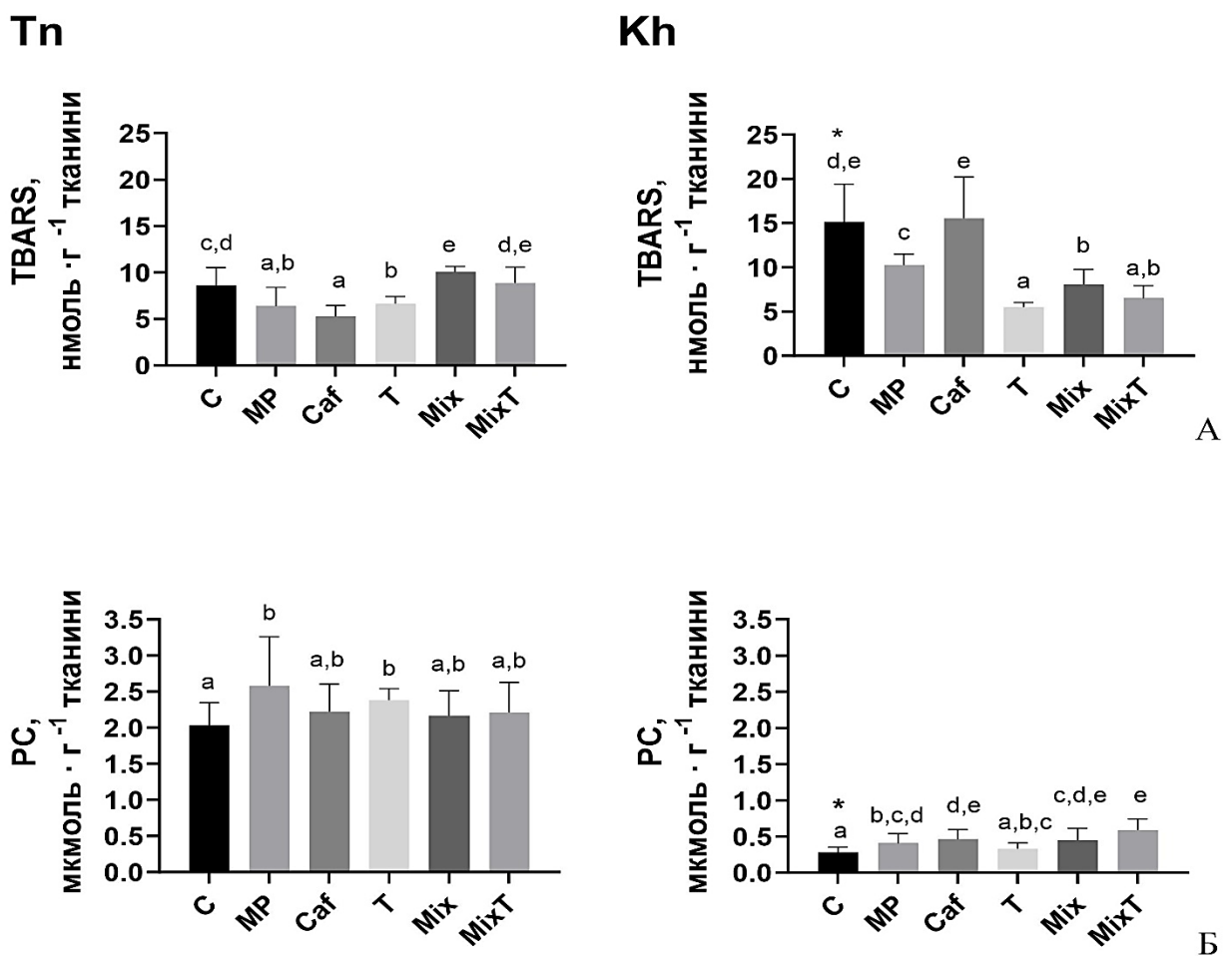


Рис. 3.10. Рівні окисних пошкоджень у м'яких тканинах двостулкового молюска *D. polymorpha* за впливу мікропластику (MP), кофеїну (Caf), нагрівання (Т, 25 °С) та сумішей кофеїну та мікропластику при 18 °С (Mix) та 25 °С (MixT) протягом 14 днів: А – ТБК-активні продукти (TBARS); Б – протеїнові карбоніли (PC), $M \pm SD$, $n=8$.

За впливу досліджуваних чинників прооксидантні прояви стану ліпідів були виражені лише за комплексної експозиції (Mix-групі) інвазивних

моллюсків. Усі експоновані групи аборигенної Kh-популяції (окрім Caf-групи), а також усі поодинокі впливи в інвазивній Tn-популяції (MP, Caf та T-групи) знижували рівень TBARS (Рис. 3.10А). Більше прооксидантних змін було відображено для РС (Рис. 3.10Б). У інвазивних моллюсків MP і нагрівання, а в аборигенних представників усі впливи, крім нагрівання, підвищували рівень РС (до 2,1 раза в аборигенній МіхТ-групі). Таким чином, окисне ураження протеїнів виявилось більш вразливим, особливо в аборигенній популяції.

Таким чином, у цій дослідній серії результати довели, що кофеїн, навіть за екологічно реальних концентрацій, індукує окисний стрес у аборигенних моллюсків, оскільки поодинокі експозиції кофеїном викликали підвищення рівня окисних ушкоджень протеїнів у цій популяції. З огляду на те, що традиційно оцінка токсичності здійснюється протягом гостротоксичної дії, ці результати є особливо важливими.

Незбалансований рівень активностей ключових ензимів, які беруть участь у антиоксидантному захисті, таких як SOD та рівні утворення малонового діальдегіду, може запускати фенолоксидазну систему гуморального імунного захисту у двостулкових моллюсків (Cerenius and Söderhäll, 2021; Luna-Acosta et al., 2011a; Luna-Acosta et al., 2011b). Тому наступним завданням дослідження стало оцінити активність цього ензиму.

3.2.2. Стан фенолоксидазної активності за впливу на організм мікропластику, кофеїну та їх суміші за двох температурних режимів

Фенолоксидазна активність (PhO) була найбільш вагомою характеристикою імунорезистентності у нашому дослідженні. PhO є купрум-залежною оксидоредуктазою, яка бере участь склеротизуванні кутикули, загоєнні ран і захисті від паразитів шляхом синтезу меланіну та його похідних, окисненні фенолів, які відіграють важливу роль в імунітеті безхребетних (Al-Khalafah and Al-Nasser, 2018). Внаслідок своєї токсичності (бактерицидної, фунгіцидної та противірусної дії), продукти окиснення залучаються до процесу боротьби з патогенами (Luna-Acosta et al., 2011b; Luna-Acosta et al., 2017).

Зважаючи на те, що реакції за участю PhO зазвичай потребують присутності кисню, можливе також неензимне окиснення субстрату PhO, яке ми контролювали у ході експерименту. Так, загальна активність PhO в аборигенній контрольній групі вірогідно відрізнялася від відповідної групи інвазивної популяції, проявляючи в 1,7 раза нижчі значення. За експозицій у обох популяціях на активність ензиму не впливав кофеїн, тоді як вплив МР викликав зниження активності PhO, що може свідчити про знижену здатність молюсків протистояти інфекційним захворюванням при цій експозиції (Breitwieser et al., 2018). Вплив нагрівання та сумішей сприяли одностайній активації PhO до 1,8 раза в Міх-групах інвазивних та аборигенних молюсків, що відповідає типовій реакції активації імунореактивності обох популяцій (Рис. 3.11А). Це свідчить про кумулятивний ефект комбінованого та температурного чинників як уніфіковану реакцію виду.

Відомо, що стан імунорезистентності пов'язаний із метаболізмом металів і PhO, як металопротеїн, може змінювати свою активність завдяки невеликим змінам у центрі зв'язування металу шляхом вибору різних іонів. Відтак, активність фенолоксидази може бути посилена іонами Mg^{2+} та інгібована Cu^{2+} і Zn^{2+} (Zhou et al., 2010), що створює необхідність комплексного підходу до вивчення її активності.

Тим не менш, родина PhO включає тирозинази, катехолоксидази та лаккази (Luna-Acosta et al., 2010; Le Bris et al., 2013). Ми спрямовували свою увагу саме на вивчення лакказної активності, оскільки цей тип ензимів найбільш часто вживається для оцінки стану організму безхребетних, особливо двостулкових (Gagnaire et al., 2004). Лаккази призводять до окиснення ароматичних сполук через непрямий механізм з використанням окисного проміжного продукту (Dodor et al., 2004) і, на відміну від тирозиназ, вони не виявляють монофенолазної активності (Claus, 2010). Для визначення лакказної активності, ми використовували специфічний інгібітор лаккази ЦТАБ. Більшість інгібіторів PhO є купрум-хелаторами. Використаний нами інгібітор

відомий як катіонний детергент, причому це єдиний специфічний інгібітор саме лаккази, а не інших PhO, який не впливає на аутоокиснення субстратів лаккази.

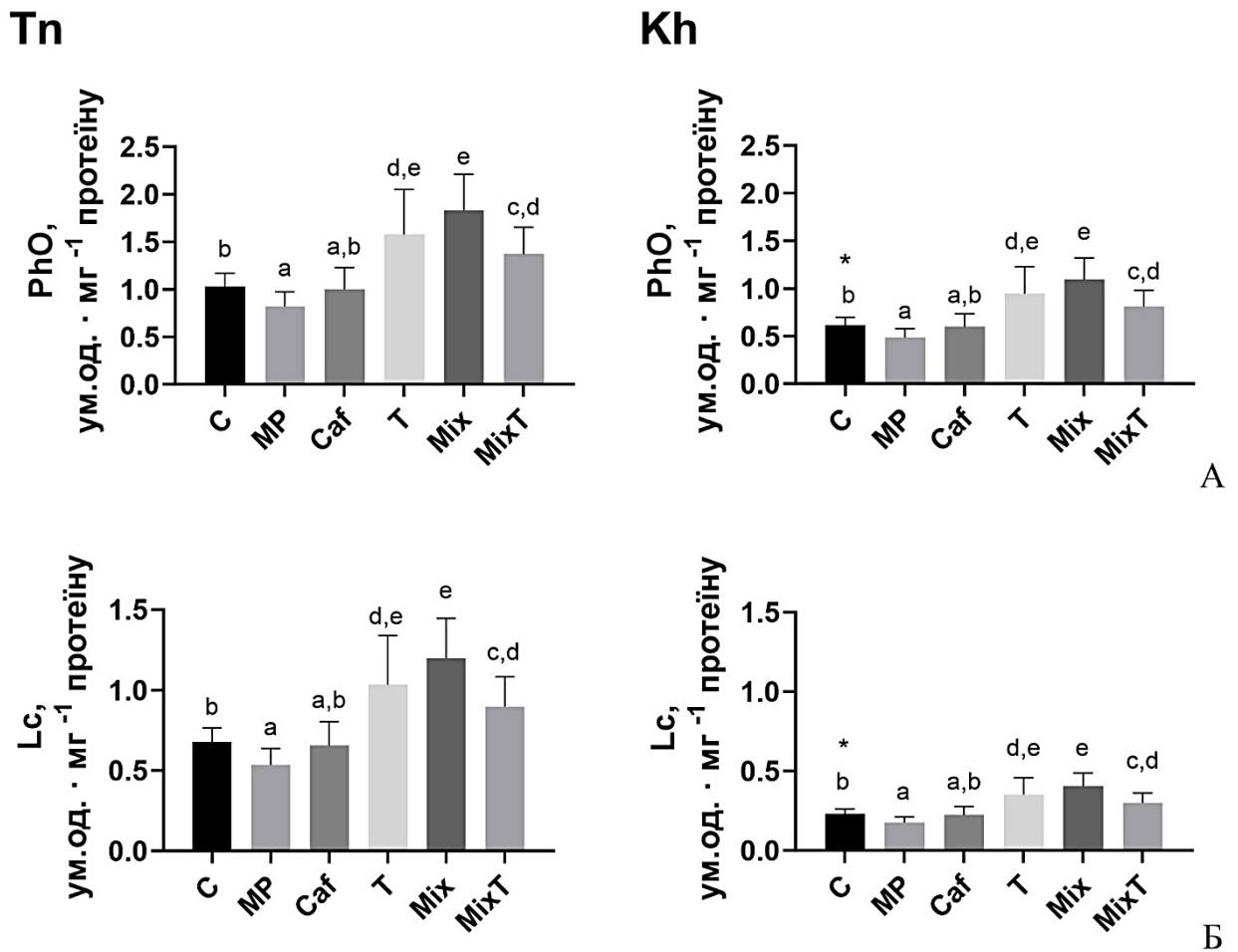


Рис. 3.11. Загальна активність фенолоксидази (А) та лаккази (Б) у м'яких тканинах двостулкового молюска *D. polymorpha* за впливу мікропластику (MP), кофеїну (Caf), нагрівання (Т, 25 °С) та сумішею кофеїну та мікропластику при 18 °С (Mix) та 25 °С (MixT) протягом 14-ти днів, $M \pm SD$, $n=8$.

Деякі нещодавні дані вказують на безпосередню імунну роль лаккази. Дослідження Shi et al. (2017) виявили, що креветки *Litopenaeus vannamei* з генетично-модифікованою відсутністю лаккази виявляли більшу сприйнятливість до різних бактеріальних інфекцій. Окрім того, експерименти *in vitro* Quinn et al. (2020) продемонстрували, що продукти реакції лаккази та катехолоксидази червононогих молюсків виявляють антимікробну активність. У нашому дослідженні, як і у випадку загальної PhO, активність лаккази також знижувалася за імуномодулюючого впливу MP та зростала за нагрівання та

комбінованих впливів в обох популяціях (Рис. 3.11Б). При цьому, на активність лаккази припадало до 2/3 загальної активності ензиму.

Варто зазначити, що у присутності поліароматичних вуглеводнів ген лаккази виявляє підвищену експресію, що свідчить про потенціал використання лаккази як біомаркера забруднення цими речовинами (Luna-Acosta et al., 2010). А втім, у нашому дослідженні ароматична сполука кофеїн не впливала на активність цього ензиму.

Відтак, пригнічення імунореактивності у двох популяціях за впливу МР та підвищення її активації за теплових та комбінованих впливів вказує на спільну стратегію відповіді імунореактивності в аборигенних та інвазивних молюсків при досліджуваних факторах, проте інтенсивність імунореактивних відповідей проявляється вищою в інвазивній популяції. Проведене дослідження вперше дало змогу порівняти імуномодулюючий вплив МР на аборигенних та інвазивних популяціях молюсків *D. polymorpha*.

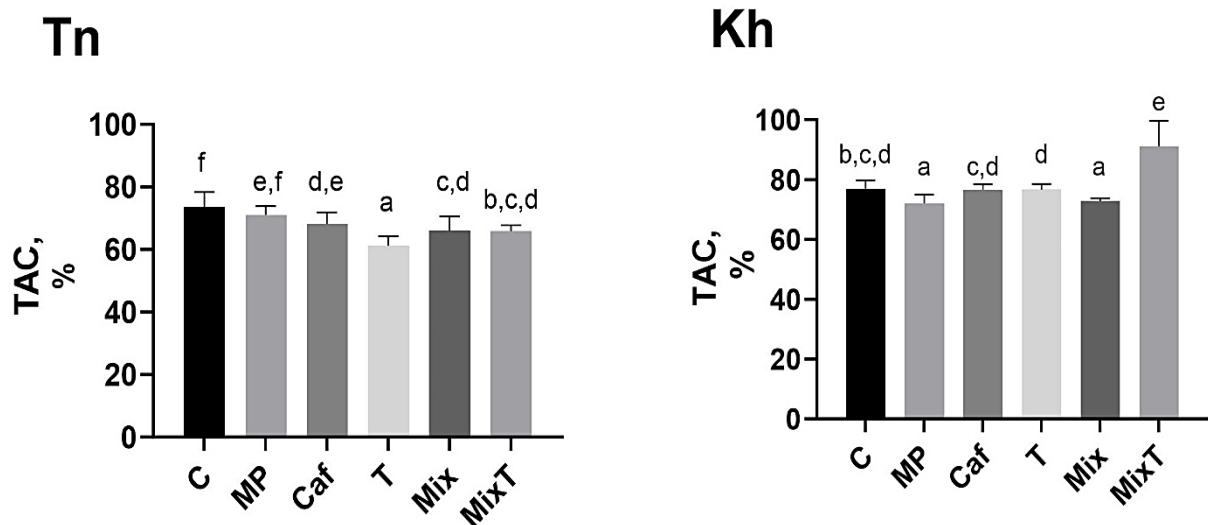


Рис. 3.12. Загальна антиоксидантна активність (ТАС) в м'яких тканинах двостулкового молюска *D. polymorpha* за впливу мікропластику (МР), кофеїну (Caf), нагрівання (Т, 25 °С) та сумішей кофеїну та мікропластику при 18 °С (Міх) та 25 °С (МіхТ) протягом 14-ти днів, $M \pm SD$, $n=8$.

Вимірювання загальної антиоксидантної здатності (ТАС) щодо знешкодження вільних радикалів не показало відмінностей між двома контрольними групами молюсків (Рис. 3.12). При експозиціях цей показник

зменшувався у всіх групах інвазивних моллюсків (крім МР-групи), що може вказувати на збільшене виробництво вільних радикалів та окисний стрес, або підвищену сприйнятливість до окисного пошкодження (Christou and Gourgoulianis, 2003). Проте у аборигенній популяції ТАС зменшувалась лиш за впливу МР і Міх та зростала у групі МіхТ, що може бути адаптацією до підвищеного окисного стресу за цього впливу. Загалом, ці відмінності хоча і були вірогідними, проте у малому діапазоні.

3.2.3. Вплив карагенан-індукованого гонартриту на стан системи окисного/відновного стресу у синовіальній тканині лабораторних щурів

Деякі АФК, такі як кисневмісні вільні радикали, розглядаються як медіатори запалення, які впливають на мікросередовище організму, що призводить до виникнення захворювань (Forrester et al., 2018). У нашому дослідженні підвищення рівня МТ при гострому ГА також може прогнозувати їх можливу участь у окисно-відновному контролі через поглинання АФК, оскільки МТ складаються приблизно на 30 % із залишків цистеїну, які є дуже чутливими до окиснення (Maret, 2019). Крім того, більш високі рівні антиоксидантів спостерігалися у пацієнтів із ревматоїдним артритом, порівняно зі здоровими особинами, однак рівень їх активації був недостатній для запобігання окисного пошкодження (Garcia-Gonzalez et al., 2015).

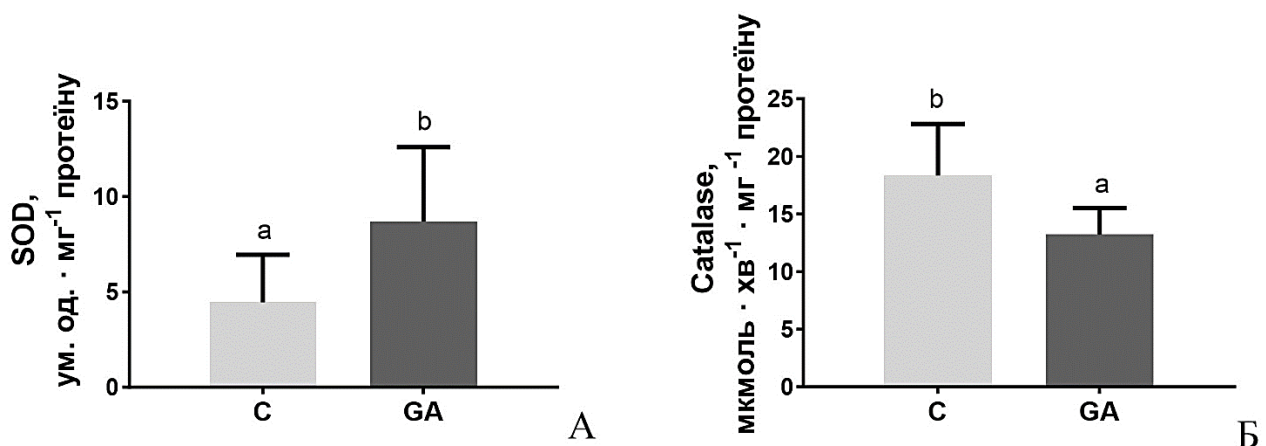


Рис. 3.13. Антиоксидантна активність у тканинах колінного суглоба щурів із гострим гонартритом (GA) та контрольних тварин (C): А – активність SOD; Б – активність каталази, $M \pm SD$, $n=8$.

При патології гострого ГА активність SOD була збільшена у 2,0 раза, що може бути тимчасовою відповіддю на окисний стрес, викликаний запаленням. При цьому, активність каталази зменшувалась у 1,4 раза, порівнюючи з контрольною групою (Рис. 3.13). Відтак, мав місце дисбаланс між двома етапами антиоксидантного процесу (функціонування каталази і SOD). Значне зниження активності каталази може призводити до неможливості видалення H_2O_2 , який утворюється при підвищеній активності SOD, накопичення якого сприяє посиленню ПОЛ. Тому наступним етапом була оцінка окисних ушкоджень ліпідів та протеїнів.

Рівень окисних ушкоджень протеїнів (PC) у групі з патологією не відрізнявся від контрольного значення (Рис. 3.14А). Проте наявність окисних процесів проявлялася у збільшенні частки ушкоджень ліпідів (TBARS) у тварин із ГА на 59 % (Рис. 3.14Б), що спровоковано інгібуванням активності каталази щурів із запаленням.

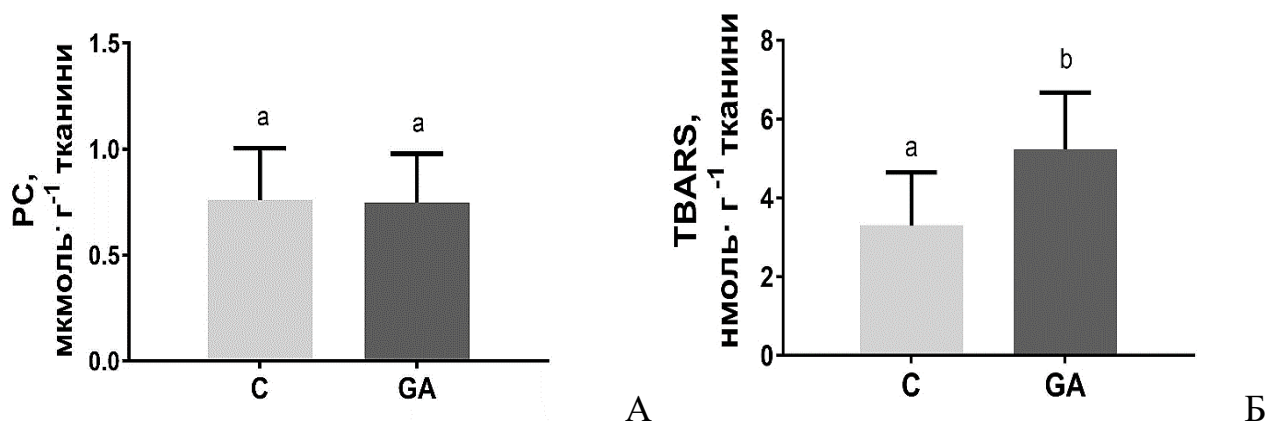


Рис. 3.14. Індекси окисного стресу у тканинах колінного суглоба щурів із гострим гонартритом (GA) та контрольних тварин (C): А – рівень протеїнових карбонілів (PC); Б – рівень перекисного окиснення ліпідів (TBARS), $M \pm SD$, $n=8$.

Тим не менш, дослідження загального антиоксидантного потенціалу (ТАС) не дало вірогідно відмінних від контрольного значення результатів (Рис. 3.15).

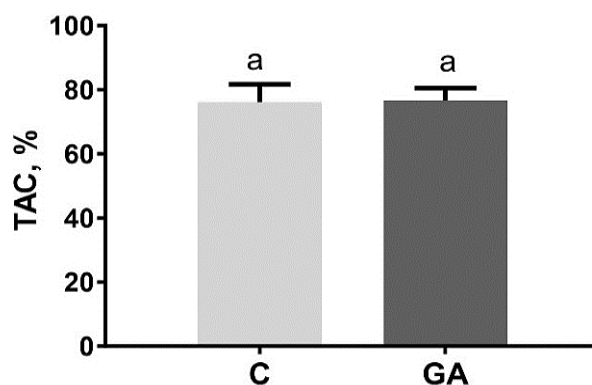


Рис. 3.15. Загальна антиоксидантна активність (ТАС) у тканинах колінного суглоба щурів із гострим гонартритом (GA) та контрольних тварин (C), $M \pm SD$, $n=8$.

