

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

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

ЮНКО КАТЕРИНА БОГДАНІВНА

УДК: 577:594.1]:502/504: 556

ДИСЕРТАЦІЯ

Порівняльне дослідження системи окисно-відновного
гомеостазу двостулкових молюсків *Unio tumidus* та *Mytilus galloprovincialis*
за впливу на організм психоактивних препаратів та мікропластику
водного середовища

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

Автор цифрового підпису Катерина ЮНКО
Дата: 2026.04.16 14:51:08 +03'00'

Катерина Юнко

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

Тернопіль 2026

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	18
ВСТУП.....	19
РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ДЖЕРЕЛ ЛІТЕРАТУРИ.....	26
1.1. Екотоксикологічний профіль психоактивних речовин у водних екосистемах.....	26
1.2. Роль мікропластику в модуляції токсичності ксенобіотиків та екотоксикологічні ризики їх сумісної дії.....	41
РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	50
2.1 Дослідні групи та умови експерименту.....	50
2.2 Методи визначення показників окисного стресу.....	53
2.2.1 Активність супероксиддисмутази.....	53
2.2.2 Активність каталази.....	54
2.2.3 Кількісна оцінка продуктів перекисного окиснення ліпідів та окисних модифікацій протеїнів.....	54
2.3 Дослідження низькомолекулярних тіолових сполук.....	55
2.3.1 Екстракція металотіонеїнів методом гель-розподільчої хроматографії.....	55
2.3.2 Кількісне визначення тіолових груп у складі металотіонеїнів.....	56
2.3.3 Визначення концентрації металів у складі металотіонеїнів та тканині.....	57
2.3.4 Визначення вмісту глутатіону та його редокс-індексу у тканинах.....	58
2.4 Визначення концентрації нікотинамідних коензимів.....	59
2.5 Маркери цитотоксичності.....	59
2.5.1 Визначення стабільності лізосомальних мембран.....	59
2.5.2 Визначення активності каспази-3.....	60
2.6 Показники системи біотрансформації ксенобіотиків.....	61
2.6.1 Визначення цитохром Р450 залежної активності.....	61
2.6.2 Активність глутатіон-S-трансферази.....	61

2.7	Визначення вмісту протеїну.....	62
2.8	Статистична обробка даних.....	62
РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....		64
3.1	Окисно-відновний гомеостаз і видоспецифічні особливості антиоксидантної відповіді у двостулкових молюсків.....	64
3.1.1	Функціонування системи антиоксидантного захисту <i>U. tumidus</i> в умовах дії психоактивних препаратів і мікропластику.....	64
3.1.2.	Характеристика низькомолекулярних тіолів та відновних коензимів у травній залозі <i>U. tumidus</i> за впливу на організм мікропластику, кофеїну та хлорпромазину.....	68
3.1.3	Функціональний стан антиоксидантної системи <i>M. galloprovincialis</i> за дії мікропластику, кофеїну та їх суміші.....	75
3.1.4	Концентраційнозалежні ефекти хлорпромазину на функціонування системи антиоксидантного захисту у <i>M. galloprovincialis</i>	81
3.2	Прояви метаболічної детоксикації ксенобіотиків.....	87
3.2.1	Оцінка ефективності системи біотрансформації <i>U. tumidus</i>	88
3.2.2	Особливості функціонування системи біотрансформації в <i>M. galloprovincialis</i>	89
3.3	Стан клітинної життєздатності у двостулкових молюсків.....	92
3.3.1	Оцінка цитотоксичних ефектів в <i>U. tumidus</i>	93
3.3.2	Оцінка стану життєздатності клітин у травній залозі <i>M. galloprovincialis</i>	94
РОЗДІЛ IV. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....		98
4.1	Особливості реакцій <i>U. tumidus</i> та <i>M. galloprovincialis</i> на вплив хімічних чинників.....	98
4.1.1	Біохімічні стратегії адаптації <i>U. tumidus</i> за умов окремої та комбінованої дії мікропластику та психоактивних препаратів.....	98
4.1.2	Біохімічні стратегії резистентності <i>M. galloprovincialis</i> та особливості	

редокс-відповіді на ізольований і комбінований вплив мікропластику та кофеїну.....	110
4.1.3 Концентраційнозалежні закономірності метаболічної відповіді <i>M. galloprovincialis</i> на вплив хлорпромазину.....	117
4.1.4 Порівняльна оцінка адаптивної здатності морського та прісноводного видів молюсків.....	124
4.2 Спільні риси у відповідях <i>U. tumidus</i> та <i>M. galloprovincialis</i> на вплив психоактивних препаратів та мікропластику.....	126
ВИСНОВКИ.....	130
ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	132

АНОТАЦІЯ

Юнко К. Б. Порівняльне дослідження системи окисно-відновного гомеостазу двостулкових молюсків *Unio tumidus* та *Mytilus galloprovincialis* за впливу на організм психоактивних препаратів та мікропластику водного середовища. – 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, 2026.