Отож, дисфункція системи антиоксидантного захисту при досліджуваній патології спричиняє окисно-відновний дисбаланс і призводить до того, що організм перебуває у стані перекисного окиснення, що ускладнює видалення АФК. Крім того, отримані результати підтверджують теорію, що саме окисний стрес під час запалення сприяє вивільненню металів із тіолатних кластерів у МТ, забезпечуюючи їх розподіл між клітинними мішенями та залучення МТ у видаленні АФК.

Висновок до підрозділу

Таким чином, аналіз системи антиоксидантного захисту дозволив виявити тісні зв'язки між досліджуваними факторами та реакціями організму. Порівняння контрольних груп молюсків з двох територій показало, що аборигенна популяція мала менший стресовий вплив, проте за експозиційних чинників ця популяція виявилася більш вразливою та виявляла меншу резистентність, що відобразалося в індукції прооксидантних процесів у всіх експозиційних групах (окрім аборигенної Т-групи). Вплив МР викликав активацію Mn-SOD у аборигенних представників та пригнічення імунореактивності у обох популяцій, тоді як експозиція кофеїном давала маловідчутні відповіді за сумою показників у інвазивних молюсків, проте

викликала прояви окисного стресу в аборигенній Caf-групі. Вплив суміші виявляв кумулятивний ефект, який проявлявся у підвищенні активностей Cu,Zn-SOD, каталази та PhO обох популяцій, а також рівня окисних ушкоджень ліпідів у інвазивних представників. Поодиноким впливом температури сприяв підвищенню рівня ушкодження протеїнів та зниженню TAC у інвазивній T-групі, тоді як у T- та MixT-групах обох популяцій простежувалась активація імунореактивності молюсків.

Дослідження стану суглобових тканин щурів з гострим ГА показало дисбаланс антиоксидантної активності, який проявлявся в активації SOD та пригнічення активності каталази. Наслідком цього є посилення рівня окисних ушкоджень ліпідів у тканинах.

Представлені у підрозділі 3.2. результати опубліковано у статтях (Matskiv et al., 2021; Matskiv et al., 2024).

3.3. Оцінка ступеню токсичності впливу імуномодулюючих стресорів на *D. polymorpha* з двох популяцій та лабораторних щурів

3.3.1. Вплив мікропластику та кофеїну поокремо та в суміші за двох температурних режимів на показники апоптозу та аутофагії у *D. polymorpha* з двох популяцій

Загальновідомо, що індукований стресом апоптоз може стати біомаркером для моніторингу сублетальних ефектів за впливу різноманітних екологічних стресорів (Busch et al., 2004). Одна з гіпотез успішності інвазій стверджує, що швидке поширення інвазивних видів обґрунтовується швидким відновленням популяції, підвищеною плодючістю та короткочасністю життєвого циклу особин (McMahon, 2002). Саме тому, важливо було дослідити активність ензимів апоптозу та аутофагії в аборигенній та інвазивній популяціях молюсків за впливу стресорів.

Активності каспази-3 і загального катепсину Д (CtDt) були значно вищими у контрольній групі інвазивної популяції (TnC) (в 1,8 та 1,5 раза

відповідно), порівнюючи з аборигенною (KhC). Позалізосомальна активність CtD (CtDe) була однаковою в обох контрольних групах (Рис. 3.16, 3.17).

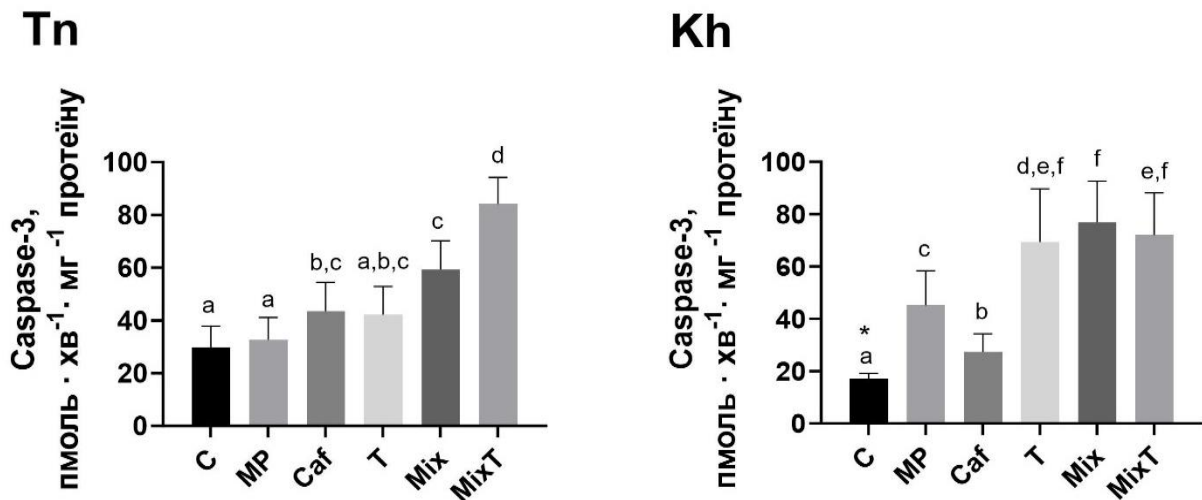


Рис 3.16. Активність каспази-3 у м'яких тканинах двостулкового молюска *D. polymorpha* за впливу мікропластику (MP), кофеїну (Caf), нагрівання (Т, 25 °С) та сумішшю кофеїну та мікропластику при 18 °С (Mix) та 25 °С (MixT) протягом 14-ти днів, $M \pm SD$, $n=8$.

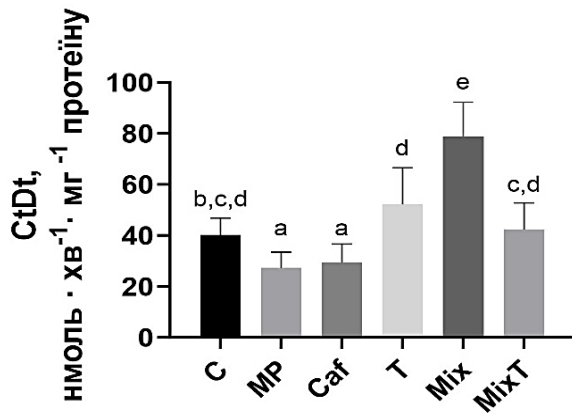
Експозиція підвищувала активність головного виконавчого ензиму апоптозу у цитозолі каспази-3 у більшості випадків в обох популяціях (за винятком інвазивних MP- і Т-груп), причому, максимальна активність спостерігалась при теплових та комбінованих впливах (до 2,8 раза в інвазивній MixT- та 4,5 раза в аборигенній Mix-групах) (Рис. 3.16).

Більшість відповідей CtD (загального та позалізосомального) на кожен експозицію були подібними в обох популяціях, що свідчить про спільну стратегію протистояння експериментальним викликам (Рис. 3.17).

Відомо, що лізосомальна аспартат-протеаза CtD відіграє вирішальну роль в імунній відповіді (Benes et al., 2008). У нашому дослідженні активність CtD залежала від тяжкості впливу. Загальна та позалізосомальна активності ензиму були знижені за впливу MP та Caf, тоді як комбінований вплив спровокував значне підвищення загального CtD у Mix-групах обох популяцій. Експозиція сумішшю (Mix) в аборигенній популяції провокувала активність позалізосомального ензиму (CtDe), що може свідчити про посилену

опосередковану лізосомами загибель клітин і генерацію лізосом при дії суміші кофеїну з МР. Відомо, що якщо CtD вивільняється з лізосом назовні, то спричиняє некроз тканин. Тобто, активність сприяє руйнуванню вмісту тканин.

Tn



Kh

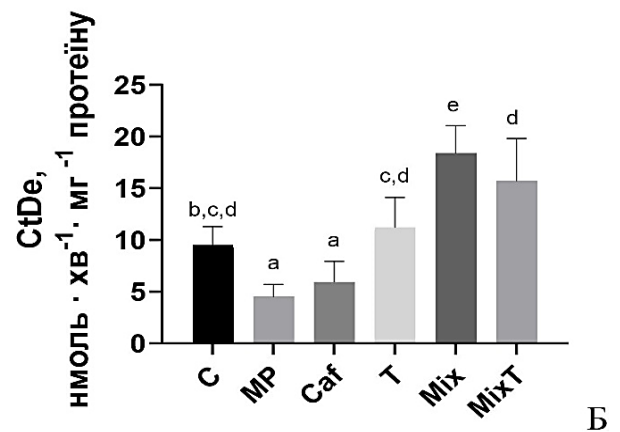
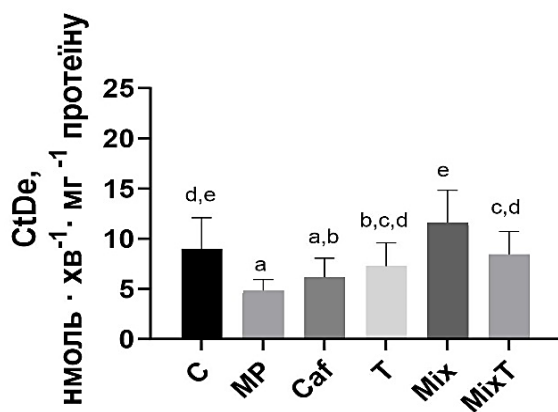
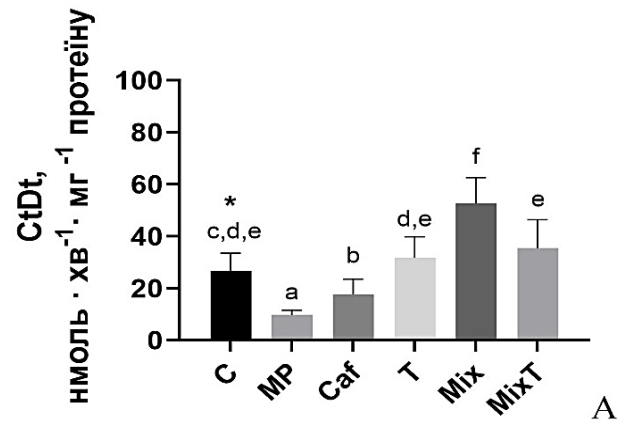


Рис.3.17. Апоптотна активність у м'яких тканинах двостулкового молюска *D. polymorpha* за впливу мікропластику (MP), кофеїну (Caf), нагрівання (Т, 25 °С) та сумішей кофеїну та мікропластику при 18 °С (Mix) та 25 °С (MixT) протягом 14-ти днів: А – загальна активність катепсину Д (CtDt); Б – вільна (позалізосомальна) активність катепсину Д (CtDe), $M \pm SD$, $n=8$.

Варто зазначити, що молекулярні механізми стимуляції загибелі клітин лізосомальними протеазами ще не до кінця досліджені. Сучасна концепція стверджує, що порушення цілісності мембран лізосом є ранньою стадією в сигнальному каскаді апоптозу, яка передуює зміні потенціалу мітохондріальної мембрани та вивільненню апоптогенних факторів. Тому наступним завданням

було оцінити цілісність лізосом у аборигенній та інвазивній популяціях молюсків.

3.3.2. Дослідження цілісності лізосомальних мембран молюсків за впливу імуномодуляторів при різних температурних режимах

Серед усіх відповідей організму молюсків, найбільш спільною реакцією було зниження цілісності мембран лізосом (NRR-тест), виявлене за усіх впливів і для обох популяцій (незважаючи на вищий рівень стабільності лізосом у аборигенних контрольних групах) (Рис. 3.18). Загалом, у двостулкових молюсків реакції на ксенобіотики, включаючи кофеїн і МР (Moore et al., 2008; Aguirre-Martínez et al., 2013; Khoma et al., 2021a), і на бактеріальну інфекцію (Watts, 2022) пов'язані зі зниженням стабільності лізосомальної мембрани. Незважаючи на подібність у механізмах відповіді при всіх експозиціях, її величина була в кілька разів вищою в аборигенній Kh-, ніж у інвазивній Tn-популяції, особливо за комбінованих впливів (на 267 і 242 % у аборигенних Міх- і МіхТ-групах та на 69 і 75 % у інвазивних Міх- і МіхТ-групах). Ця різниця свідчить про більшу вразливість аборигенних молюсків.

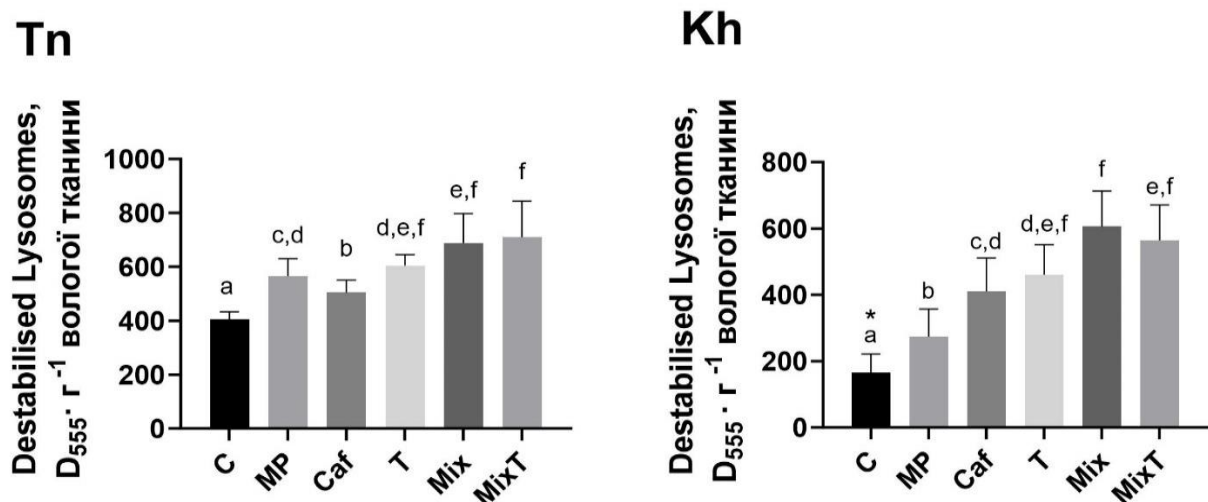


Рис.3.18. Стабільність лізосомальних мембран у м'яких тканинах двостулкового молюска *D. polymorpha* за впливу мікропластику (MP), кофеїну (Caf), нагрівання (Т, 25 °С) і сумішей кофеїну та мікропластику при 18 °С (Міх) та 25 °С (МіхТ), $M \pm SD$, $n=8$

Кисла фосфатаза (AcP) у безхребетних вважається біомаркером пошкодження лізосомальних мембран (Rajalakshmi and Mohandas, 2005). Активність цього переважно лізосомального ензиму пов'язана з гідролізом у кислому середовищі різноманітних фосфатвмісних молекул, а також із функцією трансфосфорилювання (Lacoue-Labarthe et al., 2010; Gaikwad, 2010). Крім того, AcP пригнічує виробництво H_2O_2 та O_2 , запобігаючи окиснювальному стресу і може діяти як антиоксидантний компонент в імунних клітинах, пригнічуючи активність мембранної НАДФН-оксидази (Revel et al., 2020).

У нашому дослідженні активність AcP оцінювалась на прикладі експозицій інвазивної Tn-популяції молюсків. Було виявлено, що загальна активність ензиму (AcPt) була зниженою у групі, яка піддавалася впливу МР. Варто зазначити, що знижена активність AcP може сприяти зниженню стійкості організмів до ряду супутніх пошкоджуючих впливів, таких як бактеріальні інфекції, інші забруднювачі або абіотичні фактори середовища (Revel et al., 2020). Примітно, що при дослідженні PhO ця група молюсків виявляла знижену імунорезистентність. Однак при експозиціях виділення ензиму з лізосом (AcPf) навіть зменшилося, особливо за впливу МР та комбінованого теплового впливу (Рис. 3.19А,Б). Дослідження Gaikwad (2010) свідчить про те, що сумарна активність AcP спостерігається вищою при низькому рівні окисного стресу, а при підвищеному рівні стресу лізосомальна мембрана пошкоджується, що призводить до підвищення активності мікросомальної AcP. Проте вплив МР у сукупності з кофеїном виявляв протилежний ефект і підвищував активність AcPt порівняно з контролем у Міх-групі до 1,4 раза.

Тим не менш, частка мембрано-зв'язаної активності (L) використовується як більш точний показник стресу, ніж загальна активність AcP. Зниження цього показника може свідчити про пошкодження лізосомальних мембран, так як у організмів, підданих окисному стресу, мембрани стають більш проникними та крихкими, втрачають текучість і цілісність, що може бути викликано розкладанням фосфоліпідів, які є основним молекулярним компонентом

біологічних мембран. Лізосомальна АсР має здатність транспортуватися як трансмембранний ензим до щільних лізосом через плазматичну мембрану (Gaikwad, 2010), а при пошкодженні мембран кількість вільної АсР у цитозолі збільшуватиметься, відповідно, мембранно-зв'язана латентність ензиму буде меншою. У нашому дослідженні частка мембранно-зв'язаної АсР була навіть підвищеною у всіх кофеїн-вмісних експозиціях, особливо за комбінованих впливів (у 3,4 та 3,6 раз у Міх та МіхТ-експозиціях відповідно), що свідчить про потужну активацію функціональної активності лізосом у цих групах (Рис. 3.19В).

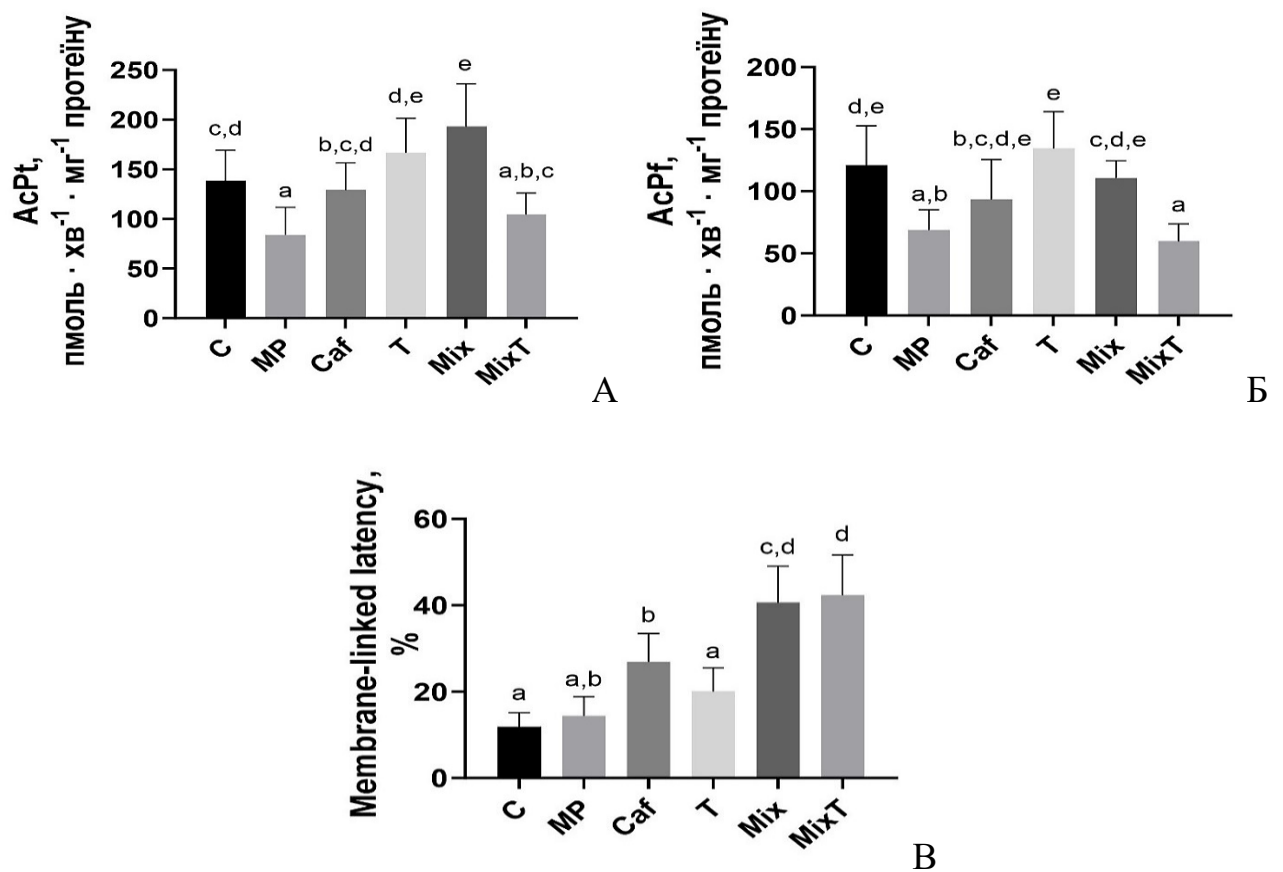


Рис. 3.19. Активність кислій фосфатази у м'яких тканинах двостулкового молюска *D. polymorpha* за впливу мікропластику (MP), кофеїну (Caf), нагрівання (Т, 25 °С) і сумішей кофеїну та мікропластику при 18 °С (Міх) та 25 °С (МіхТ) протягом 14-ти днів: А – загальна активність кислій фосфатази (AsPt); Б – позалізосомальна активність (AsPf); В – лізосомальна мембранно-зв'язана латентність фосфатаз (L), $M \pm SD$, $n=8$.

Таким чином, проведені дослідження дали змогу вперше порівняти відповіді аборигенних та інвазивних популяцій одного виду з територіально віддалених ділянок на дії одних і тих же імуномодулюючих стресорів та абіотичного фактора середовища. Виявлено, що хоча контрольна група інвазивної популяції проявляла підвищений рівень дестабілізації лізосомальних мембран, порівнюючи з аборигеною KhC-групою, проте при усіх експозиціях діапазон ушкоджень лізосом був значно вищим для аборигенних представників. Важливо, що в цій роботі ми виявили AcP як перспективний біомаркер впливу МР, тоді як дослідження, які включали набір маркерів стресу, не дали однозначних доказів такої токсичності для двостулкових молюсків (Hamm and Lenz, 2021; Martyniuk et al., 2022a, 2023).

3.3.3. Дослідження показників токсичності при карагенан-індукованому гонартриті

Для підтвердження діагнозу ГА, ми опирались на досліджуваний рівень сіалових кислот (SiA) у сироватці крові, який значно підвищився у щурів експонованої групи (Рис. 3.20А), що свідчить про тяжкість запалення.

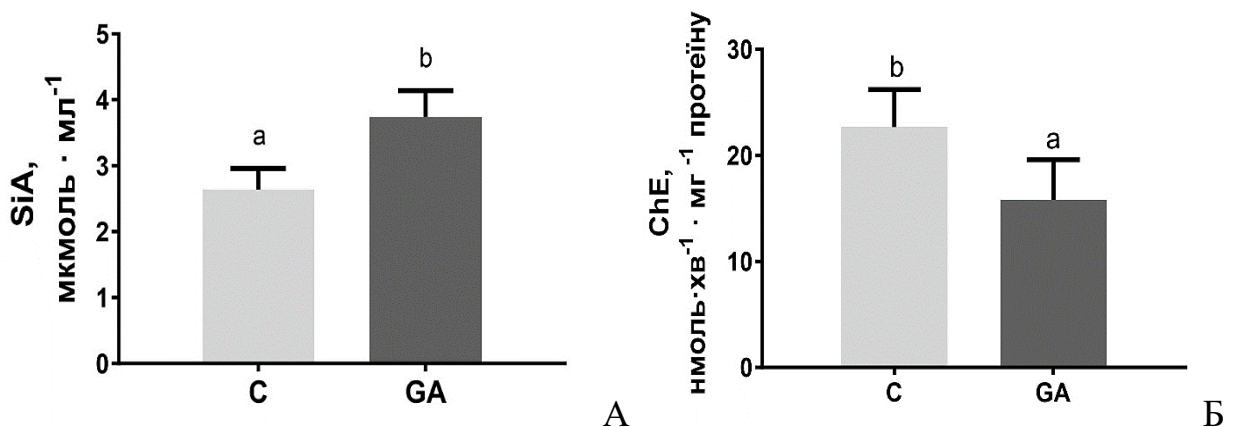


Рис. 3.20. Концентрація сіалових кислот у плазмі крові та холінестеразна активність у тканинах колінного суглоба щурів із гострим гонартритом (GA) та контрольних тварин (C), $M \pm SD$, $n=8$.

Дослідження показника нейротоксичності дозволило виявити, що холінестеразна активність (ChE) у тварин із ГА зменшувалася на 30 % (Рис.

3.20Б), що є ознакою ураження синовіальної тканини при гострому ГА. Фармакологічне пригнічення ензиму часто пов'язують зі збільшенням виживаності при запаленні, зниженням синтезу запальних цитокінів з активованих макрофагів (Hoover, 2017; Luo et al., 2021). Хоча ChE, в основному, відома тим, що руйнує ацетилхолін у нервових синапсах, вона також бере участь у регуляції розвитку та ремоделювання кісток (Luo et al., 2021).

Висновки до підрозділу

Отримані результати засвідчили підвищені рівні активностей ензимів апоптозу каспази-3 та CtDt у контрольній групі інвазивної популяції, порівнюючи з аборигенною, що свідчить про використання апоптозу та аутофагії як стратегії захисту проти пошкоджених клітин, яка спрямована на оновлення популяції в результаті короткочасного життєвого циклу цих організмів. Тепловий та комбінований впливи викликали потужну активацію системи апоптозу та функціональної активності лізосом. При цьому, впливи МР, кофеїну та їх суміші на аборигенну популяцію проявлялися активацією каспази-3 при всіх експозиціях, а за впливу суміші у Міх-групі цієї популяції відбувався витік CtD з лізосом. Експозиції викликали дестабілізацію лізосом у двох популяціях, однак діапазон змін був значно вищим для аборигенних дрейсен. Відтак, вплив досліджуваних чинників був більш згубний для аборигенної популяції молюсків. При кофеїн-вмісних експозиціях спостерігалась функціональна активація лізосом у Caf-, Міх- та МіхТ-групах інвазивної популяції, що можна пояснити активацією їх біогенезу як адаптивною реакцією на дію експериментальних факторів. У обох популяціях молюсків за поєднаної дії чинників спостерігався синергічний ефект. Підвищений рівень сіалових кислот у плазмі крові та зниження активності холінестерази у лабораторних щурів доводить тяжкість ураження синовіальної тканини та є ознаками пригнічення процесів регуляції розвитку та ремоделювання кісток за моделі карагенан-індукованого ГА.

РОЗДІЛ IV. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Проведене дослідження присвячене комплексному аналізу функцій і відповідей МТ за впливу імуномодуляторів та при запаленні на різних модельних організмах задля всебічного вивчення властивостей цих низькомолекулярних тіолів. Кофеїн та МР є одними з найпоширеніших у прісних водоймах мікрополітантів, які здатні викликати імунну відповідь у безхребетних (Triebkorn et al., 2019; Alfaro-Núñez et al., 2021; Kovács et al., 2021). При дослідженні впливу ксенобіотиків на організм молюска *D. polymorpha* були створені умови, які відповідали екологічно реальним у навколишньому середовищі, враховуючи ступінь дисперсності МР та концентрації досліджуваних речовин, потенційний векторний потенціал МР та вплив суміші, вплив підвищеної температури, беручи до уваги глобальні зміни клімату. При цьому, одна з популяцій була інвазивною, тому важливо дослідити біохімічні основи її стійкості до викликів довкілля у порівнянні з аборигенною популяцією та можливу участь МТ у резистентності до викликів довкілля. Передбачалося, що вплив досліджуваних імуномодуляторів, а також запальних процесів, може змінювати властивості та функціонування МТ, враховуючи їх прямиий та опосередкований зв'язок із вродженою та адаптивною імунними відповідями (Ugajin et al., 2015; Vignesh and Deere, 2017; Dai et al., 2021). Для з'ясування ролі МТ аналізувалися показники окисно-відновного стресу. Останні є нерозривно пов'язані з накопиченням та утилізацією АФК, які відіграють роль у процесах сигналювання та часто виступають активаторами МТ (Min et al., 2005). Акумуляція Zn є особливо важливим параметром, з огляду на вплив цього елемента на імунорезистентність організму (Krezel and Maret, 2016; Gammoh and Rink, 2017), а зміна його накопичення в МТ нерозривно пов'язана зі зміною функцій тіолів. Для оцінки ступеня ураження клітин та імунорезистентності організму досліджувалися показники апоптозу та аутофагії, цілісності лізосом та активності металоензиму PhO.

4.1. Міжпопуляційні відмінності у відповідях організму *D. polymorpha* на вплив хімічних та екологічних чинників

4.1.1. Міжпопуляційні відмінності у контрольних групах молюсків

Незважаючи на те, що велика кількість досліджень присвячена екологічним впливам на інвазивних видів, мало відомо про фізіологічні механізми, які можуть сприяти успіху інвазій (Minchin et al., 2002). Згідно отриманих результатів, міжпопуляційні відмінності між інвазивними та аборигенними молюсками були виявлені в обох контрольних групах навіть після 21-ї доби перебування в лабораторних резервуарах. Хоча загальний рівень МТ був однаковим у двох контрольних групах, частка металізованого МТ (Zn-МТ) була вдвічі меншою в аборигенній контрольній групі, що вказує на відмінності в Zn-залежній редокс-сигналізації (Krezel et al., 2007). Разом з тим, редокс-індекс RI GSH був однаковим в обох популяціях, що свідчить про схожість окисно-відновної потужності клітинних низькомолекулярних тіолів. А втім, у аборигенній С-групі рівні захисних ензимів, а саме Mn-SOD, Cu,Zn-SOD, каталази, PhO та неензиматичного антиоксиданту GSH, а також продуктів окиснення (PC) були меншими (у деяких випадках приблизно вдвічі), і лише рівень окисних ушкоджень ліпідів (TBARS) був вищим, порівнюючи з інвазивною контрольною групою. Активність клітинних протеаз, каспази-3 і CtDt, також була нижчою в аборигенній С-групі. Загалом, ця різниця свідчить про нижчу захисну здатність цієї популяції. Витік CtD з лізосом був однаковим в обох контролях. Дані морфологічних вимірів виявляють переваги інвазивної популяції над аборигенною, що може бути пов'язано з активацією їх фільтруючої здатності.

Відтак, виходячи з порівняння двох контрольних груп молюсків, аборигенна популяція зазнавала меншого стресового впливу, очевидно, внаслідок довготривалої адаптації у даному середовищі. Експансія на нові території, як видно з наших результатів, викликала реакційну стійкість цих молюсків. Отже, міжпопуляційні відмінності у здатності протистояти додатковим викликам були очікуваними в нашому дослідженні.

4.1.2. Спільні риси у відповідях організму молюсків аборигенної та інвазивної популяцій за впливу імуномодуляторів

У процесі дослідження було встановлено як певні спільні риси реактивності популяцій молюсків у відповідях на вплив імуномодулюючих стресорів, так і особливості реакцій на стрес залежно від популяції. Згідно факторного аналізу сукупності результатів двох популяцій (Рис. 4.1, Табл. 4.1), серед досліджених показників вірогідними змінами стосовно Фактору 1 були характеристики антиоксидантного захисту – каталази (CAT), Cu,Zn-SOD, GSH, карбонілів протеїнів у негативному зв'язку із ТАС. До Фактору 2 вірогідно (<0,5) належали показники апоптозу й аутофагії – каспаза-3 та загальна і позалізосомальна активності CtD. Відповіді загальної активності PhO та лаккази (Lc) були одними із найбільш значущих і належали до Факторів 1 і 2, що свідчить про їх багатофункціональну роль у організмі. Таким чином, чітко простежується взаємозв'язок між активацією антиоксидантного захисту та імунною відповіддю організму, формуванням окисних ушкоджень та активацією процесів загибелі клітини.

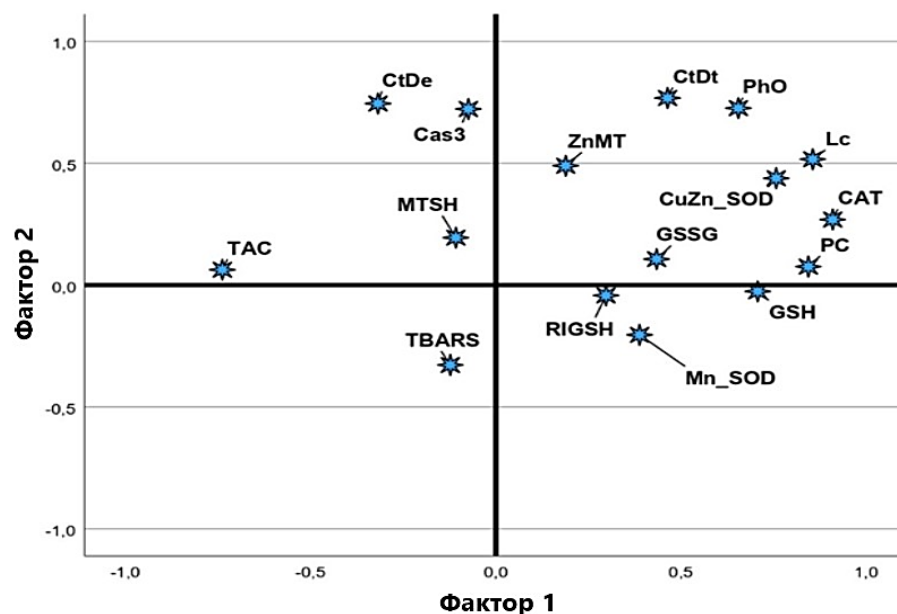


Рис. 4.1. Результати факторного аналізу стану біохімічних показників у організмі *D. polymorpha* аборигенної (Kh) та інвазивної (Tn) популяцій за впливу мікропластику (MP), кофеїну (Caf), нагрівання (T, 25 °C) та сумішей кофеїну та мікропластику при 18 °C (Mix) та 25 °C (MixT) протягом 14-ти днів

Відповіді імунологічного показника PhO та ензимів апоптозу й аутофагії, каспази-3 і CtD (обидві форми, за єдиним винятком) на кожну експозицію були подібними в обох популяціях, що свідчить про спільну стратегію кінцевих шляхів відповіді на несприятливі виклики (Adverse Outcome Pathways). Спільна стратегія їх відповідей підтверджується факторним аналізом, де відображено їх об'єднання відносно осі 2 (Рис. 4.1, Табл. 4.1).

Таблиця 4.1

Розподіл біохімічних показників *D. polymorpha* з двох популяцій між двома першими факторами факторного аналізу за впливу на організм мікропластику (MP), кофеїну (Caf), нагрівання (T, 25 °C) та сумішей кофеїну та мікропластику при 18 °C (Mіx) та 25 °C (MіxT) протягом 14-ти днів

	Фактор	
	1	2
ZnMT	,189	,489
MTSH	-,108	,195
Cas3	-,074	,722
CtDe	-,318	,745
CtDt	,464	,768
TAC	-,739	,063
Mn_SOD	,388	-,204
CuZn_SOD	,758	,438
CAT	,910	,269
GSH	,708	-,026
GSSG	,434	,107
RIGSH	,298	-,043
TBARS	-,123	-,328
PC	,844	,076
PhO	,655	,726
Lc	,856	,516

У нашому дослідженні активація лаккази була пов'язана зі зниженням рівня TAC і збільшенням рівня ушкодження протеїнів. Дійсно, лакказа може безпосередньо окиснювати дифеноли, а тирозингідроксилаза може гідроксилувати монофеноли (González-Santoyo and Córdoba-Aguilar, 2012) і, отже, зменшувати захист протеїнів від карбонілювання (Shahidi and

Dissanayaka, 2023). Рівень ТАС вказує на антиоксидантну здатність поліфенолів. Він менш чутливий, ніж інші антиоксиданти, такі як тіоли (Balcerczyk and Bartosz, 2003), але в цьому дослідженні він відобразив продуктивність PhO. Важливо, що PhO активується з неактивних попередників за допомогою протеолітичної каскадної системи, включаючи цитозольні каспази та лізосомальні катепсину (Al-Khalaifah and Al-Nasser, 2018). Зокрема, було показано, що функціонування CtD не обмежується виключно кислим середовищем лізосом і може відігравати вирішальну роль в імунній відповіді (Benes et al., 2008). Наприклад, у благородного гребінця *Chlamys nobilis* CtD підвищувався у відповідь на три різні імуностимулятори (Zhang et al., 2021). У представленому дослідженні активність CtD залежала від тяжкості впливу, і в координації з активністю PhO вона знижувалася при поодиноких експозиціях МР і кофеїну і, навпаки, підвищувалася (загальна активність) у інвазивній Т-групі, Міх-групах обох популяцій і (позалізосомальна) в аборигенній Міх-групі.

Зниження цілісності лізосомальних мембран при експозиціях є однією з найбільш уніфікованих відповідей організмів двох популяцій, що підтверджує дані інших дослідників. Так, 28-денний вплив кофеїну на *Carcinus maenas* (0,1; 5; 15; 50 мкг·л⁻¹) викликав пошкодження ДНК у тканинах гепатопанкреасу та зниження стабільності лізосомальної мембрани, починаючи з 5 мкг·л⁻¹ (Aguirre-Martínez et al., 2013). Було показано, що інвазивний вид дрейсени має перевагу в здатності підтримувати цілісність лізосом, порівнюючи з аборигенними молюсками за впливу ксенобіотиків (Наї et al., 2019). У цьому дослідженні ми вказали на подібну закономірність між аборигенною та інвазивною популяціями, оскільки величина дестабілізації лізосом проявляла значно вищі значення у аборигенних молюсків, що особливо спостерігалось за впливу суміші.

Відповідь PhO за впливу МР узгоджується з даними інших досліджень, у яких зниження імунорезистентності організму та стимулювання запальних імунних відповідей спостерігалось за впливу поліетиленового МР, який посилював зростання прозапальних факторів (TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-

1β) та знижував протизапальні фактори (IL- 4, IL-10) у зябрах коропа (Cao et al., 2023). Вплив поліетилену високої щільності (≤ 80 мкм) викликав сильну запальну реакцію у мідії *M. edulis*, яка проявлялася утворенням гранулоцитом і дестабілізацією мембрани лізосом (von Moos et al., 2012). Активація нейтрофілів, відшарування епітелію, гіперсекреція слизової та імунні відповіді були відмічені у рибок *D. rerio* (Limonta et al., 2019). Імунна активація та дисбактеріоз кишкової мікробіоти після впливу МР також були виявлені у риби (Li et al., 2019) та миші (Sun et al., 2021), що вказує на потенційну імунну активацію та токсичність і у хребетних. У нашому випадку, індуковане МР значне зниження PhO та CtD в обох популяціях підтвердило пригнічену стресостійкість за цього впливу.

Отже, ці спільні прояви у реакціях моллюсків за більшості впливів можуть бути ознакою добре відрегульованих імунних і апоптичних сигнальних систем, незалежно від початкового стану популяції, та проте, якими інвазивні види володіють у більшій мірі, зважаючи на інтенсивність відповідей.

4.1.3. Особливості відповідей на вплив імуномодуляторів у аборигенній та інвазивній популяціях

Незважаючи на певні спільні реакції, порівняння обох популяцій дало важливі докази їхніх відмінностей у величині та навіть напрямках кількох проявів впливу (Рис. 4.2). Моллюски аборигенної Kh-популяції активували каспазу-3 у всіх експозиціях, тоді як інвазивні Tn-представники не змінювали активність ензиму в МР- і Т-групах. Лише аборигенна популяція демонструвала такі ознаки токсичності, як підвищення рівня окисних ушкоджень протеїнів (крім Т-групи), вихід CtD з лізосом (Mіх-група), зниження рівня GSH (MіхТ-група), Mn-SOD (Т, Міх- і МіхТ-групи) і каталази (Т- і МіхТ-групи).

Методом дискримінантного аналізу дві популяції були чітко відокремлені щодо Функції 1, при цьому важливо, що інтенсивність реакцій на експозиції була різною у двох популяціях. Реакції аборигенних моллюсків на кожний чинник були чітко специфічні, тоді як інвазивні моллюски були більш

резистентні і демонстрували малоспецифічні до природи чинника відповіді за діапазоном відмінностей у порівнянні з аборигенною популяцією (Рис. 4.2).

Відмінності між реакціями на однакову експозицію в двох популяціях були найбільш відчутними за впливу МР. З 17 маркерів, котрі визначались для обох популяцій, у інвазивних представників лише 8 відповіли на МР, тоді як у аборигенній групі 15 показників були змінені (Табл. 4.2). Отримані результати підтверджуються проведеним дисперсійним аналізом (Рис. 4.2). Це можна пояснити успішним досвідом інвазивної популяції протистояти забрудненню. Переваги також можуть бути пов'язані з різною ефективністю в ковтанні пластикових частинок у інвазивній популяції, порівнюючи з аборигенною (Ward et al., 2019), що було частково підтверджено морфологічними характеристиками.

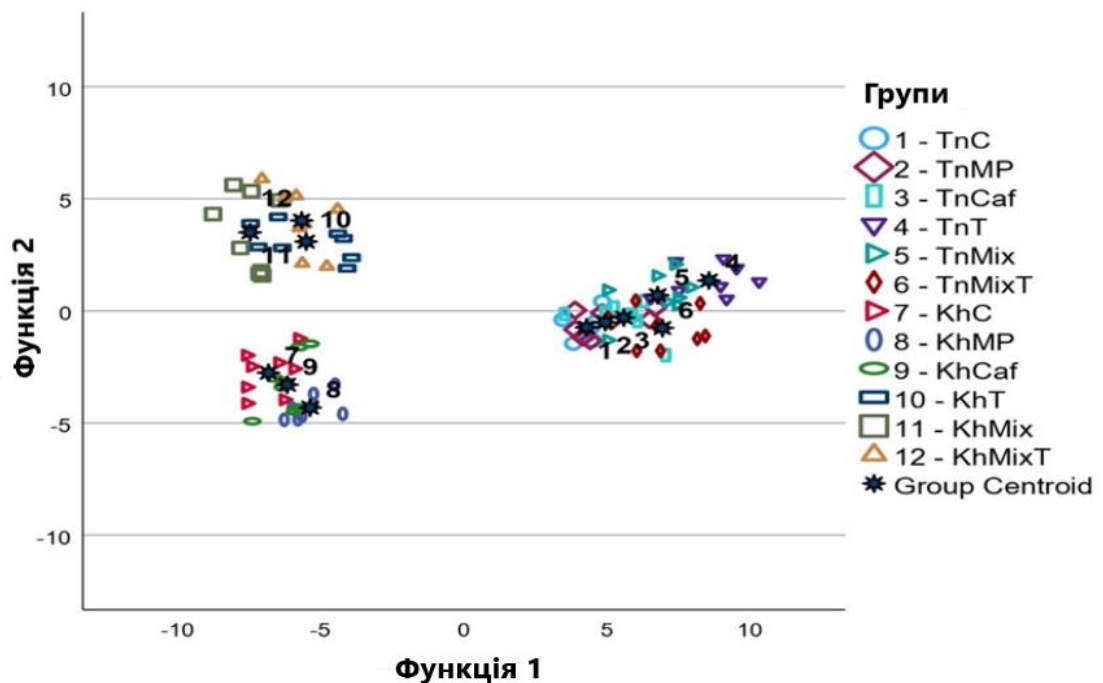


Рис. 4.2. Результати канонічного дискримінантного аналізу біохімічних показників у організмі *D. polymorpha* аборигенної (Kh) та інвазивної (Tn) популяцій за впливу мікропластику (MP), кофеїну (Caf), нагрівання (T, 25 °C) та сумішей кофеїну та мікропластику при 18 °C (Mix) та 25 °C (MixT) протягом 14-ти днів

Примітка: Позначення груп наведено у тексті.

Відповіді на окиснювальний стрес за впливу МР були переважно протилежними в обох популяціях. Для групи аборигенної МР-групи молюсків характерною була активація клітинних тіолів і Mn-SOD. Представлені відповіді GSH та Mn-SOD за впливу МР були унікальними серед усіх інших проявів, що свідчить про нездатність адаптуватися до цього нового виду ксенобіотика. Дослідження, проведені на рибках *D. rerio*, продемонстрували, що вироблення GSH у кишечнику стимулюється за впливу низьких концентрацій МР (0,1 і 1 мг·л⁻¹), у той час як високі дози (10 мг·л⁻¹) пригнічували його вироблення (Ding et al., 2022). Отже, наші дані підтверджують більш високу сприйнятливість аборигенних молюсків до МР, порівнюючи з інвазивною популяцією.

Крім того, особливий ефект МР було виявлено для активності кислій фосфатази (AcP), яка у безхребетних вважається біомаркером пошкодження лізосомальних мембран (Gaikwad, 2010). У нашому дослідженні вплив МР на інвазивну популяцію викликав зниження загальної активності ензиму, що може сприяти зниженню стійкості організмів до супутніх несприятливих впливів (Revel et al., 2020), зокрема температури, як це спостерігалось у нашому дослідженні. Так, у суміші з кофеїном активність ензиму підвищувалася, але за теплового комбінованого впливу – знову інгібувалася. Ці дані узгоджуються з дослідженням Revel et al. (2020), де активність AcP ціломоцитів *Hediste diversicolor* знизилася після 10-ти денного впливу МР. Кілька звітів підтверджують, що зниження активності цього ензиму у водних видів може бути викликане різними забруднювачами. Наприклад, активність AcP знижувалася у водоростей *Pseudokirchneriella subcapitata* за впливу металів і лінійного алкілбензолсульфонату (Jonsson et al., 2009), і була більш вразливою, ніж активність катепсину в яйцях каракатиць (*Sepia officinalis*), які піддалися впливу Cd і Cu (Lacoue-Labarthe et al., 2010).

На відміну від інвазивної популяції, для аборигенних молюсків вплив кофеїну викликав менш чутливі відповіді, ніж експозиція до МР (Рис. 4.2, Табл. 4.2, 4.3). Із 17 біомаркерів, 10 давали відчутну відповідь серед інвазивної популяції і 6 серед аборигенної.

Таблиця 4.2.

Схема реакцій досліджуваних показників за впливу мікропластику (MP), кофеїну (Caf), нагрівання (Т, 25 °С) та сумішей кофеїну та мікропластику при 18 °С (Mix) та 25 °С (MixТ) на організм двостулкового молюска *D. polymorpha* аборигенної (Kh) та інвазивної популяцій (Tn) за характеристиками м'якої тканини при субхронічному експерименті

Показник	MP		Caf		Т		Mix		MixТ	
	Tn	Kh	Tn	Kh	Tn	Kh	Tn	Kh	Tn	Kh
Caspase-3	=	↑	↑	↑	=	↑	↑	↑	↑	↑
CtDe	↓	↓	↓	↓	=	=	=	↑	=	=
CtDt	↓	↓	↓	↓	=	=	↑	↑	=	=
Zn-MT	=	↓	↓	↑	=	↑	↓	↑	=	↑
MTSH	=	↑	↑	=	=	↑	↑	=	↑	↑
GSH	=	↑	=	=	=	=	=	=	=	↓
GSSG	=	↓	=	=	=	=	=	↓	=	=
RI GSH	=	↑	=	=	=	=	=	↑	=	=
TAC	=	↓	↓	=	↓	=	↓	↓	↓	↑
Mn-SOD	↓	↑	=	=	↓	↓	=	↓	=	↓
Cu,Zn-SOD	=	=	↑	=	↑	↑	↑	↑	↑	=
CAT	=	=	↓	=	=	↓	↑	↑	=	↓
TBARS	↓	↓	↓	=	↓	↓	↑	↓	=	↓
PC	↑	↑	=	↑	↑	=	=	↑	=	↑
PhO	↓	↓	=	=	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Lc	↓	↓	=	=	↑	↑	↑	↑	↑	↑
NRR	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
AcPt	↓	x	=	x	=	x	↑	x	=	x
AcPf	↓	x	=	x	=	x	=	x	↓	x
L	=	x	↑	x	=	x	↑	x	↑	x
Zn	↓	x	=	x	=	x	↑	x	=	x
Cu	↑	x	↑	x	↑	x	↑	x	↑	x
Zn/Cu	↓	x	↓	x	↓	x	↓	x	↓	x

Примітка.

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

За впливу кофеїну підвищення рівня неметалюваного MT (апо-форма MT) та активація Cu,Zn-SOD підсилювало антиоксидантний захист молюсків та характеризувало переваги інвазивної популяції у відповіді на цю речовину.

Таким чином, експозиція кофеїном викликала позитивні зміни в досліджуваних показниках, що пояснюється його основними метаболітами 1-метилксантином і метилсечовою кислотою, які є високоефективними антиоксидантами. Результати деяких досліджень свідчать про те, що споживання кофеїну, як жиророзчинного алкалоїду, може нейтралізувати вільні радикали для запобігання виникнення підвищених рівнів маркерів окисного пошкодження. Так, дослідження Corsetti et al. (2007) припускає, що споживання кофеїну в різних кількостях (5/0 і 30 мг/день) поповнює запаси ендогенного антиоксиданту глутатіону.

У нашому дослідженні, спільно з активацією Cu,Zn-SOD, зниженням рівня окисних ушкоджень ліпідів за впливу кофеїну, а також збільшенням апо-форми МТ у інвазивній популяції, мало місце і підвищення цілісності лізосом у всіх кофеїн-вмісних експозиціях, виявляючи антиоксидантний потенціал цієї сполуки. Таким чином, ефект залежить від тривалості впливу і, очевидно, інвазивності (резистентності) організму.