Глобальна ескалація виробництва синтетичних полімерів та неконтрольоване надходження лікарських засобів у довкілля призвели до формування безпрецедентного токсикологічного тиску на водні екосистеми. Серед новітніх забруднювачів особливе занепокоєння викликають речовини психоактивної дії. До таких речовин загального вжитку належить кофеїн, що є найуживанішим психостимулятором у світі, безперервне і масове споживання якого у складі напоїв та медикаментів перетворило його на універсальний глобальний маркер антропогенного забруднення водойм. Серед психотропних фармацевтичних препаратів хлорпромазин, як базовий нейрореплетик із надзвичайно широким спектром клінічного застосування, стабільно надходить у гідросферу через комунальні та госпітальні стоки. Оскільки ці препарати взаємодіють з еволюційно консервативними молекулярними мішенями, вони здатні провокувати виражені метаболічні порушення у нецільових організмів навіть за екологічно релевантних концентрацій. Ситуація критично ускладнюється повсюдною присутністю мікропластику у водоймах. Завдяки високій питомій площі поверхні та гідрофобності, пластикові мікрочастинки діють не лише як самостійний стресор, але й як потужний сорбент і вектор для інших забруднювачів. Як наслідок, у реальних екологічних умовах гідробіоти піддаються впливу не окремих токсикантів, а їхніх складних багатокомпонентних сумішей. Цей мультистресовий ефект індукує нелінійні біохімічні реакції, які неможливо спрогнозувати за допомогою класичних монотоксикологічних тестів.

У якості експериментальних моделей у дослідженні впливу ксенобіотиків обрано двостулкових молюсків, які завдяки прикріпленому способу життя та інтенсивній фільтрації є універсальними біоіндикаторами, що здатні акумулювати широкий спектр ксенобіотиків. Центральним органом метаболічної детоксикації двостулкових молюсків та головною мішенню токсичного впливу є травна залоза, біохімічні параметри якої слугують маркерами ранньої відповіді організму на екологічний стрес, що зумовлює її вибір для оцінки біохімічного відгуку організму на антропогенне навантаження.

З огляду на це, в основу дисертаційного дослідження покладено наукову гіпотезу про те, що навіть низькі (екологічно релевантні) концентрації психоактивних речовин здатні індукувати істотні зміни біохімічних реакцій у травній залозі двостулкових молюсків. При цьому передбачалося, що мікропластик виступає модулятором токсичності, а комбінований вплив цих забруднювачів не є простою арифметичною сумою їхніх індивідуальних ефектів, формуючи натомість складну неадитивну відповідь. Оскільки адаптивні можливості та механізми резистентності гідробіонтів тісно детерміновані еволюційним розвитком і середовищем їхнього існування, припущенням стало існування видоспецифічних відмінностей у стратегіях біохімічної відповіді на токсичний вплив. Для перевірки цієї гіпотези та здійснення комплексного порівняльного аналізу реакцій на мультистресове навантаження було обрано модельних представників двох різних біотопів: прісноводного молюска — перлівницю клиноподібну *Unio tumidus* (Philipson, 1788) та морського — мідію середземноморську *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). Це визначило мету роботи: дослідити видові особливості біохімічних реакцій прісноводного та морського видів двостулкових молюсків на субхронічний вплив психоактивних препаратів та мікропластику за умов їх окремої та комбінованої дії.

Оцінку екотоксикологічних ефектів здійснювали в лабораторних умовах після 14-денної субхронічної експозиції у трьох експериментальних серіях. У першій серії досліджували біохімічну відповідь *U. tumidus* на індивідуальну дію

мікропластику ($1 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}$), кофеїну ($20 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}$), хлорпромазину ($12 \text{ нг} \cdot \text{г}^{-1}$) та їх комбінацію. Друга серія була спрямована на оцінку реакцій антиоксидантної та детоксикаційної систем *M. galloprovincialis* за аналогічного впливу мікропластику ($1 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}$), кофеїну ($20 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}$) та їхньої суміші. У третій серії аналізували залежні від концентрації ефекти хлорпромазину на організм *M. galloprovincialis* за дії його екологічно релевантних концентрацій $12 \text{ нг} \cdot \text{г}^{-1}$ та $12 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}$.