Дослідження Sewwandi et al. (2022) стверджують, що МР потенційно може служити вектором, який впливає на міграцію кофеїну в природних водних екосистемах, багатих органічними речовинами. У сумішах він може служити сорбентом, який адсорбує гідрофобні сполуки, включаючи кофеїн, завдяки адсорбції його через фізичні (наприклад, електростатичні) або хімічні взаємодії, дозволяючи йому потрапляти в клітини у більшій кількості (Martinho et al., 2022). Більше того, полістирол має доволі високу адсорбційну здатність, порівняно з іншими типами МР, такими як поліетилен та поліпропілен, оскільки він має вищу полярність. Це пояснюється присутністю фенільних і естерних груп, які сприяють збільшенню адсорбційної здатності за рахунок взаємодії π - π -зв'язків із забруднювачами, на додачу до Ван-дер-Ваальсових взаємодій (Loncarski et al., 2020). Тому, окрім власного ефекту, очікувалося, що МР через гідрофобні контакти на поверхні частинок модулюватиме накопичення та токсичність кофеїну у суміші (Sewwandi et al., 2022).

Таблиця 4.3.

Результати класифікації молюсків з двох популяцій за їх приналежністю до певної групи за впливу мікропластику (MP), кофеїну (Caf), нагрівання (T, 25 °C) та сумішей кофеїну та мікропластику при 18 °C (Mix) та 25 °C (MixT)

		Група	Належність до групи						Загалом
			TnC	TnMP	TnCaf	TnT	TnMix	TnMixT	
Original	Count	TnC	8	0	0	0	0	0	8
		TnMP	0	7	1	0	0	0	8
		TnCaf	0	1	7	0	0	0	8
		TnT	0	0	0	8	0	0	8
		TnMix	0	0	0	0	8	0	8
		TnMixT	0	0	1	0	0	7	8
	%	TnC	100,0	,0	,0	,0	,0	,0	100,0
		TnMP	,0	87,5	12,5	,0	,0	,0	100,0
		TnCaf	,0	12,5	87,5	,0	,0	,0	100,0
		TnT	,0	,0	,0	100,0	,0	,0	100,0
		TnMix	,0	,0	,0	,0	100,0	,0	100,0
		TnMixT	,0	,0	12,5	,0	,0	87,5	100,0
		Група	Належність до групи						Загалом
			KhC	KhMP	KhCaf	KhT	KhMix	KhMixT	
Original	Count	KhC	7	0	1	0	0	0	8
		KhMP	0	8	0	0	0	0	8
		KhCaf	0	0	8	0	0	0	8
		KhT	0	0	0	8	0	0	8
		KhMix	0	0	0	0	8	0	8
		KhMixT	0	0	0	1	0	7	8
	%	KhC	87,5	,0	12,5	,0	,0	,0	100,0
		KhMP	,0	100,0	,0	,0	,0	,0	100,0
		KhCaf	,0	,0	100,0	,0	,0	,0	100,0
		KhT	,0	,0	,0	100,0	,0	,0	100,0
		KhMix	,0	,0	,0	,0	100,0	,0	100,0
		KhMixT	,0	,0	,0	12,5	,0	87,5	100,0

Дійсно, при комбінованому впливі було виявлено мультистресову взаємодію, що призвело до збільшення загальної концентрації Zn, рівня окисних ушкоджень ліпідів, активностей AcPt у інвазивній Mix-групі, а також

Cu,Zn-SOD, CtDe, у аборигенній Міх-групі та CtDt, каталази (CAT), PhO і лаккази (Lc) спільно у двох популяціях, чого не було виявлено за поодинокого впливу МР або кофеїну.

Відтак, у молюсків двох популяцій за поєднаного впливу МР та кофеїну спостерігався синергічний ефект, причому в інвазивній групі домінуючим був антиоксидантний вплив кофеїну (MTSH), який також впливав на системи апоптозу (каспаза-3) та біогенезу лізосом (L), тоді як участь МР була більш проявленою в аборигенній популяції, що виявлялось у посиленні відновного стресу (RI GSH) (Табл. 4.2, 4.3, 4.4).

Таблиця 4.4.

Результати визначення спорідненості між групами молюсків за впливу мікропластику (MP), кофеїну (Caf), нагрівання (T, 25 °C) та сумішей кофеїну та мікропластику при 18 °C (Mix) та 25 °C (MixT)

Група	Функція										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
TnC	4,285	-,741	,206	1,779	-2,546	,842	,268	-,488	-,908	,063	,200
TnMP	4,938	-,508	2,118	-1,092	-2,285	-,131	1,427	,872	,372	-,283	-,030
TnCaf	5,589	-,300	2,348	-1,736	-,054	-,760	-,117	-,493	-,008	,503	-,392
TnT	8,568	1,358	-1,765	-2,992	,006	,093	-1,855	-,128	,206	-,155	,259
TnMix	6,773	,699	-4,335	2,020	1,217	-1,855	,825	,409	-,053	,193	-,016
TnMixT	6,941	-,765	1,602	2,321	2,577	2,078	,114	-,257	,310	-,281	-,085
KhC	-6,840	-2,760	-2,617	,421	-1,292	-,656	-,753	-,381	,101	-,454	-,324
KhMP	-5,384	-4,313	1,696	-1,560	2,130	-1,446	,753	-,157	-,272	-,080	,272
KhCaf	-6,186	-3,294	-,715	,793	-,529	1,506	-,954	,567	,421	,509	,098
KhT	-5,522	3,089	,757	-,661	1,227	,605	-,774	,776	-,858	-,099	-,174
KhMix	-7,482	3,504	-2,162	-1,703	,071	1,426	1,806	-,501	,248	,087	,038
KhMixT	-5,680	4,032	2,866	2,411	-,523	-1,703	-,742	-,218	,442	-,002	,153

Тоді як за впливу МР, кофеїну та суміші переваги були очевидними для інвазивної Tn-популяції, відповіді на нагрівання можна оцінити по-різному. А саме, зміни в TAC і PC у інвазивній T-групі, а також у активності каспази-3 та мобілізація MT в аборигенній популяції показали, що аборигенні представники мають більш допустимі межі. Це можна пояснити їх адаптацією до вищих температур (15 °C – 27 °C та 16,1 °C – 21,7 °C у Kh- та Tn-популяціях відповідно

в період відбору). Залежна від популяції здатність протистояти термічному стресу (Benedetti et al., 2022) була підтверджена різною смертністю за цього впливу в TnT- (вищий відсоток) і KhT-групах.

Розрахунок антиоксидантно-прооксидантного балансу (АПБ) (Рис. 4.3А,Б) доводить сумарну негативну захисну реакцію інвазивних молюсків за впливу температури, яка, як і за впливу МР, базувалась на підвищеному утворенні продуктів окисних ушкоджень протеїнів. При цьому, впливи сумішей викликали сумарну позитивну захисну відповідь організму, яка проявлялась у чутливості відповідей SOD. Подібним чином, для прісноводного равлика *Lymnaea stagnalis* було показано вплив середовища існування на генетичні варіації залежно від теплового режиму, тоді як вплив людського фактору мало відповідав еволюційним моделям (Bouétard et al., 2014). Для аборигенної популяції сумарні негативні захисні відповіді простежувались за впливу МР та Міх і проявлялись у переважанні прооксидантних процесів. Найбільш значущим був показник РС, який виражався при усіх експозиціях.

Важливо відмітити, що згідно дослідження Sadler et al. (2019), імунні відповіді організму *Daphnia magna* на вплив МР посилювалися з підвищенням температури. Більш висока температура призводила до сильнішого впливу МР, що проявлявся у зменшенні кількості потомства (18 °С і 24 °С). При чому, відповіді на вплив МР не були пов'язані з відмінностями в поглинанні частинок, але з активацією імунних клітин (гемоцитів), особливо при високій температурі. У нашому дослідженні для обох популяцій властивим було нівелювання значимих відповідей суміші та температури за теплового комбінованого впливу (Рис. 4.2), що узгоджується з попередніми результатами досвіду лабораторії, проведеними на іншому типі двостулкових молюсків – *U. tumidus* (Khoma et al., 2021; Khoma et al., 2022; Martyniuk et al., 2022b). Це доводить, що підвищення температури виснажує стрес-реактивні системи молюсків.

Tn

Kh

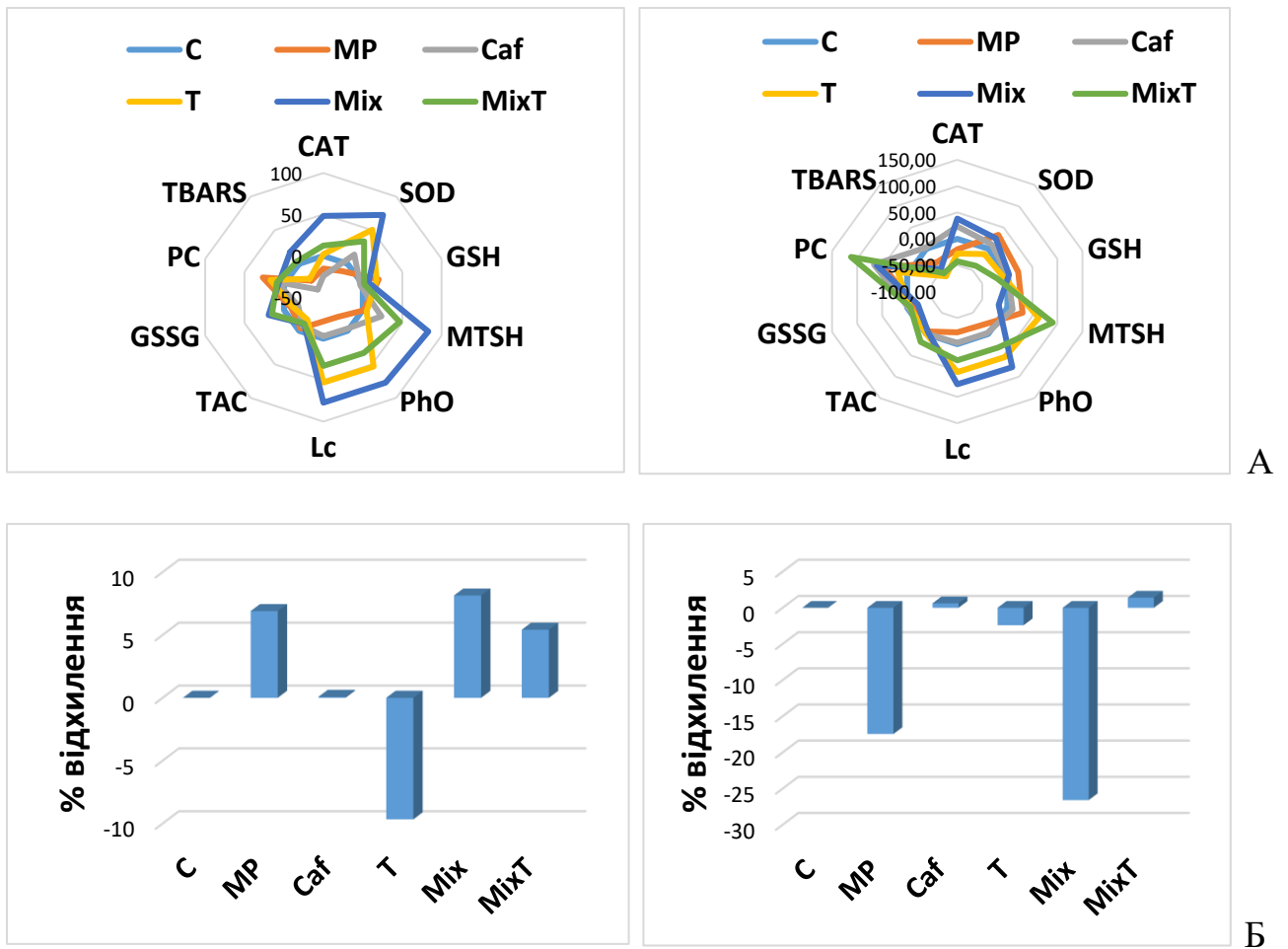


Рис. 4.3. Відхилення від контролю індивідуальних показників (А) та сумарні співвідношення антиоксидантно-прооксидантного балансу (АПБ) (Б) в м'яких тканинах двостулкового моллюска *D. polymorpha* за впливу мікропластику (MP), кофеїну (Caf), нагрівання (Т, 25 °С) та сумішей кофеїну та мікропластику при 18 °С (Mix) та 25 °С (MixT)

Серед набору даних, котрі визначались лише для інвазивної популяції, і показники акумуляції металів, і зміни у активності АсР показали значущі для організму відповіді з імовірністю більше $|0,5|$. При цьому, зміни у акумуляції Cu у негативному зв'язку із співвідношенням Zn/Cu, належали до Фактору 1, тоді як акумуляція Zn і зміни активності лізосом – до Фактора 2, детермінуючи взаємозалежний ефект біогенезу лізосом і накопичення Zn тканинами (Рис. 4.4, Табл. 4.5).

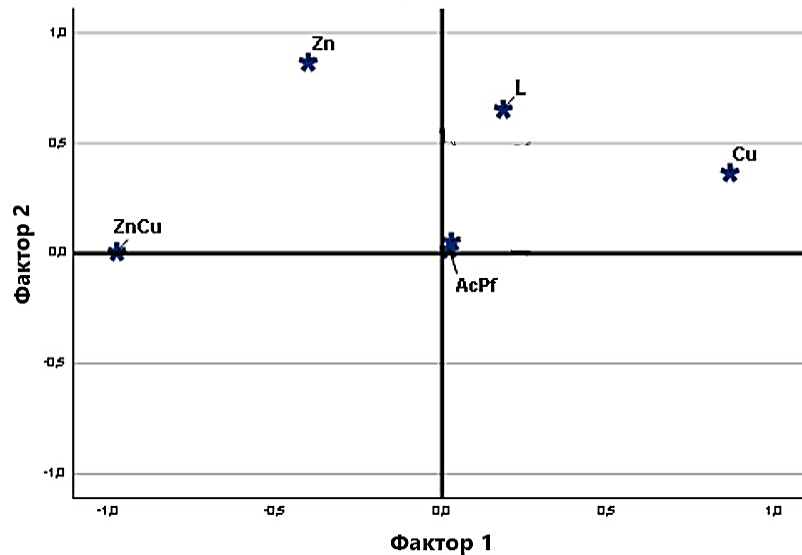


Рис. 4.4. Результати факторного аналізу стану біохімічних показників у організмі *D. polymorpha* інвазивної (Тп) популяції за впливу мікропластику (MP), кофеїну (Caf), нагрівання (Т, 25 °С) та сумішей кофеїну та мікропластику при 18 °С (Міх) та 25 °С (МіхТ)

Щоб узагальнити різницю між аборигенними та інвазивними популяціями, слід вказати на внесок адаптації до місцевого середовища в стійкість популяції до додаткових впливів суміші. Зазвичай, вищу резистентність демонстрували популяції з хронічно забруднених територій (Shi and Wang, 2004; Martinyuk et al., 2022a,b).

Таблиця 4.5

Розподіл біохімічних показників *D. polymorpha* з двох популяцій між двома першими факторами факторного аналізу за впливу на організм мікропластику (MP) і кофеїну (Caf) при 18 °С і при підвищеній температурі (25 °С, Т), та сумішей кофеїну і мікропластику при температурах 18 і 25 °С (Міх і МіхТ відповідно)

	Фактор	
	1	2
Zn	-,404	,867
Cu	,868	,365
Zn/Cu	-,980	,006
AcPf	,022	,017
L	,184	,653

У нашій роботі ми не можемо стверджувати, що аборигенна популяція була адаптована до чистого середовища, тому що вона розташовується в нижній течії великої річки Дніпро, яка має промислове значення. На жаль, ми не маємо результатів хімічного аналізу води, щоб підтвердити її якість на цій території. Важливо, що міжпопуляційні відмінності були пов'язані з відповідями МТ, системи апоптозу і окиснювального стресу, що відображає різні популяційно-залежні шляхи несприятливих результатів. Однак у цьому дослідженні ми чітко демонструємо як загальні переваги інвазивних видів у їхній скоординованій реакції на несприятливі обставини, так і вищу толерантність інвазивної популяції при одноразовому (крім нагрівання) і комбінованому впливі. Ці спільні переваги пов'язані з життєздатністю клітин, тоді як популяційно-залежна специфічність більше залежить від окиснювального стресу.

4.2. Реакція металотіонеїнів за впливу імуномодулюючих стресорів як складова реакції на стрес та імунореактивні чинники

При експозиціях ксенобіотиками ми дослідили, що концентрації МТSH і Zn-МТ були підвищеними за більшості впливів в аборигенній популяції і проявляли менш відчутні відповіді в інвазивній. У аборигенній Kh-популяції рівень металювання МТ не знижувався, а навіть збільшувався (у Міх-групі \approx в 5 разів), тоді як у інвазивній, навпаки, суттєво зріс рівень неметальованих МТ (апо-форми МТ) – до 4-х разів у групі TnMіх. Металотіонеїни, окрім буферизації незамінного цинку, є важливою сполукою для захисту клітин від окисного стресу та запалення (Inoue et al., 2009). Отже, властивості цих окисно-відновних (головним чином, у неметалізованому стані (Buico et al., 2008)) тіолів відрізнялися залежно від популяції. Водночас, рівень металотіонеїн-споріднених тіолів був того ж порядку, що й концентрація GSH у тканині (в діапазоні 0,07-0,18 нмоль на г вологої тканини). Варто відмітити, що підвищена концентрація апо-форми МТ у інвазивній популяції спостерігалася при кофеїн-вмісних експозиціях (Caf, Міх та МіхТ), тоді як вплив температури

послаблював цей ефект. Це свідчить про участь МТ у відповіді на стрес. Крім того, зменшення металізації МТ може збільшити антиоксидантну активність цих тіолів (Buico et al., 2008). Зв'язки МТ-метал мають високу термодинамічну стабільність, але їхня кінетична стабільність низька, що забезпечує легкий обмін Zn з іншими металопротеїнами (Rahayu and Prihatini, 2020). Таким чином, вивільнення Zn з тіолатних кластерів сприяє його перенесенню до інших клітинних мішеней, що особливо важливо в умовах порушення балансу Zn/Cu (Saad et al., 2016). Це зумовлено тим, що Zn-тіолатні кластери дуже чутливі до змін окисно-відновного стану в клітині, а центри окиснення в МТ можуть індукувати перенесення Zn з його сайтів зв'язування в МТ до сайтів з меншою спорідненістю в інших протеїнах. Таке перенесення металу має значення, наприклад, для надання біологічної активності антиоксидантним металоензимам, таким як SOD (Mocchegiani et al., 2006). Таким чином, ми можемо спостерігати підвищення активності Cu,Zn-SOD у поєднанні з підвищеними рівнями МТ та зниженням їх металізованої форми при кофеїн-вмісних експозиціях (Caf та Mix) у інвазивних молюсків. Загальне підвищення рівня MTSN та активності цього ензиму мало місце також у групі MixT.

Слід зазначити, що МТ найбільш суттєво реагували на комплексну дію, забезпечуючи більш потужний антиоксидантний потенціал у клітинах. За впливу суміші (Mix) у інвазивній групі молюсків надмірна активація протеїну МТ може бути додатково спровокована посиленою акумуляцією загального Zn у м'якій тканині молюска, що таким чином, стимулює індукцію синтезу МТ. Оскільки метали, зокрема Zn, транскрипційно регулюють ген МТ, ці протеїни мають здатність посилювати свою експресію, коли концентрація металів у тканинах збільшується. У разі дефіциту Zn МТ можуть діяти як резервуар цього елемента, а під час надлишку – функціонувати як Zn-буферні протеїни для запобігання токсичності Zn (Saad et al., 2016). У нашому випадку відсутність посиленого метилування МТ за цих умов свідчить про використання Zn іншими металопротеїнами, які, очевидно, мають більш важливе функціональне значення при експозиції сумішшю.

Окрім виконання антиоксидантних функцій, як показує дослідження Emeny et al. (2009), коливання рівня МТ у будь-якому напрямку чинить сприятливий ефект на антибактеріальний захист. Це можна пояснити зміщеннями редокс-контролю, оскільки тривалий дефіцит МТ або його надекспресія запобігає полегшенню окисного стресу.

Відмінною ознакою відповіді МТ у аборигенних представників є підвищення рівня МТSH за впливу протилежних чинників – МР та температури (поодинокі та в суміші). При цьому, за експозиції МР спостерігалась індукція антиоксидантних властивостей МТ, тоді як при температурному, як і при інших впливах на цю популяцію, підвищувалась метал-акумулююча функція цих тіолів. Деякі дослідження повідомляють про посилену активацію МТ у відповідь на вплив абіотичних факторів, зокрема, температури на організм двостулкових молюсків. Крім того, вплив важких металів протягом 15 днів на *Mytilus coruscus* індукував значну експресію МТ в гепатопанкреасі, який є життєво важливою імунною тканиною. Це підтверджує важливу роль цих протеїнів у імунному захисті від різноманітного стресу (Hamer et al., 2008; Vocchetti et al., 2008).

Таким чином, за впливу імуномодулюючих чинників (кофеїну та МР), МТ особливою мірою змогли суттєво підвищити антиоксидантну та протизапальну активність молюсків, що особливо проявлялось у інвазивних представників, забезпечивши значний внесок у переваги цієї популяції.

4.3. Роль металотіонеїнів у запальному процесі за стану гострого гонартриту

Відповідно до мети другої серії досліджень, нами була виявлена присутність протеїнів з ознаками МТ у синовіальних тканинах щурів із карагенан-індукованим ГА. У тварин із патологією спостерігалось збільшення об'єму елюції МТ, концентрацій МТSH та Zn-МТ. Результати деяких досліджень підтверджують, що МТ виявляли супресивний ефект після

повторного введення на перебіг ревматоїдного артриту та на його тяжкість (Sun et al., 2018).

Загалом, МТ відомі як внутрішньоклітинні протеїни (Vignesh and Deere, 2017). Однак, більшість гострих запальних станів пов'язані з цитолізом клітин, що дозволяє внутрішньоклітинним протеїнам проникати в позаклітинну область і продовжувати там виконувати свої функції. Таким чином, МТ може вивільнятися з клітин, які зазнали змін проникності мембрани або під час некротичної загибелі клітин. Одним із результатів позаклітинної активності МТ може бути перерозподіл цинку між тканинами (Lynes et al., 2006). Відомо, що МТ-3 взаємодіє з протеїнами, що беруть участь у відповіді на тепловий шок, сигнальних шляхах, метаболічних ензимах і шаперонах, тому такі асоціації дозволяють націлювати МТ на позаклітинне середовище (El Ghazi et al., 2010). Вихід МТ з клітин і залучення позаклітинних МТ в агрегацію протеїну в тканинах мозку було показано при нейрозапальних процесах. Саме тому, одним із важливих завдань цього дослідження було дослідити функціонування та властивості МТ в патогенезі запалення, припускаючи їх позаклітинну локалізацію. У той час як внутрішньоклітинні МТ служать резервуаром для металів, позаклітинний протеїн може бути «сигналом небезпеки» смерті клітини або витоку (Lynes et al., 2006). У другій серії досліджень присутність МТ у синовіальній тканині та підвищення їх концентрації в GA-групі свідчить про їх участь у відповіді на запалення. Присутність МТ у позаклітинному просторі все ще ставить питання генезису їх появи у цьому середовищі. До кінця незрозуміло, чи вони активно секретуються чи пасивно вивільняються в результаті порушення цілісності мембрани. Тим не менш, все більша кількість доказів вказує на їх активну участь у модулюванні позаклітинних сигналів (Vignesh and Deere, 2017).

Результати факторного аналізу свідчать про високий рівень узгодженості між проявами реакцій металотіонеїнів та запальним процесом. Зокрема, до Фактору 1 вірогідно належали індекси CAT, GSH, ChE, TBARS, MTSN, Zn-MT і SiA. Найбільш відчутними реакціями організму, які належали до Фактора 1,

були показники зростання рівня SiA, Zn-MT та MTSH, що вказує на внесок MT у реакції на запалення у негативному зв'язку з показниками стресу та токсичності (CAT, GSH та ChE) (Рис. 4.5, Табл. 4.6).

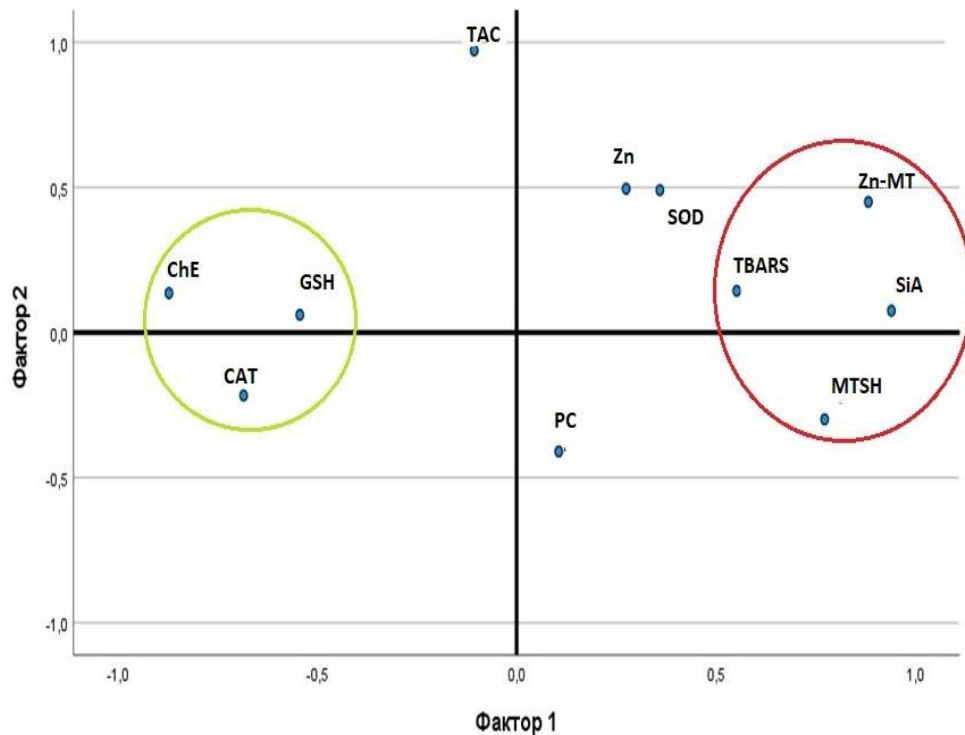


Рис. 4.5. Результати факторного аналізу біохімічних показників синовіальних тканин колінного суглоба щурів із гострим гонартритом (GA) та контрольних тварин (С)

Фактор 2 об'єднував індекси Zn, SOD і TAC, які розташовані у протилежному положенні щодо PC. Обернена залежність між цими показниками свідчить про те, що підвищена активність SOD, а також присутність неензимних антиоксидантів (Zn та TAC), викликана запаленням, може захистити від окисних ушкоджень протеїну в тканині під час гострого запалення, що спостерігалось у нашому дослідженні. Дійсно, активація SOD у тканині суглоба та/або в сироватці крові може бути тимчасовою відповіддю на окиснювальний стрес, спричинений запаленням (Silva et al., 2016). Дані інших експериментів також підтверджують, що SOD всередині та поза хондроцитами відіграє ключову роль у регулюванні АФК у хрящі (Liu et al., 2022). Проте дослідження Nguyen et al. (2020) вказує, що цей ензим відіграє важливу

патогенну роль у запальних захворюваннях, не лише каталізуючи перетворення супероксиду в перекис водню та кисень, але й впливаючи на імунні реакції. Синовіальна рідина містить значну кількість позаклітинної SOD, тоді як знижені рівні цього ензиму у сукупності з підвищеними концентраціями АФК у позаклітинному просторі виявлялися при пізній стадії хронічного запалення, таким чином, прискорюючи шкідливу окиснювальну дію в хрящовій тканині (Scott et al., 2010). Відтак, хронічне та гостре запалення відрізняється за ефективністю використання SOD у знешкодженні АФК. Це також спостерігалось в мишачій моделі остеоартриту, що вказує на вирішальну роль позаклітинної SOD у модуляції рівнів АФК у хрящовій тканині (Regan et al., 2008). Крім того, на моделі колаген-індукованого артрити було показано, що надмірна експресія позаклітинної SOD зменшує клінічні симптоми захворювання, включаючи зменшення набряку суглобів. SOD також знижувала секрецію прозапальних цитокінів, таких як IL-1 β , IL-2, IL-4, IFN- γ та TNF- α , пригнічувала руйнування хрящів і кісток (Yu et al., 2012).

Таблиця 4.6.

Розподіл біохімічних показників синовіальних тканин колінного суглоба щурів із гострим гонартритом (GA) та контрольних тварин (C) між двома факторами факторного аналізу

Показник	Фактор	
	1	2
SiA	,937	
Zn-MT	,849	,316
MTSH	,737	-,281
CAT	-,692	-,147
TBARS	,587	
GSH	-,543	
TAC		,956
SOD	,361	,519
PC	,116	-,396
ChE	-,887	,249

Повідомлялося про підвищення рівня антиоксидантів у пацієнтів з патологією ревматоїдного артрити, порівнюючи зі здоровими людьми, однак їх

було недостатньо для запобігання окисному пошкодженню (Garcia-Gonzalez et al., 2015). Як відомо, розвиток окисного стресу може призвести до зниження активності антиоксидантної системи та збільшення апоптозу в імунних клітинах (Yurkiv et al., 2015). У цьому дослідженні ми також виявили високий рівень окисних уражень ліпідів, незважаючи на підвищену активність SOD. Достовірна кореляція з MTSH із цього набору індексів відзначалась для SiA, тобто загальний рівень MT у тканині відображав стан запалення, визначений за рівнем сіалових кислот у крові (Табл. 4.7).

Таблиця 4.7.

Коефіцієнти кореляції Пірсона для показників синовіальних тканин колінного суглоба щурів із гострим гонартритом (GA) та контрольних тварин (C)

Індекси	CAT	SOD	TAC	MTSH	ChE	TBARS	PC	Zn-MT	GSH	SiA
SOD	-.232	1.000								
TAC	-.168	.495	1.000							
MTSH	-.394	.254	-.386	1.000						
ChE	.738	-.031	.186	-.695**	1.000					
TBARS	-.369	.266	.051	.258	-.494	1.000				
PC	.000	.011	-.453	.170	-.165	.123	1.000			
Zn-MT	-.532*	.595*	.252	.640**	-.606*	.614*	-.018	1.000		
GSH	.219	-.153	.128	-.537*	.419	-.219	.014	-.577*	1.000	
SiA	-.628**	.489	.019	.794**	-.770**	.492	.130	.800**	-.632**	1.000
Zn	.348	-.233	-.013	-.238	.260	-.233	.459	-.147	.309	-.352

Примітка. Позначення показників подано у тексті; * – Кореляція достовірна при 0,05 (2-хвостова), $|\alpha| > 0.497$; ** – Кореляція достовірна при 0,01 (2-хвостова), $|\alpha| > 0.623$, N=16.

Відповідно до тісного взаємозв'язку між набором індексів факторного аналізу (CAT, GSH, ChE, TBARS, MTSH, Zn-MT і SiA), значне зниження рівнів CAT, GSH та ChE безпосередньо пов'язане з MT та проявами запалення. Дійсно, дисбаланс антиоксидантного захисту, викликаний підвищеною

активністю SOD і зниженою активністю CAT, очевидно, викликає накопичення H_2O_2 (Dunning et al., 2013). Схожий антиоксидантний дисбаланс із незміненою або підвищеною активністю SOD, інгібуванням активності CAT і збільшенням продуктів окисних ушкоджень ліпідів у крові були зареєстровані у пацієнтів з ревматоїдним артритом і на ранній стадії хвороби Альцгеймера (Dröge, 2002).

Результати розрахунку АПБ кількісно демонструють найбільш відчутну відповідь ензиму антиоксидантного захисту SOD у досліджуваній патології, а також, менш інтенсивною є наявність прооксидантних процесів у вигляді утворення продуктів ушкодження ліпідів (TBARS). Крім того, була вираженою сумарна позитивна захисна реакція при стані гострого ГА (Рис. 4.6А,Б).

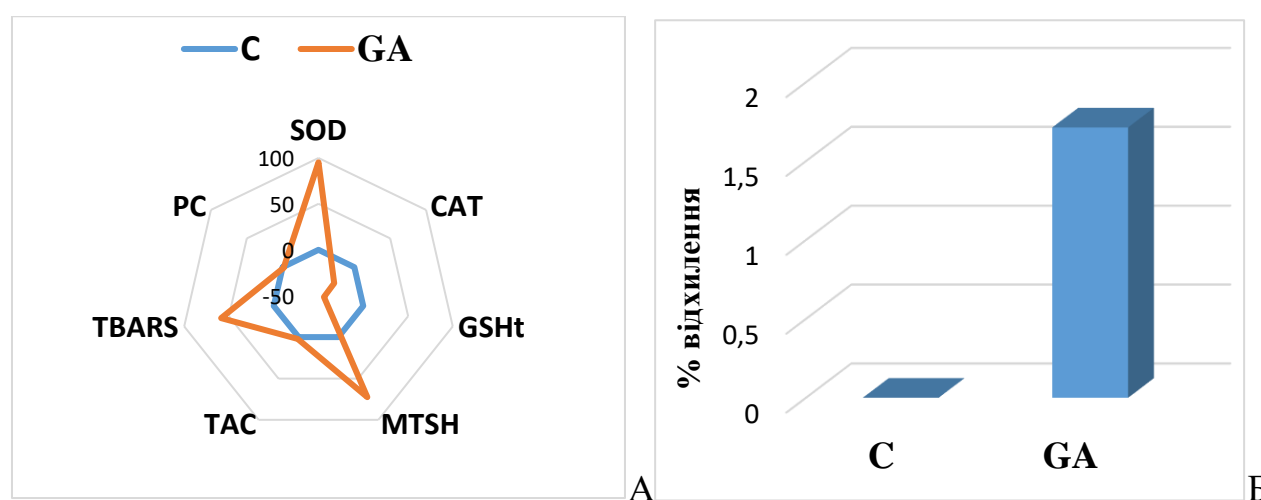


Рис. 4.6. Відхилення від контролю індивідуальних показників (А) та сумарні співвідношення антиоксидантно-прооксидантного балансу (АПБ) (Б) у синовіальних тканинах колінного суглоба щурів із гострим гонартритом (GA) та контрольних тварин (С)

У досліджуваній моделі ГА підвищений рівень SiA у плазмі крові щурів підтверджував тяжкість запалення (Pigman et al., 1958). Концентрація сіалових кислот була щільно включена в набір індексів, представлених MT та проявами окисного стресу. Нерівноцінно підвищені рівні MTSH та Zn-MT, які проявляються у зростанні як метальованої, так і апо-форми MT, може свідчити про плейотропну їх роль при патогенезі гострого ГА у щурів. Відтак, передбачається Zn-буферна функція MT та функція антиоксиданта.

Як відомо, Zn-зв'язувальні протеїни кодуються близько 10 % геному ссавців (Andreini et al., 2006). Редокс-інертність Zn дозволяє зв'язування великою кількістю металопротеїнів (Maret, 2000), тоді як МТ є основними регуляторами цього елемента, які сприймають внутрішньоклітинні сигнали та модулюють надходження Zn шляхом секвестрації, мобілізації або вивільнення. Широка участь МТ у запаленнях часто пов'язана із його функцією секвестрації та підтримки гомеостазу Zn. Гормональна індукція печінкових МТ призводила до перерозподілу концентрацій елемента між внутрішньоклітинним та позаклітинним простором та сприяла зниженню рівня Zn в плазмі та підвищенню Zn і Zn-МТ в гепатоцитах. Імунохімічне виявлення низьких концентрацій МТ в плазмі пов'язане позитивною кореляцією між статусом Zn та рівнями Zn-МТ, що свідчить про те, що рівні МТ можуть бути діагностичними для визначення статусу цього есенціального елемента (Vignesh and Deere, 2017). Дослідженням Dai et al., (2021) було продемонстровано, що МТ є життєво важливим компонентом саме гострої фази запалення, і його експресія може залежати від транспортера Zn-6 (Zfp6), що змінює внутрішньоклітинний гомеостаз Zn.

Zn посідає важливе місце в адекватному функціонуванні вродженого та адаптивного відділів імунітету і дефіцит цього елемента чинить несприятливий ефект на виробництво антитіл, цитокінів, клітинну передачу сигналів, проліферацію та функції Th і природних кілерів. Дефіцит Zn підвищує сприйнятливість до різного роду інфекцій, тоді як його надлишок може чинити токсичний вплив на імунні клітини (Rink and Gabriel, 2000). Zn також має протизапальні властивості, оскільки позитивно впливає на експресію протеїну цинкового пальця A20, який секвеструє NF- κ B, пригнічує його активацію та призводить до зниження генерації TNF та прозапальних хемокинів IL-1 та IL-8. NF- κ B відіграє ключову роль в імунних і запальних реакціях (Prasad et al., 2004). Таким чином, порушення внутрішньоклітинної біодоступності Zn може перешкоджати інгібуванню NF- κ B з подальшою підтримкою хронічного запалення.

МТ відіграють роль регулятора функцій імунних клітин, оскільки вони калібрують доступність Zn в організмі, таким чином, сприяючи імунологічній придатності. МТ можуть виконувати дві протилежні функції: вони можуть збільшувати внутрішньоклітинний пул Zn, тим самим полегшуючи метаболічні процеси під час відповіді гострої фази, або навпаки, секвеструвати цей елемент задля забезпечення максимальної активності ензимів, які в іншому випадку інгібувалися б Zn (Coyle et al., 2002). Як стверджують дослідження, цитокіни, такі як TNF- α , IL-1 α , IL-6 та інтерферон- γ , модулюють метаболізм МТ та Zn у неімунологічних органах, таких як тканина печінки, та все більше доказів вказує на те, що цитокіни мають глибокий вплив на регуляцію генів МТ і функції також у мієлоїдному та лімфоїдному відділах (Wu et al., 2013; Vignesh et al., 2016; Vignesh and Deere, 2017). Рекомбінантні цитокіни IL-1 α , IL-1 β та IFN- γ можуть ефективно індукувати експресію МТ в яєчниках, матці та печінці мишей, тоді як IL-6 і TNF- α були ефективними лише в печінці. TNF- α також є потужним індуктором експресії цього протеїну в легенях і серці (Sun et al., 2018). Нещодавно було повідомлено, що надмірна експресія МТ у трансгенних мишей зменшила запалення гіпокампу, спричинене каїновою кислотою (Penkowa et al., 2005). Значні кількості позаклітинного МТ були виявлені навколо гіпертрофічної реактивної астроглії у трансгенних мишей. Ці докази також свідчать про те, що МТ може захищати клітини через свою протизапальну дію (Lynes et al., 2006).

Накопичення експериментальних даних досліджень мишей та людей з дефіцитом МТ продемонструвало критичну імунорегуляторну роль ізоформ МТ при раку, інфекційних захворюваннях, захворюваннях центральної нервової системи, аутоімунних і запальних захворюваннях кишечника (Dai et al., 2021). При різних формах ішемічних ушкоджень, наприклад, ішемії кори головного мозку, ішемії нирок (Takahashi et al., 2001) та ішемічно-реперфузійному ураженні міокарда (Wang et al., 2001), МТ може відігравати антиоксидантну роль (Lynes et al., 2006).

Дослідження Crowthers et al. (2000) повідомило, що при дефіциті МТ-1/МТ-2 спостерігалось збільшення кількості лімфоїдних клітин і на 19 % ваги селезінки, яка є основним місцем для вироблення антитіл, очищення еритроцитів і фільтрації патогенів. При цьому, кількість циркулюючих лімфоцитів і В-клітин селезінки була знижена у цих мишей, але кількість і частка селезінкових CD4 + і CD8 + Т-клітин були незначно підвищені, що доводить роль МТ у регуляції адаптивного імунітету.

Результати факторного аналізу (Рис. 4.5) підтверджують ключове місце Zn-МТ серед інших показників у суглобовій тканині та відповідність тяжкості запалення, що було визначене за рівнем SiA у плазмі.

У нашому дослідженні загальний рівень Zn в тканинах суглоба при запаленні не виявляв зміни, порівнюючи з контрольною групою. Проте порівняння цього показника і Zn-МТ продемонструвало, що не тільки концентрація, але й частина Zn у МТ, порівняно з загальним рівнем Zn, збільшилася при патології. Посилена секвестрація Zn цими протеїнами спостерігалась за впливу усіх експозицій (за єдиним винятком) у аборигенній популяції молюсків, які виявляли вищу чутливість відповідей на стресові фактори, ніж інвазивні представники. МТ більш посилено секвестрували Zn при стані гострого ГА, при цьому, збільшення частки металювання МТ може мати місце завдяки перерозподілу цього елемента між іншими клітинними мішенями. Причиною такого прояву може бути підвищена експресія МТ. Цей захисний механізм може забезпечувати зберігання есенціального Zn в клітинах під час хронічного запалення або інших стресових умов, які пов'язані з низькою внутрішньоклітинною біодоступністю іонів цього елемента. Завдяки секвестрації Zn МТ можуть послабити індуковане Zn інгібування та активувати NF- κ B (Kim et al., 2003). Проте було повідомлено і про негативну регуляторну роль МТ у активації NF- κ B, що можна пояснити модуляцією окисно-відновного балансу через антиоксидантні функції МТ, оскільки вказаний транскрипційний фактор є редокс-залежним (Kabe et al., 2005). Таким чином, збільшення апо-форми МТ, що було продемонстровано у нашому дослідженні, і реалізація їх

антиоксидантного потенціалу може чинити прямий вплив на негативну регуляцію редокс-залежного NF- κ B та, відповідно, прозапальних цитокінів.

Секвестрація Zn MT при запаленні може мати й інші сприятливі ефекти: по-перше, це явище обмежує доступ Zn до патогенів у позаклітинному середовищі; і, по-друге, секвестрація Zn потенційно сприяє хемотаксичній міграції імунних клітин до місця запалення (Aydemir et al., 2012). Як відомо, при запаленні існує певний взаємозв'язок між експресією генів MT та інтерлейкіну-1. Нерівноцінне зростання рівнів MTSN та їх металізованої форми можна пояснити також їх участю у захисті клітин від тривалого підвищеного виробництва прозапальних цитокінів, оскільки Zn, що виділяється MT, може представляти ключовий клітинний фактор окисного стресу шляхом встановлення перехресного зв'язку між MT і запальними цитокінами (Gonzalez-Iglesias et al., 2014). Таким чином, захисна роль MT проявляється у вивільненні Zn для оптимальної імунної відповіді, наприклад, екстратимічний T-клітинний шлях (Mocchegiani et al., 2006).

Отже, згідно з нашими результатами, порівняння вмісту Zn-MT та загального вмісту Zn у тканині можна використовувати для визначення ступеню патології. Два індекси MT, MTSN і Zn-MT, рідко порівнюються в одному дослідженні (Krezel and Maret, 2016). Однак лише ця комбінація дає можливість свідчити про недостатню металізацію MT. Крім того, нами було показано, що інші Zn-зв'язуючі протеїни недостатньо металізовані в Zn-дефіцитних клітинах (Wang et al., 2018). У представленій серії досліджень ця комбінація надала докази спотворення функції MT як ранньої зміни, пов'язаної з дисбалансом SOD/CAT.

У нашому дослідженні припускалося, що однією з найважливіших позаклітинних функцій MT при патології може бути пом'якшення від окисного пошкодження, базуючись на тому факті, що MT складаються приблизно на 30 % із залишків цистеїну, які є дуже чутливими до окиснення, а запалення може індукувати високий рівень окисного стресу (Lynes et al., 2006; Maret, 2019). Окисний стрес відіграє важливу роль у розвитку артриту, оскільки у

запальному середовищі гіпоксія синовіальних тканин призводить до пошкодження мітохондрій, що, у свою чергу, підвищує рівень АФК та ще більше посилює запалення. Крім того, окиснювальний стрес значно прискорює старіння хондроцитів, що сприяє розвитку захворювання, порушує регуляцію окисно-відновних процесів мітохондрій у хрящі та стимулює виробництво АФК для подальшого загострення (Liu et al., 2022). Більше того, оскільки запальний процес може викликати окиснювальний стрес, окиснювальний стрес також може викликати запалення через активацію багатьох шляхів (Biswas, 2016).

Рівень РС не був суттєво змінений при ГА, тому окисних ушкоджень протеїнів не було виявлено в цій моделі гострого запалення. Проте рівень TBARS виявляв окисні ушкодження ліпідів у тварин із патологією, що є наслідком зниженої активності каталази і накопичення пероксиду водню. Доказом підвищення АФК є також підвищена активність SOD. Як простежується з розрахунку АПБ, саме ці два компоненти (SOD і TBARS) є найбільш значущими серед досліджуваних антиоксидантів та прооксидантів (Рис. 4.6).

Особливі взаємозв'язки MTSH і Zn-MT та проявами окисного стресу очевидні з факторного аналізу (Рис. 4.5). Представлений набір індексів окисного стресу (CAT, GSH, ChE, TBARS, MTSH, Zn-MT і SiA) доводить, що втрата Zn-зв'язувальної активності термостабільних тіолів пов'язана з пероксид-залежною стадією надлишкової активності АФК. Саме тому, підвищений рівень апо-форми MT можна пояснити їх посиленою участю у контролі окисно-відновних реакцій при запаленні через поглинання АФК (Maret, 2019). Недовантаження термостабільних протеїнів Zn мало місце завдяки частковому окисненню тіолів у MT. Крім того, поява піку з вищою за MT молекулярною масою при гель-розподільчій хроматографії може бути пов'язана з олігомеризацією MT внаслідок окиснення тіолатних кластерів (Wilhelmsen et al., 2002). Залишки цистеїну у метал-тіолатних кластерах особливо вразливі до H_2O_2 (Rudyk and Eaton, 2014) і можуть особливо легко окиснюватися з утворенням дисульфідних містків, оскільки окисно-відновний

потенціал тіолів дуже високий (Maret and Vallee, 1998). Зниження рівня GSH, виявлене у нашому дослідженні, також може служити причиною слабкої стабільності MT-споріднених тіолів. У дослідженні Dunning et al. (2013) виснаження GSH підвищувало чутливість зірчастих клітин печінки до некрозу, індукованого H₂O₂.

Деякі дослідження підтверджують роль MT як імуносупресивного агента. Зміна рівня MT корелювала із проявом неінфекційних запальних захворювань, включаючи розсіяний склероз (Haase and Linker, 2021), хворобу Паркінсона (Pajares et al., 2020), хворобу Альцгеймера (Forloni and Balducci, 2018), atopічний дерматит (Guo et al., 2018), остеоартрит і ревматоїдний артрит (Sun et al., 2018). Крім того, дослідження показали, що MT діє як імунний медіатор для придушення запальних реакцій при цих захворюваннях шляхом зниження регуляції пов'язаних із захворюванням прозапальних цитокінів (Ma et al., 2022).

Youn et al. (2002) у своїй праці демонструють пригнічувальну дію MT на індукований колагеном артрит, що обумовлено зниженими рівнями прозапальних медіаторів (TNF- α і циклооксигенази-2) та зниженням проліферативної відповіді у тварин, яким вводили MT1/MT2. Трансгенні миші з надмірною експресією MT показали значно знижену сприйнятливність до індукованого колагеном артриту та підвищений рівень протизапального цитокіну IL-10 та трансформуючого фактора росту TGF β , які виявляють супресивний ефект на вроджену імунну систему. Дослідження Won et al. (2016), де також виявлялися підвищені рівні MT при остеоартриті, дозволило розкрити антиапоптотичну роль MT у хондроцитах, оскільки після делеції MT1/MT2 відсоток підданих апоптозу суглобових хондроцитів значно підвищився. Проте хронічне підвищення рівня MT-2 несподівано сприяло патогенезу захворювання, викликаючи дисбаланс у гомеостазі між матриксним катаболізмом і анаболізмом. Таким чином, MT можуть виконувати плейотропну роль у патогенезі запалення.

Як відомо, розвиток аутоімунного захворювання ревматоїдного артриту пов'язаний із дисбалансом між T-хелперами (Th17) і регуляторними T-

клітинами (Treg) (Sun et al., 2018). Було доведено, що МТ пригнічує диференціювання клітин Th17, але є позитивним регулятором природної диференціації Т- клітин у клітини Treg. Миші, які отримували МТ-1, мали вищу частку клітин Treg і вищі рівні експресії ІL-10 у клітинах Treg (Sun et al., 2018). Загалом, Treg-клітини знижують інтенсивність імунної відповіді. При раку надлишкова їх активність може стати на заваді імунній системі у руйнуванні ракових клітин, а при аутоімунних захворюваннях їх дефіцит може дозволити іншим аутоімунним клітинам атакувати тканини організму (Curiel, 2008). Примітно, що МТ-1 сильно експресується в клітинах Th17, але він відіграє негативну регуляторну роль у цих клітинах (Sun et al., 2018). МТ-1 може пригнічувати диференціацію цих клітин і інгібувати експресію пов'язаних з Th17 генів (Dai et al., 2021). Таким чином, МТ-1 може проявлятися як протеїн, який бере участь у імуносупресії патогенезу шляхом зміщення балансу Th17/Treg (Sun et al., 2018).