Встановлено видоспецифічний характер відгуку системи антиоксидантного захисту досліджуваних гідробіонтів, де *U. tumidus* виявляє вищу вразливість та ширший діапазон відхилень біохімічних параметрів порівняно з *M. galloprovincialis*. Зокрема, 14-денний вплив досліджуваних ксенобіотиків індукує у перлівниці розвиток вираженого окисного стресу з інтенсифікацією ліпопероксидації та карбонілювання протеїнів, тоді як у мідії за дії мікропластику та кофеїну редокс-статус залишається збалансованим. Визначено, що найбільш потужним прооксидантним чинником для обох видів є хлорпромазин, специфічний інгібуючий вплив якого на активність каталази формує стійкий прооксидантний вектор. З'ясовано, що компенсаторні механізми реалізуються через диференційовану активацію ізоформ супероксиддисмутази та мобілізацію низькомолекулярних тіолів (GSH, MT-SH), які виконують функцію ключових редокс-буферів за умов пригнічення ензиматичної ланки. При цьому активація тіолової системи *U. tumidus* супроводжується деметалізацією металотіонеїнів та порушенням метало-гомеостазу (зниження індексу Zn/Cu). Доведено, що токсичне навантаження трансформує енергетичний метаболізм *U. tumidus*, змінюючи співвідношення NADH/NAD⁺. У *M. galloprovincialis* підтримання рівноваги реалізується через мобілізацію неензиматичних антиоксидантів. Зокрема, у мідій за впливу мікропластику зафіксовано зростання редокс-індексу GSH на тлі підвищення вмісту металонасичених форм металотіонеїнів, тоді як за дії кофеїну та суміші чинників захисний ефект забезпечується формуванням їхніх апо-форм. Встановлено, що за комбінованого впливу чинників спостерігається

неадитивний характер їхньої дії, що проявляється у послабленні (у *U. tumidus*) або нівелюванні (у *M. galloprovincialis*) ознак окисного стресу, вказуючи на взаємокомпенсацію токсичних ефектів за умов мультистресового навантаження.

Функціонування системи біотрансформації ксенобіотиків характеризується вираженою видоспецифічністю та вищою метаболічною ефективністю у *M. galloprovincialis* порівняно з *U. tumidus*. Встановлено, що у морського молюска відповідь на дію хлорпромазину супроводжується синергічною індукцією ензимів першої та другої фаз детоксикації ксенобіотиків, що підтверджує активну участь цитохрому P450 та механізмів глутатіон-залежної кон'югації у метаболізмі препарату. Натомість у *U. tumidus* активація фази I спостерігається лише за впливу кофеїну, тоді як дія інших чинників призводить до пригнічення активності ензимів біотрансформації. За комбінованого впливу забруднювачів зафіксовано модифікацію детоксикаційних шляхів із нівелюванням екстремальних змін активності ензимів, що вказує на часткову взаємокомпенсацію токсичних ефектів та перехід системи на новий рівень функціональної адаптації за умов мультистресового навантаження.

Універсальним маркером цитотоксичності визначено дестабілізацію лізосомальних мембран, які виявилися найбільш вразливою мішенню для обох видів молюсків навіть за мінімальних концентрацій досліджуваних речовин. Поряд із цим, механізми програмованої клітинної смерті демонструють виразну селективність: якщо у перлівниці пригнічення каспазного каскаду зумовлене впливом хлорпромазину, то у мідії подібний ефект викликає експозиція до кофеїну. Принциповою особливістю комбінованої дії забруднювачів є індукція ефекторної каспази-3 в обох модельних об'єктів. Такий проапоптотичний відгук у відповідь на мультикомпонентний стрес інтерпретується як захисний механізм, спрямований на активне очищення від пошкоджених клітинних структур, що корелює зі зменшенням вмісту продуктів окисної модифікації протеїнів у травній залозі.

Математичне обґрунтування отриманих результатів методами багатовимірного статистичного аналізу підтвердило формування унікального

метаболического профілю за умов комбінованого впливу, що відрізняється від ефектів ізольованої дії токсикантів. Доведено, що присутність мікропластику в багатокомпонентних сумішах індукує неадитивні реакції (антагонізм), трансформуючи біодоступність та токсикокінетику ксенобіотиків, що проявляється редуційним зміщенням редокс-статусу та активацією елімінації пошкоджених клітин. Вперше виявлена аналогія низки біохімічних відповідей молюсків із реакціями вищих хребетних (зокрема, індукція EROD та лабільність цинкового гомеостазу) відкриває перспективи використання цих гідробіонтів у тестуванні фармацевтичних сполук. Практична значущість роботи полягає у розробці прогностичного комплексу біомаркерів, де дестабілізація лізосомальних структур та зниження співвідношення Zn/Cu визначені як пріоритетні експрес-індикатори порушення фізіолого-біохімічного статусу організмів. Запропонований методологічний підхід формує наукову базу для вдосконалення програм біомоніторингу водних екосистем та розробки стратегій захисту гідробіонтів від глобального забруднення новітніми хімічними стресорами.