У рамках даного дослідження ми хотіли б сформулювати гіпотезу щодо можливої молекулярної функції МТ у патогенезі запальних та дегенеративно-дистрофічних захворювань суглобової тканини. Оскільки більшість гострих запальних станів пов'язані з цитолізом клітин, це дозволяє внутрішньоклітинним протеїнам, у тому числі МТ проникати в позаклітинну область. Ми припускаємо, що важливе еволюційне місце МТ окреслено наступним чином. В умовах гострого запально-деструктивного процесу вони здатні проникати у синовіальну рідину і самостійно накопичувати Zn, вимикаючи у такий спосіб активність протеїнів, таких як Zn-залежні металопротеїнази, значення яких у патогенезі захворювань суглобів є незаперечним (Itoh, 2017). Така функція МТ має бути вираженою в умовах, коли вони беруть мінімальну участь в антиоксидантному захисті, а рівень GSH не виснажується. Ця гіпотеза була зроблена на основі аналізу деяких наукових робіт (Won et al., 2016; Itoh, 2017), хоча вона не була сформульована авторами. Це припущення також опосередковано підтверджується нашими даними про збільшення абсолютної кількості Zn-МТ при незмінному значенні загального

Zn у гомогенаті суглоба на фоні гострого ГА. Проте наші дані не дають чіткої відповіді на це питання. Підтвердження такого молекулярного механізму МТ потребує подальших поглиблених досліджень.

Втім, отримані дані доводять важливість участі Zn у відповіді на запалення в тісному зв'язку з другою фазою поглинання АФК. Крім того, слабкість МТ щодо зв'язування Zn через можливе окисне пошкодження тіолу може забезпечити вирішальний внесок у відповіді на запалення. Це дослідження створює основу для розуміння дисбалансу Zn при патології ГА та вибору біохімічних маркерів для оцінки адекватного фармакологічного лікування патологій колінного суглоба.

Відтак, результати нашого дослідження підкреслюють важливість оцінки впливу багатьох факторів стресу для повного розуміння ролі та функцій МТ на різних модельних організмах. При цьому, запалення та вплив мікрополітантів-імуномодуляторів (кофеїну та МР) викликали підвищення їх антиоксидантного потенціалу задля зменшення рівня окисного стресу клітинами. Проте при запаленні їх позаклітинна роль була більш функціональною, обґрунтовуючи зв'язок з Zn-залежними металопроназами. Варто також вказати, що інвазивні види більш ефективно використовували МТ як антиоксиданти, тоді як аборигенні залучали глутатіонову систему антиоксидантного захисту, тому, інвазивність виду варто враховувати при оцінці стресових чинників на організм.

ВИСНОВКИ

У результаті порівняльного дослідження на моделях двостулкових молюсків *Dreissena polymorpha* з двох популяцій та гонартриту у лабораторних щурів встановлено уніфіковану відповідь металотіонеїнів за розвитку запального процесу, котра полягає у зростанні частки неметальованого політіолу, що сприяє антиоксидантному захисту та, у молюсків, поєднується з активацією ензимів апоптозу та/або аутофагії, залежно від преадаптації у певній популяції. Синергічний ефект мульти-стресу за впливу мікропластика та кофеїну у молюсків частково нівелюється тепловим чинником.

1. Аналіз стану низькомолекулярного тіолому довів, що за впливу мікропластику ($1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$), кофеїну ($20,0 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$), підвищеної температури ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) та їх комбінованої дії протягом 14 діб у дрейсени з аборигенної та інвазивної популяції зростає концентрація неметальованого металотіонеїну у тканинах. При цьому, в аборигенній популяції зростає і концентрація цинк-металотіонеїну (за окремими виключеннями) та редокс індекс глутатіону (за впливу мікропластику та комбінованого впливу). У інвазивній популяції концентрація метальованого металотіонеїну та стан системи глутатіону не зазнавали змін.

2. Відзначено різну активність системи антиоксидантного захисту та її здатності до реагування на експериментальні впливи у молюсків з двох популяцій. У молюсків аборигенної популяції встановлено пригнічення активності Mn-супероксиддисмутази та каталази за комбінованого та температурного впливу, що супроводжувалось зростанням концентрації карбонілів протеїнів, проте зменшенням утворення продуктів перекисного окиснення ліпідів. У інвазивній популяції активувалась Cu,Zn-супероксиддисмутаза (за виключенням впливу мікропластику) та каталаза (за впливу суміші), зростав рівень карбонілів протеїнів (за впливу мікропластику та підвищеної температури) та рівень малонового діальдегіду (за впливу суміші).

3. Доведено, що комбінована дія мікропластику та кофеїну в обох популяціях викликала синергічний ефект щодо активації фенолоксидази, лаккази, ензимів апоптозу каспази-3 та катепсину Д, який частково нівелювався за теплового впливу. В аборигенній популяції суміш ксенобіотиків викликала вихід катепсину Д з лізосом. За всіх експериментальних умов відзначено дестабілізацію лізосомальних мембран, особливо значну в аборигенній популяції молюсків.

4. Виявлено присутність металотіонеїнів у синовіальній тканині колінного суглоба щурів. У тварин із запаленням спостерігалось зростання концентрації загального протеїну металотіонеїну та його цинк-вмісної форми із збільшенням частки апоформи, тоді як рівень глутатіону зменшувався.

5. За карагенан-індукованого гострого гонартриту у синовіальній тканині щурів відзначено дисбаланс системи антиоксидантного захисту, що проявлялося як активація супероксиддисмутази й інгібування каталази та поєднується із зростанням рівня малонового діальдегіду і зниженням активності холінестерази.

6. Застосування факторного аналізу підтвердило в обох модельних схемах відповідність у реактивності МТ, показників запального процесу та антиоксидантного захисту за впливу стресорних чинників. Порівняння двох популяцій молюсків продемонструвало переваги інвазивної популяції над аборигенною у резистентності до стресових впливів та специфічність реакції на мікропластик та кофеїн залежно від особливостей преадаптації у біотопі.

7. Пропонується оцінювати рівень металотіонеїнів та ступінь їх насичення цинком для оцінки стратегії кінцевих наслідків несприятливих впливів залежно від сили ураження та особливостей преадаптації до дії стресорного чинника.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Столяр О. Б., Фальфушинська Г. І., Гнатишина Л. Л., Юкало В. Г. Молекулярні реакції водних тварин на вплив пошкоджувальних чинників середовища: монографія. Тернопіль: ТНТУ ім. Івана Пулюя, 2016. 346 с.
2. Aebi, H. (1974). Catalase. In H. U. Bergmeyer (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis* (pp. 671–684). London: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-091302-2.50032-3>
3. Aguirre-Martínez, G. V., Del Valls, T. A., & 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>
4. Aguirre-Martínez, G. V., Owuor, M. A., Garrido-Pérez, C., Salamanca, M. J., Del Valls, T. A., & Martín-Díaz, M. L. (2015). Are standard tests sensitive enough to evaluate effects of human pharmaceuticals in aquatic biota? Facing changes in research approaches when performing risk assessment of drugs. *Chemosphere*, 120, 75–85. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.05.087>
5. Al Reef, T., & Ghanem, E. (2018). Caffeine: Well-known as psychotropic substance, but little as immunomodulator. *Immunobiology*, 223(12), 818–825. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2018.08.011>
6. Alfaro-Núñez, A., Astorga, D., Cáceres-Farías, L., Bastidas, L., Soto Villegas, C., Macay, K., & Christensen, J. H. (2021). Microplastic pollution in seawater and marine organisms across the Tropical Eastern Pacific and Galápagos. *Scientific reports*, 11(1), 6424. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85939-3>
7. Ali, A. M., Rønning, H. T., Sydnes, L. K., Alarif, W. M., Kallenborn, R., & Al-Lihaibi, S. S. (2018). Detection of PPCPs in marine organisms from contaminated coastal waters of the Saudi Red Sea. *The Science of the total environment*, 621, 654–662. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.298>
8. Al-Khalaifah, H., & Al-Nasser, A. (2018). Immune response of molluscs. In *Molluscs* (p. 1). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.81778>

9. 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>
10. American Chemical Society. (2023). *3D Model of Caffeine*. Retrieved from <https://www.acs.org/education/resources/undergraduate/chemistryincontext/interactives/brewing-and-chewing/3d-model-caffeine.html>
11. Amiard, J. C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., & Rainbow, P. S. (2006). Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, *76*(2), 160–202. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.08.015>
12. Andreini, C., Banci, L., Bertini, I., & Rosato, A. (2006). Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *Journal of proteome research*, *5*(1), 196–201. <https://doi.org/10.1021/pr050361j>
13. Aquilano, K., Baldelli, S., & Ciriolo, M. R. (2014). Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Frontiers in pharmacology*, *5*, 196. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00196>
14. Asghar, M. A., Zhu, Q., Sun, S., Peng, Y., & Shuai, Q. (2018). Suspect screening and target quantification of human pharmaceutical residues in the surface water of Wuhan, China, using UHPLC-Q-Orbitrap HRMS. *The Science of the total environment*, *635*, 828–837. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.179>
15. Ates, I., Kaplan, M., Yuksel, M., Mese, D., Alisik, M., Erel, Ö., Yilmaz, N., & Guler, S. (2016). Determination of thiol/disulphide homeostasis in type 1 diabetes mellitus and the factors associated with thiol oxidation. *Endocrine*, *51*(1), 47–51. <https://doi.org/10.1007/s12020-015-0784-6>
16. Atrián-Blasco, E., Santoro, A., Pountney, D. L., Meloni, G., Hureau, C., & Faller, P. (2017). Chemistry of mammalian metallothioneins and their interaction with amyloidogenic peptides and proteins. *Chemical Society Reviews*, *46*(24), 7683–7693. <https://doi.org/10.1039/C7CS00448F>

17. Aydemir, T. B., Chang, S. M., Guthrie, G. J., Maki, A. B., Ryu, M. S., Karabiyik, A., & Cousins, R. J. (2012). Zinc transporter ZIP14 functions in hepatic zinc, iron and glucose homeostasis during the innate immune response (endotoxemia). *PloS one*, 7(10), e48679. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048679>
18. Azam, S., Hadi, N., Khan, N. U., & Hadi, S. M. (2003). Antioxidant and prooxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, 9(9), BR325–BR330. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12960921/>
19. Babich, H., & Borenfreund, E. (1990). Applications of the neutral red cytotoxicity assay to in vitro toxicology. *Alternatives to laboratory animals*, 18, 129–144. <https://doi.org/10.1177/026119299001800116.1>
20. Babula, P., Masarik, M., Adam, V., Eckschlager, T., Stiborova, M., Trnkova, L., ... & Kizek, R. (2012). Mammalian metallothioneins: properties and functions. *Metallomics : integrated biometal science*, 4(8), 739–750. <https://doi.org/10.1039/c2mt20081c>
21. Balcerczyk, A., & Bartosz, G. (2003). Thiols are main determinants of total antioxidant capacity of cellular homogenates. *Free radical research*, 37(5), 537–541. <https://doi.org/10.1080/1071576031000083189>
22. Barrett, A. J. (1977). Cathepsin D and other carboxyl proteinases In A. J. Barrett (Ed.), *Proteinases in Mammalian Cells and Tissues* (pp. 240-243). Netherlands: North-Holland Publishing Company.
23. Bayliak, M., & Abrat, O. B. (2020). Role of Nrf2 in oxidative and inflammatory processes in obesity and metabolic diseases. In N. Deng, (Ed.), *Nrf2 and its Modulation in Inflammation. Series: Progress in Inflammation Research* (pp. 153–187). Springer International Publishing; Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-44599-7_7
24. Beck, T. W., Housh, T. J., Schmidt, R. J., Johnson, G. O., Housh, D. J., Coburn, J. W., & Malek, M. H. (2006). The acute effects of a caffeine-containing

supplement on strength, muscular endurance, and anaerobic capabilities. *Journal of strength and conditioning research*, 20(3), 506–510. <https://doi.org/10.1519/18285.1>

25. Beiras, R., & Schönemann, 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>

26. Benedetti, M., Giuliani, M.E., Mezzelani, M., Nardi, A., Pittura, L., Gorbi, S., & Regoli, F. (2022). Emerging environmental stressors and oxidative pathways in marine organisms: Current knowledge on regulation mechanisms and functional effects. *BIOCELL*, 46, 37-49. <https://doi.org/10.32604/biocell.2022.017507>

27. Benes, P., Vetvicka, V., & Fusek, M. (2008). Cathepsin D--many functions of one aspartic protease. *Critical reviews in oncology/hematology*, 68(1), 12–28. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2008.02.008>

28. Benhar, M. (2020). Oxidants, antioxidants and thiol redox switches in the control of regulated cell death pathways. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(4), 309. <https://doi.org/10.3390/antiox9040309>

29. Bergami, E., Bocci, E., Vannuccini, M. L., Monopoli, M., Salvati, A., Dawson, K. A., & Corsi, I. (2016). Nano-sized polystyrene affects feeding, behavior and physiology of brine shrimp *Artemia franciscana* larvae. *Ecotoxicology and environmental safety*, 123, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.09.021>

30. Biswas, S. K. (2016). Does the interdependence between oxidative stress and inflammation explain the antioxidant paradox? *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016, 5698931. <https://doi.org/10.1155/2016/5698931>

31. Bocchetti, R., Lamberti, C. V., Pisanelli, B., Razzetti, E. M., Maggi, C., Catalano, B., ... & Regoli, F. (2008). Seasonal variations of exposure biomarkers, oxidative stress responses and cell damage in the clams, *Tapes philippinarum*, and mussels, *Mytilus galloprovincialis*, from Adriatic sea. *Marine environmental research*, 66(1), 24–26. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2008.02.013>

32. Bouétard, A., Côte, J., Besnard, A. L., Collinet, M., & Coutellec, M. A. (2014). Environmental versus anthropogenic effects on population adaptive

divergence in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *PloS one*, 9(9), e106670. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106670>

33. Bozhkov, A. I., Sidorov, V. I., Alboqai, O. K., Akzhyhitov, R. A., Kurguzova, N. I., Malyshev, A. B., Albegai, M. A. Y., & Gromovoi, T. Yu. (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>

34. Breitwieser, M., Thomas-Guyon, H., Huet, V., Sagerup, K., & Geraudie, P. (2018). Spatial and temporal impacts of the Skjervøy harbour diesel spill on native population of blue mussels: A sub-Arctic case study. *Ecotoxicology and environmental safety*, 153, 168–174. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.01.033>

35. Brücksken, K. A., Palacio, P. L., & Hanschmann, E. M. (2022). Thiol modifications in the extracellular space-key proteins in inflammation and viral infection. *Frontiers in Immunology. Section Inflammation*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.932525>

36. Buerge, I. I., Poiger, T., Müller, M. D., & Buser, H. R. (2003). Caffeine, an anthropogenic marker for wastewater contamination of surface waters. *Environmental science & technology*, 37(4), 691–700. <https://doi.org/10.1021/es020125z>

37. Buico, A., Cassino, C., Dondero, F., Vergani, L., & Osella, D. (2008). Radical scavenging abilities of fish MT-A and mussel MT-10 metallothionein isoforms: An ESR study. *Journal of inorganic biochemistry*, 102(4), 921–927. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2007.12.012>

38. Burdan, F. (2015). Pharmacology of caffeine: the main active compound of coffee. In *Coffee in Health and Disease Prevention* (pp. 823-829). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409517-5.00090-5>

39. Burgiel S., & Muir A. (2010). Invasive species, climate change and ecosystem-based adaptation: addressing multiple drivers of global change global

invasive species programme. *Global Invasive Species Programme*.
<https://doi.org/10.13140/2.1.1460.8161>

40. Busch, C. R., Heath, D. D., & Hubberstey, A. (2004). Sensitive genetic biomarkers for determining apoptosis in the brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*). *Gene*, 329, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.01.004>

41. Canela, M. C., Jardim, W. F., Sodré, F. F., & Grassi, M. T. (2014). Cafeína em águas de abastecimento público no Brasil. *Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas–INCTAA*. São Carlos-SP: Editora Cubo, 100 p.
<https://doi.org/10.13140/2.1.3543.3289>

42. Canpolat, E., & Lynes, M. A. (2001). In vivo manipulation of endogenous metallothionein with a monoclonal antibody enhances a T-dependent humoral immune response. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 62(1), 61–70. <https://doi.org/10.1093/toxsci/62.1.61>

43. Cantwell, M. G., Katz, D. R., Sullivan, J. C., Borci, T., & Chen, R. F. (2016). Caffeine in Boston Harbor past and present, assessing its utility as a tracer of wastewater contamination in an urban estuary. *Marine pollution bulletin*, 108(1-2), 321–324. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.04.006>

44. Cao, J., Xu, R., Wang, F., Geng, Y., Xu, T., Zhu, ... & Guo, M. Y. (2023). Polyethylene microplastics trigger cell apoptosis and inflammation via inducing oxidative stress and activation of the NLRP3 inflammasome in carp gills. *Fish & shellfish immunology*, 132, 108470.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.108470>

45. Cenesiz, S. (2020). The role of oxidant and antioxidant parameters in the infectious diseases: A systematic literature review. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 26(6).<https://doi.org/10.9775/kvfd.2020.24618>.

46. Cerenius, L., & Söderhäll, K. (2021). Immune properties of invertebrate phenoloxidases. *Developmental and comparative immunology*, 122, 104098.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2021.104098>

47. Chen, S., Tan, Z., Qi, Y., & Ouyang, C. (2019). Sorption of tri-n-butyl phosphate and tris(2-chloroethyl) phosphate on polyethylene and polyvinyl chloride

microplastics in seawater. *Marine pollution bulletin*, 149, 110490.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110490>

48. Christou, K., Markoulis, N., Moulas, A. N., Pastaka, C., & Gourgoulianis, K. I. (2003). Reactive oxygen metabolites (ROMs) as an index of oxidative stress in obstructive sleep apnea patients. *Sleep & breathing = Schlaf & Atmung*, 7(3), 105–110. <https://doi.org/10.1007/s11325-003-0105-9>

49. Clark, R., & Kupper, T. (2005). Old meets new: the interaction between innate and adaptive immunity. *The Journal of investigative dermatology*, 125(4), 629–637. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2005.23856.x>

50. Claus, H. (2010). Copper-containing oxidases: Occurrence in soil microorganisms, properties, and applications. *Soil Heavy Metals*, 281-313. https://doi.org/10.1007/978-3-642-02436-8_13

51. Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., & Galloway, T. S. (2011). Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. *Marine pollution bulletin*, 62(12), 2588–2597. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.09.025>

52. Comes, G., Fernandez-Gayol, O., Molinero, A., Giralt, M., Capdevila, M., Atrian, S., & Hidalgo, J. (2019). Mouse metallothionein-1 and metallothionein-2 are not biologically interchangeable in an animal model of multiple sclerosis, EAE. *Metallomics : integrated biometal science*, 11(2), 327–337. <https://doi.org/10.1039/c8mt00285a>

53. Corsetti, G., Pasini, E., Assanelli, D., Saligari, E., Adobati, M., & Bianchi, R. (2007). Acute caffeine administration decreased NOS and Bcl2 expression in rat skeletal muscles. *Pharmacological research*, 55(2), 96–103. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2006.10.001>

54. Coyle, P., Hubert, C. A., Philcox, J. C., & Rofe, A. M. (2001). Importance of storage conditions for the stability of zinc- and cadmium-induced metallothionein. *Biological trace element research*, 81(3), 269–278. <https://doi.org/10.1385/BTER:81:3:269>

55. 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>
56. Crowthers, K. C., Kline, V., Giardina, C., & Lynes, M. A. (2000). Augmented humoral immune function in metallothionein-null mice. *Toxicology and applied pharmacology*, 166(3), 161–172. <https://doi.org/10.1006/taap.2000.8961>
57. Cruz, D., Almeida, Â., Calisto, V., Esteves, V. I., Schneider, R. J., Wrona, F. J., ... & Freitas, R. (2016). Caffeine impacts in the clam *Ruditapes philippinarum*: Alterations on energy reserves, metabolic activity and oxidative stress biomarkers. *Chemosphere*, 160, 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.06.068>
58. Cunha, R. A. (2016). How does adenosine control neuronal dysfunction and neurodegeneration? *Journal of neurochemistry*, 139(6), 1019-1055. <https://doi.org/10.1111/jnc.13724>
59. Curiel, T. J. (2008). Regulatory T cells and treatment of cancer. *Current opinion in immunology*, 20(2), 241–246. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2008.04.008>
60. Czerska, M., Mikołajewska, K., Zieliński, M., Gromadzińska, J., & Wąsowicz, W. (2015). Today's oxidative stress markers. *Medycyna pracy*, 66(3), 393–405. <https://doi.org/10.13075/mp.5893.00137>
61. Dai, H., Wang, L., Li, L., Huang, Z., & Ye, L. (2021). Metallothionein 1: a new spotlight on inflammatory diseases. *Frontiers in immunology*, 12, 739918. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.739918>
62. de Souza, D. M., Martins, Á. C., Jensen, L., Wasielesky Jr, W., Monserrat, J. M., & Garcia, L. D. O. (2014). Effect of temperature on antioxidant enzymatic activity in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* in a BFT (Biofloc technology) system. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 47(1), 1-10. <https://doi.org/10.1080/10236244.2013.857476>
63. Ding, N., Jiang, L., Wang, X., Wang, C., Geng, Y., Zhang, ... & Liu, H. (2022). Polyethylene microplastic exposure and concurrent effect with *Aeromonas*

hydrophila infection on zebrafish. *Environmental science and pollution research international*, 29(42), 63964–63972. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-20308-9>

64. Ding, Z. C., Ni, F. Y., & Huang, Z. X. (2010). Neuronal growth-inhibitory factor (metallothionein-3): structure-function relationships. *The FEBS journal*, 277(14), 2912–2920. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07716.x>

65. Diniz, V., Reyes, G. M., Rath, S., & Cunha, D. G. (2020). Caffeine reduces the toxicity of albendazole and carbamazepine to the microalgae *Raphidocelis subcapitata* (Sphaeropleales, Chlorophyta). *International Review of Hydrobiology*, 105(5-6), 151-161. <https://doi.org/10.1002/iroh.201902024>

66. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. (2010). *OJEU*, L276, 33-79. Retrieved from <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:en:PDF>

67. Dodor, D. E., Hwang, H. M., & Ekunwe, S. I. (2004). Oxidation of anthracene and benzo [a] pyrene by immobilized laccase from *Trametes versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(2-3), 210-217. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.04.007>

68. Dóka, É., Ida, T., Dagnell, M., Abiko, Y., Luong, N. C., Balog, N., ... & Nagy, P. (2020). Control of protein function through oxidation and reduction of persulfidated states. *Science advances*, 6(1), eaax8358. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax8358>

69. Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, 82(1), 47–95. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>

70. Dunn, M. A., Blalock, T. L., & Cousins, R. J. (1987). Metallothionein. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 185(2), 107–119. <https://doi.org/10.3181/00379727-185-42525a>

71. Dunning, D. L., Holmes, J., & Gathercole, S. E. (2013). Does working memory training lead to generalized improvements in children with low working

memory? A randomized controlled trial. *Developmental science*, 16(6), 915–925.
<https://doi.org/10.1111/desc.12068>

72. Edwards, Q. A., Kulikov, S. M., & Garner-O'Neale, L. D. (2015). Caffeine in surface and wastewaters in Barbados, West Indies. *SpringerPlus*, 4, 57.
<https://doi.org/10.1186/s40064-015-0809-x>

73. El Ghazi, I., Martin, B. L., & Armitage, I. M. (2010). New proteins found interacting with brain metallothionein-3 are linked to secretion. *International journal of Alzheimer's disease*, 2011, 208634. <https://doi.org/10.4061/2011/208634>

74. El Haj, Y., Bohn, S., & Souza, M. M. (2019). Tolerance of native and invasive bivalves under herbicide and metal contamination: an *ex vivo* approach. *Environmental science and pollution research international*, 26(30), 31198–31206. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06256-x>

75. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. J., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88-90. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)

76. Emeny, R. T., Marusov, G., Lawrence, D. A., Pederson-Lane, J., Yin, X., & Lynes, M. A. (2009). Manipulations of metallothionein gene dose accelerate the response to *Listeria monocytogenes*. *Chemico-biological interactions*, 181(2), 243–253. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2009.06.018>

77. Filipovic, M. R., Zivanovic, J., Alvarez, B., & Banerjee, R. (2018). Chemical biology of H₂S signaling through persulfidation. *Chemical reviews*, 118(3), 1253–1337. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00205>

78. Forloni, G., & Balducci, C. (2018). Alzheimer's disease, oligomers, and inflammation. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 62(3), 1261–1276. <https://doi.org/10.3233/JAD-170819>

79. Forrester, S. J., Kikuchi, D. S., Hernandez, M. S., Xu, Q., & Griending, K. K. (2018). Reactive oxygen species in metabolic and inflammatory signaling. *Circulation research*, 122(6), 877–902.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311401>

80. Fried R. (1975). Enzymatic and non-enzymatic assay of superoxide dismutase. *Biochimie*, 57(5), 657–660. [https://doi.org/10.1016/s0300-9084\(75\)80147-7](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(75)80147-7)
81. Fujie, T., Ozaki, Y., Takenaka, F., Nishio, M., Hara, T., Fujiwara, Y., Yamamoto, C., & Kaji, T. (2020). Induction of metallothionein isoforms in cultured bovine aortic endothelial cells exposed to cadmium. *The Journal of toxicological sciences*, 45(12), 801–806. <https://doi.org/10.2131/jts.45.801>
82. Gagnaire, B., Thomas-Guyon, H., & Renault, T. (2004). In vitro effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes. *Fish & shellfish immunology*, 16(4), 501–512. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2003.08.007>
83. Gagné, F., Gagnon, C., Turcotte, P., & Blaise, C. (2007). Changes in metallothionein levels in freshwater mussels exposed to urban wastewaters: effects from exposure to heavy metals? *Biomarker insights*, 2, 107–116. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2717824/>
84. Gaikwad, Y. B., Gaikwad, S. M., & Bhawane, G. P. (2010). Effect of induced oxidative stress and herbal extracts on acid phosphatase activity in lysosomal and microsomal fractions of midgut tissue of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of insect science (Online)*, 10, 113. <https://doi.org/10.1673/031.010.11301>
85. Galloway, T. S., Cole, M., & Lewis, C. (2017). Interactions of microplastic debris throughout the marine ecosystem. *Nature ecology & evolution*, 1(5), 116. <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0116>
86. GAMEO. (2013). *Map-of-Ukraine-political-enwiki*. Retrieved from <https://gameo.org/index.php?title=File:Map-of-Ukraine-political-enwiki.jpg>
87. Gammoh, N. Z., & Rink, L. (2017). Zinc in infection and inflammation. *Nutrients*, 9(6), 624. <https://doi.org/10.3390/nu9060624>
88. Garaud, M., Trapp, J., Devin, S., Cossu-Leguille, C., Pain-Devin, S., Felten, V., & Giamberini, L. (2015). Multibiomarker assessment of cerium dioxide nanoparticle (nCeO₂) sublethal effects on two freshwater invertebrates, *Dreissena*

polymorpha and *Gammarus roeseli*. *Aquatic toxicology* (Amsterdam, Netherlands), 158, 63–74. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.11.004>

89. Garcia-Gonzalez, A., Gaxiola-Robles, R., & Zenteno-Savín, T. (2015). Oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis. *Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion*, 67(1), 46–53.

90. 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>

91. Ghezzi, P. (2005). Oxidoreduction of protein thiols in redox regulation. *Biochemical Society transactions*, 33(Pt 6), 1378–1381. <https://doi.org/10.1042/BST0331378>

92. Gnatyshyna, L., Falfushynska, H., Stoliar, O., & Dallinger, R. (2020a). Preliminary study of multiple stress response reactions in the pond snail *Lymnaea stagnalis* exposed to trace metals and a thiocarbamate fungicide at environmentally relevant concentrations. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 79, 89–100. <https://doi.org/10.1007/s00244-020-00728-9>

93. Gnatyshyna, L., Khoma, V., Mishchuk, O., Martinyuk, V., Sprinçge, G., & Stoliar, O. (2020b). Multi-marker study of the responses of the *Unio tumidus* from the areas of small and micro hydropower plants at the Dniester River Basin, Ukraine. *Environmental science and pollution research international*, 27(10), 11038–11049. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-07698-4>

94. Gokulakrishnan, S., Chandraraj, K., & Gummadi, S. N. (2005). Microbial and enzymatic methods for the removal of caffeine. *Enzyme and microbial technology*, 37(2), 225–232. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.03.004>

95. Gonzalez-Iglesias, H., Alvarez, L., García, M., Petrash, C., Sanz-Medel, A., & Coca-Prados, M. (2014). Metallothioneins (MTs) in the human eye: a perspective article on the zinc-MT redox cycle. *Metallomics : integrated biometal science*, 6(2), 201–208. <https://doi.org/10.1039/c3mt00298e>

96. González-Santoyo, I., & Córdoba-Aguilar, A. (2012). Phenoloxidase: a key component of the insect immune system. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 142(1), 1-16. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2011.01187.x>
97. Griffith, B., Pendyala, S., Hecker, L., Lee, P. J., Natarajan, V., & Thannickal, V. J. (2009). NOX enzymes and pulmonary disease. *Antioxidants & redox signaling*, 11(10), 2505–2516. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2599>
98. 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)
99. Guo, J. Z., Wang, W. H., Li, L. F., Yang, S. M., & Wang, J. (2018). The role of metallothionein in a dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis-like murine model. *Scientific reports*, 8(1), 11129. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29410-w>
100. Haase, S., & Linker, R. A. (2021). Inflammation in multiple sclerosis. *Therapeutic advances in neurological disorders*, 14, 17562864211007687. <https://doi.org/10.1177/17562864211007687>
101. Haddad, J. J. (2011). A redox microenvironment is essential for MAPK-dependent secretion of pro-inflammatory cytokines: modulation by glutathione (GSH/GSSG) biosynthesis and equilibrium in the alveolar epithelium. *Cellular Immunology*, 270, 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2011.04.001>
102. 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
103. Hamer, B., Jaksić, Z., Pavčić-Hamer, D., Perić, L., Medaković, D., Ivanković, D., ... & Batel, R. (2008). Effect of hypoosmotic stress by low salinity acclimation of Mediterranean mussels *Mytilus galloprovincialis* on biological parameters used for pollution assessment. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 89(3), 137–151. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.06.015>
104. Hamm, T., & Lenz, M. (2021). Negative impacts of realistic doses of spherical and irregular microplastics emerged late during a 42 weeks-long exposure

experiment with blue mussels. *The Science of the total environment*, 778, 146088. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146088>

105. Heckman, M. A., Weil, J., & Gonzalez de Mejia, E. (2010). Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in foods: a comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. *Journal of food science*, 75(3), R77–R87. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01561.x>

106. Hoover, D. B. (2017). Cholinergic modulation of the immune system presents new approaches for treating inflammation. *Pharmacology & Therapeutics*, 179, 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.05.002>

107. Horrigan, L. A., Diamond, M., Connor, T. J., & Kelly, J. P. (2003). Caffeine inhibits monocyte and neutrophil chemotaxis at concentrations relevant to normal human consumption. In *Proceedings of the International Cytokine Society Annual Meeting, Dublin, Ireland* (pp. 20-24).

108. Horrigan, L. A., Kelly, J. P., & Connor, T. J. (2005). Caffeine and its major metabolite paraxanthine suppress human lymphocyte function. *The Irish Journal of Medical Science*, 174(2; es4), 26.

109. Hussain, T., Tan, B., Yin, Y., Blachier, F., Tossou, M. C., & Rahu, N. (2016). Oxidative stress and inflammation: what polyphenols can do for us? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 7432797. <https://doi.org/10.1155/2016/7432797>

110. Ibrahim, S., Muhammad, A., Tanko, A. S., Abubakar, A., Ibrahim, H., Shukor, M. Y., & Ahmad, S. A. (2015). Studies of action of heavy metals on caffeine degradation by immobilised *Leifsonia* sp. strain SIU. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, 8(2), 138-144. <https://doi.org/10.4314/bajopas.v8i2.24>

111. Inoue, K., Takano, H., Shimada, A., & Satoh, M. (2009). Metallothionein as an anti-inflammatory mediator. *Mediators of inflammation*, 2009, 101659. <https://doi.org/10.1155/2009/101659>

112. Intergovernmental Panel for Global Climate Change (IPCC), 2013. Retrieved from <http://www.ipcc.ch/>

113. 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>
114. Itoh, Y. (2017). Metalloproteinases in rheumatoid arthritis: potential therapeutic targets to improve current therapies. *Progress in molecular biology and translational science*, *148*, 327–338. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.03.002>
115. Jackson, S. H., Devadas, S., Kwon, J., Pinto, L. A., & Williams, M. S. (2004). T cells express a phagocyte-type NADPH oxidase that is activated after T cell receptor stimulation. *Nature immunology*, *5*(8), 818–827. <https://doi.org/10.1038/ni1096>
116. Jafari, M., & Rabbani, A. (2000). Dose and time dependent effects of caffeine on superoxide release, cell survival and DNA fragmentation of alveolar macrophages from rat lung. *Toxicology*, *149*(2-3), 101–108. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(00\)00224-9](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(00)00224-9)
117. Jenny, M. J., Ringwood, A. H., Schey, K., Warr, G. W., & Chapman, R. W. (2004). Diversity of metallothioneins in the American oyster, *Crassostrea virginica*, revealed by transcriptomic and proteomic approaches. *European journal of biochemistry*, *271*(9), 1702–1712. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04071.x>
118. Jensen, K. S., Hansen, R. E., & Winther, J. R. (2009). Kinetic and thermodynamic aspects of cellular thiol-disulfide redox regulation. *Antioxidants & redox signaling*, *11*(5), 1047–1058. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2297>
119. Jonsson, C. M., Paraiba, L. C., & Aoyama, H. (2009). Metals and linear alkylbenzene sulphonate as inhibitors of the algae *Pseudokirchneriella subcapitata* acid phosphatase activity. *Ecotoxicology (London, England)*, *18*(5), 610–619. <https://doi.org/10.1007/s10646-009-0319-0>
120. Juárez-Rebollar, D., Rios, C., Nava-Ruíz, C., & Méndez-Armenta, M. (2017). Metallothionein in Brain Disorders. *Oxidative medicine and cellular longevity*, *2017*, 5828056. <https://doi.org/10.1155/2017/5828056>
121. Kabe, Y., Ando, K., Hirao, S., Yoshida, M., & Handa, H. (2005). Redox regulation of NF-kappaB activation: distinct redox regulation between the cytoplasm

and the nucleus. *Antioxidants & redox signaling*, 7(3-4), 395–403.
<https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.395>

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

123. Kang, Y. C., Son, M., Kang, S., Im, S., Piao, Y., Lim, K. S., ... & Pak, Y. K. (2018). Cell-penetrating artificial mitochondria-targeting peptide-conjugated metallothionein 1A alleviates mitochondrial damage in Parkinson's disease models. *Experimental & molecular medicine*, 50(8), 1–13.
<https://doi.org/10.1038/s12276-018-0124-z>

124. 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(10), H805.
<https://doi.org/10.1149/2.031210jes>

125. Kaushal, V., Herzog, C., Haun, R. S., & Kaushal, G. P. (2014). Caspase protocols in mice. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1133, 141–154.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0357-3_9

126. Kazi Tani, L. S., Gourlan, A. T., Dennouni-Medjati, N., Telouk, P., Dali-Sahi, M., Harek, Y., ... & 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>

127. Khoma, V. V., Gnatyshyna, L. L., Martinyuk, V. V., Mackiv, T. R., Mishchuk, N. Y., & Stoliar, O. B. (2020). Metallothioneins contribution to the response of bivalve mollusk to xenobiotics. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 92(5), 87-96. <http://ukrbiochemjournal.org/2020/11/metallothioneins-contribution-to-the-response-of-bivalve-mollusk-to-xenobiotics.html>

128. 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>

129. 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>

130. Kim, C. H., Kim, J. H., Lee, J., & Ahn, Y. S. (2003). Zinc-induced NF- κ B inhibition can be modulated by changes in the intracellular metallothionein level. *Toxicology and applied pharmacology*, 190(2), 189–196. [https://doi.org/10.1016/S0041-008X\(03\)00167-4](https://doi.org/10.1016/S0041-008X(03)00167-4)

131. Kovács, E. G., Alatshan, A., Budai, M. M., Czimmerer, Z., Bíró, E., & Benkő, S. (2021). Caffeine has different immunomodulatory effect on the cytokine expression and NLRP3 inflammasome function in various human macrophage subpopulations. *Nutrients*, 13(7), 2409. <https://doi.org/10.3390/nu13072409>

132. Krężel, A., & Maret, W. (2016). The biological inorganic chemistry of zinc ions. *Archives of biochemistry and biophysics*, 611, 3–19. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.04.010>

133. Krężel, A., & Maret, W. (2017). The functions of metamorphic metallothioneins in zinc and copper metabolism. *International journal of molecular sciences*, 18(6), 1237. <https://doi.org/10.3390/ijms18061237>

134. 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>

135. Krezel, A., Hao, Q., & Maret, W. (2007). The zinc/thiolate redox biochemistry of metallothionein and the control of zinc ion fluctuations in cell signaling. *Archives of biochemistry and biophysics*, 463(2), 188–200. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.02.017>

136. Kükürt, A., Gelen, V., Başer, Ö. F., Deveci, H. A., & Karapehlivan, M. (2021). Thiols: Role in oxidative stress-related disorders. *Accenting Lipid Peroxidation*. London: IntechOpen, 27-47. <https://www.intechopen.com/chapters/75841>
137. Kundi, H., Ates, I., Kiziltunc, E., Cetin, M., Cicekcioglu, H., Neselioglu, S., Erel, O., & Ornek, E. (2015). A novel oxidative stress marker in acute myocardial infarction; thiol/disulphide homeostasis. *The American journal of emergency medicine*, 33(11), 1567–1571. <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2015.06.016>
138. Lacoue-Labarthe, T., Le Bihan, E., Borg, D., Koueta, N., & Bustamante, P. (2010). Acid phosphatase and cathepsin activity in cuttlefish (*Sepia officinalis*) eggs: the effects of Ag, Cd, and Cu exposure. *ICES Journal of Marine Science*, 67(7), 1517-1523. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsq>
139. 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, 528–532. <https://doi.org/10.1002/ieam.1915>
140. Le Bris, C., Paillard, C., Stiger-Pouvreau, V., & Guérard, F. (2013). Laccase-like activity in the hemolymph of *Venerupis philippinarum*: characterization and kinetic properties. *Fish & shellfish immunology*, 35(6), 1804–1812. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.09.009>
141. Lee, C. (2000). Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition of LDL peroxidation. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 295(1-2), 141–154. [https://doi.org/10.1016/s0009-8981\(00\)00201-1](https://doi.org/10.1016/s0009-8981(00)00201-1)
142. Lee, S., Kim, S. M., & Lee, R. T. (2013). Thioredoxin and thioredoxin target proteins: from molecular mechanisms to functional significance. *Antioxidants & redox signaling*, 18(10), 1165–1207. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4322>
143. Lei, L., Liu, M., Song, Y., Lu, S., Hu, J., Cao, C., ... & He, D. (2018). Polystyrene (nano) microplastics cause size-dependent neurotoxicity, oxidative

damage and other adverse effects in *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Science: Nano*, 5(8), 2009-2020. <https://doi.org/10.1039/c8en00412a>

144. Lesser, M. P. (2011). Oxidative stress in tropical marine ecosystems. *Oxidative stress in aquatic ecosystems*, 7-19. <https://doi.org/10.1002/9781444345988.ch1>

145. Li, J., Lusher, A. L., Rotchell, J. M., Deudero, S., Turra, A., Bråte, I. L. N., ... & Shi, H. (2019). Using mussel as a global bioindicator of coastal microplastic pollution. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 244, 522–533. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.032>

146. Li, S., Wen, J., He, B., Wang, J., Hu, X., & Liu, J. (2020). Occurrence of caffeine in the freshwater environment: Implications for ecopharmacovigilance. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 263(Pt B), 114371. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114371>

147. Limonta, G., Mancina, A., Benkhalqui, A., Bertolucci, C., Abelli, L., Fossi, M. C., & Panti, C. (2019). Microplastics induce transcriptional changes, immune response and behavioral alterations in adult zebrafish. *Scientific reports*, 9(1), 15775. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52292-5>

148. Lin, S., & Steichen Jr, D. J. (1994). A method for determining the stability of lysosomal membranes in the digestive cells of *Mytilus edulis*. *Marine Ecology Progress Series*, 237-241. Retrieved from <https://www.jstor.org/stable/24849749>

149. Liu, L., Luo, P., Yang, M., Wang, J., Hou, W., & Xu, P. (2022). The role of oxidative stress in the development of knee osteoarthritis: A comprehensive research review. *Frontiers in molecular biosciences*, 9, 1001212. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.1001212>

150. Loncarski, M., Tubić, A., Isakovski, M. K., Jović, B., Apostolović, T., Nikić, J., & Agbaba, J. (2020). Modelling of the adsorption of chlorinated phenols on polyethylene and polyethylene terephthalate microplastic. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 85(5), 697-709. <https://doi.org/10.2298/JSC190712124L>

151. Lorenzen, I., Eble, J. A., & Hanschmann, E. M. (2020). Thiol switches in membrane proteins - Extracellular redox regulation in cell biology. *Biological chemistry*, 402(3), 253–269. <https://doi.org/10.1515/hsz-2020-0266>
152. Lowry, O. H., Rosebrough, H. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265–275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
153. Lu, L., Mok, B. W. Y., Chen, L. L., Chan, J. M. C., Tsang, O. T. Y., Lam, B. H. S., ... & To, K. K. W. (2022). Neutralization of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 omicron variant by sera from BNT162b2 or CoronaVac vaccine recipients. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 75(1), e822–e826. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab1041>
154. Lu, S. C. (2013). Glutathione synthesis. *Biochimica et biophysica acta*, 1830(5), 3143–3153. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.008>
155. Lu, Y., Zhang, Y., Deng, Y., Jiang, W., Zhao, Y., Geng, J., Ding, L., & Ren, H. (2016). Uptake and accumulation of polystyrene microplastics in zebrafish (*Danio rerio*) and toxic effects in liver. *Environmental science & technology*, 50(7), 4054–4060. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00183>
156. Luna-Acosta, A., Breitwieser, M., Renault, T., & Thomas-Guyon, H. (2017). Recent findings on phenoloxidases in bivalves. *Marine pollution bulletin*, 122(1-2), 5–16. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.06.031>
157. Luna-Acosta, A., Kanan, R., Le Floch, S., Huet, V., Pineau, P., Bustamante, P., & Thomas-Guyon, H. (2011a). Enhanced immunological and detoxification responses in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, exposed to chemically dispersed oil. *Water research*, 45(14), 4103–4118. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.05.011>
158. Luna-Acosta, A., Rosenfeld, E., Amari, M., Fruitier-Arnaudin, I., Bustamante, P., & Thomas-Guyon, H. (2010). First evidence of laccase activity in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish & shellfish immunology*, 28(4), 719–726. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.01.008>

159. Luna-Acosta, A., Saulnier, D., Pommier, M., Haffner, P., De Decker, S., Renault, T., & Thomas-Guyon, H. (2011b). First evidence of a potential antibacterial activity involving a laccase-type enzyme of the phenoloxidase system in Pacific oyster *Crassostrea gigas* haemocytes. *Fish & shellfish immunology*, *31*(6), 795–800. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.07.016>
160. Luo, X., Lauwers, M., Layer, P.G., & Wen, C. (2021). Non-neuronal role of acetylcholinesterase in bone development and degeneration. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*, 620543. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.620543>
161. Lv, H., Zhen, C., Liu, J., Yang, P., Hu, L., & Shang, P. (2019). Unraveling the potential role of glutathione in multiple forms of cell death in cancer therapy. *Oxidative medicine and cellular longevity*, *2019*, 3150145. <https://doi.org/10.1155/2019/3150145>
162. Lynes, M. A., Zaffuto, K., Unfricht, D. W., Marusov, G., Samson, J. S., & Yin, X. (2006). The physiological roles of extracellular metallothionein. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, *231*(9), 1548–1554. <https://doi.org/10.1177/153537020623100915>
163. Ma, Y., Du, J., Yin, Z., Dai, H., Wei, Y., Xia, Y., Li, L., Ye, Z., & Huang, Z. (2022). Metallothionein-1 is positively correlated with inflammation and ankylosing spondylitis activity. *Journal of inflammation research*, *15*, 5935–5944. <https://doi.org/10.2147/JIR.S382827>
164. Magkos, F., & Kavouras, S. A. (2005). Caffeine use in sports, pharmacokinetics in man, and cellular mechanisms of action. *Critical reviews in food science and nutrition*, *45*(7-8), 535–562. <https://doi.org/10.1080/1040-830491379245>
165. Magni, S., Gagné, F., André, C., Della Torre, C., Auclair, J., Hanana, H., ...& Binelli, A. (2018). Evaluation of uptake and chronic toxicity of virgin polystyrene microbeads in freshwater zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Mollusca: Bivalvia). *The Science of the total environment*, *631-632*, 778–788. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.075>

166. Maher, P., Lewerenz, J., Lozano, C., & Torres, J. L. (2008). A novel approach to enhancing cellular glutathione levels. *Journal of neurochemistry*, *107*(3), 690–700. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05620.x>
167. Marczenko, Z., & Balcerzak, M. (2000). Copper. In E. Kloczko (Ed.), *Separation, Preconcentration and Spectrophotometry in Inorganic Analysis*, 1st ed. (pp. 182–183). Elsevier: Amsterdam, The Netherlands.
168. Maret, W. (2000). The function of zinc metallothionein: a link between cellular zinc and redox state. *The Journal of nutrition*, *130*(5S Suppl), 1455S–8S. <https://doi.org/10.1093/jn/130.5.1455S>
169. Maret, W. (2019). The redox biology of redox-inert zinc ions. *Free radical biology & medicine*, *134*, 311–326. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.006>
170. Maret, W., & Vallee, B. L. (1998). Thiolate ligands in metallothionein confer redox activity on zinc clusters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(7), 3478–3482. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.7.3478>
171. Martinho, S. D., Fernandes, V. C., Figueiredo, S. A., & Delerue-Matos, C. (2022). Microplastic pollution focused on sources, distribution, contaminant interactions, analytical methods, and wastewater removal strategies: A review. *International journal of environmental research and public health*, *19*(9), 5610. <https://doi.org/10.3390/ijerph19095610>
172. Martyniuk, V., Gylytė, B., Matskiv, T., Khoma, V., Tulaidan, H., Gnatyshyna, L., ... & Stoliar, O. (2022a). Stress responses of bivalve mollusc *Unio tumidus* from two areas to ibuprofen, microplastic and their mixture. *Ecotoxicology (London, England)*, *31*(9), 1369–1381. <https://doi.org/10.1007/s10646-022-02594-8>
173. Martyniuk, V., Khoma, V., Matskiv, T., Baranovsky, V., Orlova-Hudim, K., Gylytė, B., ... & Stoliar, O. (2022b). 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 : CBP, 261, 109425.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109425>

174. 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>

175. Maruya, K. A., Dodder, N. G., Weisberg, S. B., Gregorio, D., Bishop, J. S., Klosterhaus, S., ... & Lauenstein, G. G. (2014). The mussel watch california pilot study on contaminants of emerging concern (CECs): synthesis and next steps. *Marine pollution bulletin*, 81(2), 355–363. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.04.023>

176. McMahon, R. F. (2002). Evolutionary and physiological adaptations of aquatic invasive animals: r selection versus resistance. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 59(7), 1235-1244. <https://doi.org/10.1139/f02-105>

177. Melvin, S., Datta, S., Khandge, R. S., Selvarajan, E. (2021). A state of the art review on characterization of heavy metal binding metallothioneins proteins and their widespread applications. *Science of The Total Environment*, 775, 145829.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145829>

178. Min, K. S., Morishita, F., Tetsuchikawahara, N., & Onosaka, S. (2005). Induction of hepatic and renal metallothionein synthesis by ferric nitrilotriacetate in mice: the role of MT as an antioxidant. *Toxicology and applied pharmacology*, 204(1), 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.08.014>

179. Minchin, D., Lucy, F., & Sullivan, M. (2002). Zebra mussel: impacts and spread. In *Invasive aquatic species of Europe. Distribution, impacts and management* (pp. 135-146). Dordrecht: Springer Netherlands.
https://doi.org/10.1007/978-94-015-9956-6_15

180. Mocchegiani, E., Costarelli, L., Giacconi, R., Cipriano, C., Muti, E., & Malavolta, M. (2006). Zinc-binding proteins (metallothionein and alpha-2 macroglobulin) and immunosenescence. *Experimental gerontology*, 41(11), 1094–1107. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2006.08.010>

181. Moore, M. T., Greenway, S. L., Farris, J. L., & Guerra, B. (2008). Assessing caffeine as an emerging environmental concern using conventional approaches. *Archives of environmental contamination and toxicology*, *54*(1), 31–35. <https://doi.org/10.1007/s00244-007-9059-4>
182. Moran, L. K., Gutteridge, J. M., & Quinlan, G. J. (2001). Thiols in cellular redox signalling and control. *Current medicinal chemistry*, *8*(7), 763–772. <https://doi.org/10.2174/0929867013372904>
183. Nam, Y. K., & Kim, E. J. (2017) Diversification and domain evolution of molluskan metallothioneins: a mini review. *Fisheries and Aquatic Sciences*, *20*, 8. <https://doi.org/10.1186/s41240-017-0054-z>
184. National Research Council (US) Committee for the update of the guide for the care and use of laboratory animals. (2011). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. (8th ed.). National Academies Press (US). Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54050/>
185. Nguyen, N. H., Tran, G. B., & Nguyen, C. T. (2020). Anti-oxidative effects of superoxide dismutase 3 on inflammatory diseases. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, *98*(1), 59–69. <https://doi.org/10.1007/s00109-019-01845-2>
186. Nikolic, J., Bjelakovic, G., & Stojanovic, I. (2003). Effect of caffeine on metabolism of L-arginine in the brain. *Molecular and cellular biochemistry*, *244*(1-2), 125–128.
187. Noguchi, N., Saito, Y., & Niki, E. (2023). Actions of thiols, persulfides, and polysulfides as free radical scavenging antioxidants. *Antioxidants & redox signaling*, Advance online publication. <https://doi.org/10.1089/ars.2022.0191>
188. Ohkawa, H., Onishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxidation in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, *95*, 351–358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
189. Ojemaye, C. Y., & Petrik, L. (2019). Occurrences, levels and risk assessment studies of emerging pollutants (pharmaceuticals, perfluoroalkyl and endocrine disrupting compounds) in fish samples from Kalk Bay harbour, South

- Africa. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 252(Pt A), 562–572. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.05.091>
190. Olcina, G. J., Muñoz, D., Timón, R., Caballero, M. J., Maynar, J. I., Córdova, A., & Maynar, M. (2006). Effect of caffeine on oxidative stress during maximum incremental exercise. *Journal of sports science & medicine*, 5(4), 621–628.
191. Olcina, G. J., Timón, R., Muñoz, D., Maynar, J. I., Caballero, M. J., & Maynar, M. (2008). Caffeine ingestion effects on oxidative stress in a steady-state test at 75% VO₂max. *Science & Sports*, 23(2), 87-90. <https://doi.org/10.1016/j.scispo.2007.10.005>
192. 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)
193. Ozcan, A., & Ogun, M. (2015). Biochemistry of reactive oxygen and nitrogen species. *Basic principles and clinical significance of oxidative stress*, 3, 3 <https://doi.org/7-58.10.5772/61193>.
194. Pajares, M., I Rojo, A., Manda, G., Boscá, L., & Cuadrado, A. (2020). Inflammation in parkinson's disease: mechanisms and therapeutic implications. *Cells*, 9(7), 1687. <https://doi.org/10.3390/cells9071687>
195. Palos-Ladeiro, M., & Geffard, A. (2018). Biological responses of aquatic organisms and assessment water contamination and ecotoxicity. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 11179–11180. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1523-3>
196. Pascual, C., Zenteno, E., Cuzon, G., Sánchez, A., Gaxiola, G., Taboada, G., ... & Rosas, C. (2004). *Litopenaeus vannamei* juveniles energetic balance and immunological response to dietary protein. *Aquaculture*, 236(1-4), 431-450. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.01.015>
197. Penkowa, M., Espejo, C., Ortega-Aznar, A., Hidalgo, J., Montalban, X., & Martínez Cáceres, E. M. (2003). Metallothionein expression in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 60(6), 1258–1266. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3021-z>

198. Penkowa, M., Florit, S., Giralt, M., Quintana, A., Molinero, A., Carrasco, J., & Hidalgo, J. (2005). Metallothionein reduces central nervous system inflammation, neurodegeneration, and cell death following kainic acid-induced epileptic seizures. *Journal of neuroscience research*, 79(4), 522–534. <https://doi.org/10.1002/jnr.20387>
199. 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>
200. Pigman, W., Hawkins, W. L., Blair, M. G., & Holley, H. L. (1958). Sialic acid in normal and arthritic human synovial fluids. *Arthritis and rheumatism*, 1(2), 151–166. <https://doi.org/10.1002/art.1780010208>
201. Pires, A., Almeida, Â., Calisto, V., Schneider, R. J., Esteves, V. I., Wrona, ... & Freitas, R. (2016). *Hediste diversicolor* as bioindicator of pharmaceutical pollution: Results from single and combined exposure to carbamazepine and caffeine. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*, 188, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.06.003>
202. Prasad, A. S. (2009). Zinc: role in immunity, oxidative stress and chronic inflammation. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 12, 646–652. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e3283312956>
203. Prasad, A. S., & Bao, B. (2019). Molecular mechanisms of zinc as a pro-antioxidant mediator: clinical therapeutic implications. *Antioxidants*, 8(6), 164. <https://doi.org/10.3390/antiox8060164>
204. Prasad, A. S., Bao, B., Beck, F. W., Kucuk, O., & Sarkar, F. H. (2004). Antioxidant effect of zinc in humans. *Free radical biology & medicine*, 37(8), 1182–1190. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.07.007>
205. Quinn, E. A., Malkin, S. H., Rowley, A. F., & Coates, C. J. (2020). Laccase and catecholoxidase activities contribute to innate immunity in slipper limpets, *Crepidula fornicata*. *Developmental and comparative immunology*, 110, 103724. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103724>

206. Rahayu, S. Y. S., & Prihatini, W. (2020). Characterization of metallothionein protein from hepatopancreas organ of *Pilsbryconcha exilis* collected from Cikaniki River, Western Java, Indonesia. *Nusantara Bioscience*, 12(1). <https://doi.org/10.13057/nusbiosci/n120101>
207. Rajalakshmi, S., & Mohandas, A. (2005). Copper-induced changes in tissue enzyme activity in a freshwater mussel. *Ecotoxicology and environmental safety*, 62(1), 140–143. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.01.003>
208. Ramanaviciene, A., Acaite, J., & Ramanavicius, A. (2004). Chronic caffeine intake affects lysozyme activity and immune cells in mice. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 56(5), 671–676. <https://doi.org/10.1211/0022357023268>
209. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
210. Regan, E. A., Bowler, R. P., & Crapo, J. D. (2008). Joint fluid antioxidants are decreased in osteoarthritic joints compared to joints with macroscopically intact cartilage and subacute injury. *Osteoarthritis and cartilage*, 16(4), 515–521. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2007.09.001>
211. Regoli, F., & Giuliani, M. E. (2014). Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Marine environmental research*, 93, 106–117. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.07.006>
212. Repetto, G., del Peso, A., Zurita, J. L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*, 3, 1125–1131 <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.75>
213. Revel, M., Yakovenko, N., Caley, T., Guillet, C., Châtel, A., & Mouneyrac, C. (2020). Accumulation and immunotoxicity of microplastics in the estuarine worm *Hediste diversicolor* in environmentally relevant conditions of exposure. *Environmental science and pollution research international*, 27(4), 3574–3583. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3497-6>

214. 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)
215. Rink, L., & Gabriel, P. (2000). Zinc and the immune system. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 59(4), 541–552. <https://doi.org/10.1017/s0029665100000781>
216. Ritter, M., Hohenberger, K., Alter, P., Herzum, M., Tebbe, J., & Maisch, M. (2005). Caffeine inhibits cytokine expression in lymphocytes. *Cytokine*, 30(4), 177–181. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2004.12.013>
217. Rodrigues, S. D., Batista, G. B., Ingberman, M., Pecoits-Filho, R., & Nakao, L. S. (2012). Plasma cysteine/cystine reduction potential correlates with plasma creatinine levels in chronic kidney disease. *Blood purification*, 34(3-4), 231–237. <https://doi.org/10.1159/000342627>
218. 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)
219. Roncarolo, M. G., Gregori, S., Battaglia, M., Bacchetta, R., Fleischhauer, K., & Levings, M. K. (2006). Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunological reviews*, 212, 28–50. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2006.00420.x>
220. Rudyk, O., & Eaton, P. (2014). Biochemical methods for monitoring protein thiol redox states in biological systems. *Redox biology*, 2, 803–813. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.06.005>
221. Ruttkay-Nedecky, B., Nejdil, L., Gumulec, J., Zitka, O., Masarik, M., Eckschlager, T., ... & Kizek, R. (2013). The role of metallothionein in oxidative stress. *International journal of molecular sciences*, 14(3), 6044–6066. <https://doi.org/10.3390/ijms14036044>
222. Saad, A. A., El-Sikaily, A., & Kassem, H. (2016). Metallothionein and glutathione content as biomarkers of metal pollution in mussels and local fishermen

- in Abu Qir Bay, Egypt. *The Journal of Health and Pollution*, 6(12), 50–60. <https://doi.org/10.5696/2156-9614-6-12.50>
223. Sadler, D. E., Brunner, F. S., & Plaistow, S. J. (2019). Temperature and clone-dependent effects of microplastics on immunity and life history in *Daphnia magna*. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 255(Pt 1), 113178. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113178>
224. Santangelo, F. (2003). Intracellular thiol concentration modulating inflammatory response: influence on the regulation of cell functions through cysteine prodrug approach. *Current Medicinal Chemistry*, 10 (23), 2599-2610. <https://doi.org/10.2174/0929867033456567>
225. Sato, M., & Kondoh, M. (2002). Recent studies on metallothionein: protection against toxicity of heavy metals and oxygen free radicals. *The Tohoku journal of experimental medicine*, 196(1), 9–22. <https://doi.org/10.1620/tjem.196.9>
226. Scheller, J. S., Irvine, G. W., & Stillman, M. J. (2018). Unravelling the mechanistic details of metal binding to mammalian metallothioneins from stoichiometric, kinetic, and binding affinity data. *Dalton transactions (Cambridge, England: 2003)*, 47(11), 3613–3637. <https://doi.org/10.1039/c7dt03319b>
227. Scherer, C., Weber, A., Stock, F., Vurusic, S., Egerci, H., Kochleus, C., ... & Reifferscheid, G. (2020). Comparative assessment of microplastics in water and sediment of a large European river. *The Science of the total environment*, 738, 139866. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139866>
228. Scholz, S., Nichols, J. W., Escher, B. I., Ankley, G. T., Altenburger, R., Blackwell, B., ... & 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>
229. Scott, J. L., Gabrielides, C., Davidson, R. K., Swingler, T. E., Clark, I. M., Wallis, G. A., Boot-Handford, R. P., Kirkwood, T. B., Taylor, R. W., & Young, D. A. (2010). Superoxide dismutase downregulation in osteoarthritis progression and end-stage disease. *Annals of the rheumatic diseases*, 69(8), 1502–1510. <https://doi.org/10.1136/ard.2009.119966>

230. Seatemperature. (2013). *Dniester River*. Retrieved from <https://seatemperature.net/seas/river-dniester>
231. Seatemperature.net. (2013). *Cherson*. Retrieved from <https://ukr.seatemperature.net/zaraz/ukraine/dnipro-river-near-kherson-sea-temperature>
232. Sewwandi, M., Wijesekara, H., Rajapaksha, A. U., Soysa, H. S. M., & Vithanage, M. (2022). Adsorption of caffeine to microplastics in organic matter-rich aqueous media. *International Symposium on Sustainable Urban Environments (ISSUE)*. University of Petroleum and Energy Studies. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/365231691_Adsorption_of_caffeine_to_microplastics_in_organic_matter-rich_aqueous_media
233. Shahidi, F., & Dissanayaka, C. S. (2023). Phenolic-protein interactions: insight from in-silico analyses—a review. *Food Production, Processing and Nutrition*, 5(1), 1-21. <https://doi.org/10.1186/s43014-022-00121-0>
234. Shi, D., & Wang, W. X. (2004). Understanding the differences in Cd and Zn bioaccumulation and subcellular storage among different populations of marine clams. *Environmental Science & Technology*, 38, 449–456. <https://doi.org/10.1021/es034801o>
235. Shi, L., Chan, S., Li, C., & Zhang, S. (2017). Identification and characterization of a laccase from *Litopenaeus vannamei* involved in anti-bacterial host defense. *Fish & shellfish immunology*, 66, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.04.026>
236. Shin, H. Y., Lee, C. S., Chae, H. J., Kim, H. R., Baek, S. H., An, N. H., & Kim, M. H. (2000). Inhibitory effect of anaphylactic shock by caffeine in rats. *International journal of immunopharmacology*, 22(6), 411–418. [https://doi.org/10.1016/s0192-0561\(00\)00006-0](https://doi.org/10.1016/s0192-0561(00)00006-0)
237. Sies, H., & Jones, D. P. (2020). Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 21(7), 363–383. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>

238. Silva, G. B., Reis, B. Z., & Cozzolino, S. M. F. (2016). Micronutrients deficiencies in rheumatoid arthritis patients. *International Journal of Pathology and Clinical Research*, 2(1), 029. <https://doi.org/10.23937/2469-5807/1510029>
239. Stoliar, O. B., Mykhayliv, R. L., & Mishchuk, Ye., V. (2004). Influence of the environmental conditions on binding of heavy metals and oxidative decomposition of biomolecules in tissues of *Anodonta cygnea* (Bivalvia). *Hydrobiological Journal*, 40(2). <https://doi.org/10.1615/HydrobJ.v40.i2.70>
240. Sun, J., Li, L., Li, L., Ding, L., Liu, X., Chen, X., Zhang, J., Qi, X., Du, J., & Huang, Z. (2018). Metallothionein-1 suppresses rheumatoid arthritis pathogenesis by shifting the Th17/Treg balance. *European journal of immunology*, 48(9), 1550–1562. <https://doi.org/10.1002/eji.201747151>
241. Sun, R., Li, X., Zhu, Z., Li, T., Li, W., Huang, P., & Gong, W. (2021). Effects of combined cognitive and exercise interventions on poststroke cognitive function: a systematic review and meta-analysis. *BioMed research international*, 2021, 4558279. <https://doi.org/10.1155/2021/4558279>
242. Sur, B., Kang, S., Kim, M., & Oh, S. (2019). Inhibition of carrageenan/kaolin-induced arthritis in rats and of inflammatory cytokine expressions in human IL-1 β -stimulated fibroblast-like synoviocytes by a benzylideneacetophenone derivative. *Inflammation*, 42(3), 928–936. <https://doi.org/10.1007/s10753-018-0947-8>
243. Takahashi, T., Itano, Y., Noji, S., Matsumoto, K., Taga, N., Mizukawa, S., Toda, N., Matsumi, M., Morita, K., & Hirakawa, M. (2001). Induction of renal metallothionein in rats with ischemic renal failure. *Research communications in molecular pathology and pharmacology*, 110(3-4), 147–160.
244. Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140(6), 805–820. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>
245. Tamura, Y., & Fuangtharnthip, P. (2021). Regulation of metallothionein gene expression in dental pulp cells. *International Dental Journal*, 71, S49. <https://doi.org/10.1016/j.identj.2021.08.046>.

246. Tayyib, N. A., Ramaiah, P., Alsolami, F. J., & Alshmemri, M. S. (2020). Immunomodulatory effects of zinc as a supportive strategies for COVID-19. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 32(13), 14–22. <https://doi.org/10.9734/jpri/2020/v32i1330577>.

247. Tellone, E., Galtieri, A., Giardina, B., Russo, A., Bellocco, E., Barreca, D., & Ficarra, S. (2015). Antioxidant activity of caffeine: A focus on human red blood cells and correlations with several neurodegenerative disorders. In *Coffee in Health and Disease Prevention* (pp. 835-842). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409517-5.00092-9>

248. Temple, J. L., Bernard, C., Lipshultz, S. E., Czachor, J. D., Westphal, J. A., & Mestre, M. A. (2017). The safety of ingested caffeine: A comprehensive review. *Frontiers in psychiatry*, 8, 80. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2017.00080>

249. Teuten, E. L., Saquing, J. M., Knappe, D. R., Barlaz, M. A., Jonsson, S., Björn, A., ...& Takada, H. (2009). Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 364(1526), 2027–2045. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0284>

250. Tío, L., Villarreal, L., Atrian, S., & Capdevila, M. (2004). Functional differentiation in the mammalian metallothionein gene family: metal binding features of mouse MT4 and comparison with its paralog MT1. *The Journal of biological chemistry*, 279(23), 24403–24413. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401346200>

251. Triebkorn, R., Braunbeck, T., Grummt, T., Hanslik, L., Huppertsberg, S., Jekel, M., & Köhler, H. R. (2019). Relevance of nano-and microplastics for freshwater ecosystems: a critical review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 110, 375-392. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.11.023>

252. Tse, H. M., Milton, M. J., Schreiner, S., Profozich, J. L., Trucco, M., & Piganelli, J. D. (2007). Disruption of innate-mediated proinflammatory cytokine and reactive oxygen species third signal leads to antigen-specific hyporesponsiveness.

Journal of Immunology Baltimore, 178 (2), 908–917.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.2.908>

253. Ugajin, T., Nishida, K., Yamasaki, S., Suzuki, J., Mita, M., Kubo, M., Yokozeki, H., & Hirano, T. (2015). Zinc-binding metallothioneins are key modulators of IL-4 production by basophils. *Molecular immunology*, 66(2), 180–188.

<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.03.002>

254. Ulrich, K., & Jakob, U. (2019). The role of thiols in antioxidant systems. *Free radical biology & medicine*, 140, 14–27.

<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.035>

255. Valenti, C., Giuliani, S., Cialdai, C., Tramontana, M., & Maggi, C. A. (2010). Anti-inflammatory synergy of MEN16132, a kinin B(2) receptor antagonist, and dexamethasone in carrageenan-induced knee joint arthritis in rats. *British journal of pharmacology*, 161(7), 1616–1627.

<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00995.x>

256. Van Cauwenberghe, L., Devriese, L., Galgani, F., Robbens, J., & Janssen, C. R. (2015). Microplastics in sediments: A review of techniques, occurrence and effects. *Marine environmental research*, 111, 5–17.

<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.06.007>

257. Viarengo, A., Burlando, B., Ceratto, N., & Panfoli, I. (2000). Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 46(2), 407–417.

258. Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F., & Fabbri, R. (1997). A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Marine environmental research*, 44(1), 69-84. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(96\)00103-1](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(96)00103-1)

259. Vieira, L. R., Soares, A. M. V. M., & Freitas, R. (2022). Caffeine as a contaminant of concern: A review on concentrations and impacts in marine coastal systems. *Chemosphere*, 286 (Pt 2), 131675.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131675>

260. Vignesh, S. K., & Deepe, G. S., Jr (2017). Metallothioneins: emerging modulators in immunity and infection. *International journal of molecular sciences*, 18(10), 2197. <https://doi.org/10.3390/ijms18102197>

261. Vignesh, S. K., Landero Figueroa, J. A., Porollo, A., Caruso, J. A., & Deepe, G. S., Jr (2013). Granulocyte macrophage-colony stimulating factor induced Zn sequestration enhances macrophage superoxide and limits intracellular pathogen survival. *Immunity*, 39(4), 697–710. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.09.006>

262. Vignesh, S. K., Landero Figueroa, J. A., Porollo, A., Divanovic, S., Caruso, J. A., & Deepe, G. S., Jr (2016). IL-4 induces metallothionein 3- and SLC30A4-dependent increase in intracellular Zn⁽²⁺⁾ that promotes pathogen persistence in macrophages. *Cell reports*, 16(12), 3232–3246. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.08.057>

263. 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>

264. Vystavna, Y., Vergeles, Y., & Stolberg, F. (2011). Study of pharmaceuticals in a model urban river as potential molecular markers of wastewater effluents, their sources and socio-economic correlates (the city of Kharkiv, Ukraine). In *Proceedings of a Polish-Swedish-Ukrainian seminar, Krakow-Poland. Research and application of new technologies in wastewater treatment and municipal solid waste disposal in Ukraine, Sweden and Poland, (October 17-19, 2011).*-E. Plaza, E. Levlin.-2013. Retrieved from:

https://www.researchgate.net/publication/262419537_Study_of_pharmaceuticals_in_a_model_urban_river_as_potential_markers_of_wastewater_effluents_their_source_and_socio-economic_correlates_the_city_Kharkiv_Ukraine [accessed Apr 24 2022].

265. Walkinshaw, C., Lindeque, P. K., Thompson, R., Tolhurst, T., & Cole, M. (2020). Microplastics and seafood: lower trophic organisms at highest risk of contamination. *Ecotoxicology and environmental safety*, 190, 110066. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110066>

266. Wang, G. W., Zhou, Z., Klein, J. B., & Kang, Y. J. (2001). Inhibition of hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in metallothionein-overexpressing cardiomyocytes. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 280(5), H2292–H2299.

<https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.280.5.H2292>

267. 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>

268. Wang, W. N., Wang, A. L., Liu, Y., Xiu, J., Liu, Z. B., & Sun, R. Y. (2006). Effects of temperature on growth, adenosine phosphates, ATPase and cellular defense response of juvenile shrimp *Macrobrachium nipponense*. *Aquaculture*, 256(1-4), 624-630.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.02.009>

269. Wang, X. L., Schnoor, M., & Yin, L. M. (2023). Metallothionein-2: An emerging target in inflammatory diseases and cancers. *Pharmacology & therapeutics*, 244, 108374. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2023.108374>

270. 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>

271. Watts, C. (2022). Lysosomes and lysosome-related organelles in immune responses. *FEBS open bio*, 12(4), 678–693. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13388>

272. 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)

273. Wilkinson, J. L., Boxall, A. B., Kolpin, D. W., Leung, K. M., Lai, R. W., Galbán-Malagón, C., ... & Teta, C. (2022). Pharmaceutical pollution of the world's

rivers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(8), e2113947119.:
<https://doi.org/10.1073/pnas.2113947119>

274. Won, Y., Shin, Y., Chun, C. H., Cho, Y., Ha, C. W., Kim, J. H., & Chun, J. S. (2016). Pleiotropic roles of metallothioneins as regulators of chondrocyte apoptosis and catabolic and anabolic pathways during osteoarthritis pathogenesis. *Annals of the rheumatic diseases*, 75(11), 2045–2052.
<https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2015-208406>

275. Wu, C., Pot, C., Apetoh, L., Thalhamer, T., Zhu, B., Murugaiyan, G., ... & Kuchroo, V. K. (2013). Metallothioneins negatively regulate IL-27-induced type 1 regulatory T-cell differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(19), 7802–7807.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1211776110>

276. Yamashita, U., Sugiura, T., Yoshida, Y., & Kuroda, E. (2003). Effect of endocrine disrupters on thymocytes in vitro. *Journal of UOEH*, 25(2), 161–170.
<https://doi.org/10.7888/juoeh.25.161>

277. Yang, H., Lai, H., Huang, J., Sun, L., Mennigen, J. A., Wang, Q., Liu, Y., Jin, Y., & Tu, W. (2020). Polystyrene microplastics decrease F-53B bioaccumulation but induce inflammatory stress in larval zebrafish. *Chemosphere*, 255, 127040.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127040>

278. Yang, W., Jannatun, N., Zeng, Y., Liu, T., Zhang, G., Chen, C., & Li, Y. (2022). Impacts of microplastics on immunity. *Frontiers in toxicology*, 4, 956885.
<https://doi.org/10.3389/ftox.2022.956885>

279. Youn, J., Hwang, S. H., Ryoo, Z. Y., Lynes, M. A., Paik, D. J., Chung, H. S., & Kim, H. Y. (2002). Metallothionein suppresses collagen-induced arthritis via induction of TGF-beta and down-regulation of proinflammatory mediators. *Clinical and experimental immunology*, 129(2), 232–239.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2002.01922.x>

280. Younes, B. (2019). Immunity in mussels: An overview of molecular components and mechanisms with a focus on the functional defenses. *Fish & Shellfish Immunology*, 89(), 158–169. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.03.057>
281. Yu, D. H., Yi, J. K., Yuh, H. S., Park, S. j, Kim, H. J., Bae, K. B., ...& Ryoo, Z. Y. (2012). Over-expression of extracellular superoxide dismutase in mouse synovial tissue attenuates the inflammatory arthritis. *Experimental & molecular medicine*, 44(9), 529–535. <https://doi.org/10.3858/emm.2012.44.9.060>
282. Yurkiv, B., Wasser, S. P., Nevo, E. D., Sybirna, N. O. (2015). Antioxidant effects of medicinal mushrooms agaricus brasiliensis and *Ganoderma lucidum* (Higher Basidiomycetes): evidence from animal studies. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 17(10), 943-955. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.v17.i10.40>
283. Zhang, H., Tan, K., & Zheng, H. (2021). Characterization of a novel cathepsin D and its immunity response in noble scallop *Chlamys nobilis* with different total carotenoids content. *Aquaculture Research*, 52(12), 6434-6443. <https://doi.org/10.1111/are.15508>
284. Zhang, X., Zheng, M., Wang, L., Lou, Y., Shi, L., & Jiang, S. (2018). Sorption of three synthetic musks by microplastics. *Marine pollution bulletin*, 126, 606–609. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.09.025>
285. Zhang, Z. Y., Clemens, J. C., Schubert, H. L., Stuckey, J. A., Fischer, M. W., Hume, D. M., Saper, M. A., & Dixon, J. E. (1992). Expression, purification, and physicochemical characterization of a recombinant *Yersinia* protein tyrosine phosphatase. *The Journal of biological chemistry*, 267(33), 23759–23766. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)35903-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)35903-9)
286. Zhou, S., Zhao, L., & Zhao, T. (2010). Phenol oxidase activity of *Oncomelania* snails in different ages and seasons. *Chinese Journal of Zoonoses*, 26(9), 856-861.