Ключові слова: окисний стрес, редокс-система, система захисту, антиоксидантні ензими, двостулкові молюски, *Unio tumidus*, *Mytilus galloprovincialis*, адаптивні реакції, протеїнові карбоніли, лізосомальна дисфункція, тіол вмісні сполуки, цинк, апоптоз, ксенобіотики, мультистрес.

SUMMARY

Yunko K. B. Comparative study of the redox homeostasis system in bivalve molluscs *Unio tumidus* and *Mytilus galloprovincialis* under exposure to waterborne psychoactive substances and microplastics. – 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, 2026.

The rising manufacture of synthetic polymers and the widespread release of pharmaceuticals into the environment have led to an unprecedented toxicological pressure on aquatic ecosystems. Among emerging contaminants, substances with psychoactive properties are of particular concern. As the most heavily utilized psychostimulant globally, caffeine's continuous and large-scale consumption in beverages and medications has transformed it into a universal global marker of anthropogenic contamination of aquatic environments. Among psychotropic pharmaceuticals, chlorpromazine, a basic antipsychotic with extensive clinical usage, continuously enters the hydrosphere via municipal and hospital effluents. As these compounds interact with evolutionarily conserved molecular targets, they trigger pronounced metabolic disturbances in non-target organisms even at environmentally relevant concentrations.

This ecological challenge is exacerbated by the widespread distribution of microplastics in aquatic environments. Possessing substantial specific surface area and hydrophobicity, plastic microparticles act not only as independent stressors but also as effective sorbents and vectors for other pollutants. Consequently, under real environmental conditions, aquatic organisms are exposed not to individual toxicants but to their complex multicomponent mixtures. This multistressor effect induces nonlinear biochemical responses that cannot be predicted using classical monotoxicological approaches.

Bivalve molluscs were selected as experimental models for studying the effects of chemical contaminants because of their sessile lifestyle and high filtration activity, which make them universal bioindicators capable of accumulating diverse

xenobiotics. The digestive gland, acting as the central organ of metabolic detoxification in bivalves and a primary target of toxic effects, was specifically targeted, as its biochemical parameters serve as early markers of organismal response to environmental stress.

Based on this, the core premise of this research posits that even low (environmentally relevant) concentrations of psychoactive substances can induce significant alterations in biochemical processes in the digestive gland of bivalve molluscs. It was further assumed that microplastics act as modulators of toxicity, and that the concurrent exposure to these pollutants are not a simple additive sum of their individual impacts but rather form complex non-additive responses. Given that adaptive capacity and resistance mechanisms in aquatic organisms are strongly determined by evolutionary history and habitat conditions, the existence of species-specific differences in biochemical response strategies was anticipated. To test this hypothesis and perform a comprehensive comparative analysis of responses to multistressor exposure, two model species from different biotopes were selected: the freshwater bivalve *Unio tumidus* (Philipsson, 1788) and the marine species *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). Accordingly, the aim of the study was to investigate species-specific features of biochemical responses in freshwater and marine bivalves under subchronic exposure to psychoactive pharmaceuticals and microplastics, both individually and in combination.

Ecotoxicological effects were assessed under laboratory conditions following a 14-day subchronic exposure in three experimental series. During the initial phase, the biochemical response of *U. tumidus* to individual exposure to microplastics ($1 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$), caffeine ($20 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), and chlorpromazine ($12 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$), alongside their multi-component mixtures. The subsequent series focused on evaluating antioxidant and detoxification system responses in *M. galloprovincialis* under exposure to microplastics ($1 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$), caffeine ($20 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), and their mixture. The third series examined concentration-dependent effects of chlorpromazine on *M. galloprovincialis* at environmentally relevant concentrations of $12 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ and $12 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

A species-specific pattern of antioxidant defense response was established, with *U. tumidus* exhibiting higher sensitivity and a broader range of biochemical alterations compared to *M. galloprovincialis*. Specifically, a 14-day exposure to the studied xenobiotics induced pronounced oxidative damage in *U. tumidus*, characterized by intensified lipid peroxidation and protein carbonylation, whereas in *M. galloprovincialis*, the redox status remained balanced under exposure to microplastics and caffeine. Chlorpromazine was identified as the strongest pro-oxidant trigger for both species, exerting a specific inhibitory effect on catalase and thereby promoting a persistent pro-oxidant state.

Compensatory strategies were shown to involve differential activation of superoxide dismutase isoforms and mobilization of low-molecular-weight thiols (GSH, MT-SH), which act as key redox buffers under suppression of the enzymatic antioxidant system. In *U. tumidus*, activation of the thiol system was accompanied by metallothionein demetallation and disruption of metal homeostasis (decrease in Zn/Cu ratio). Toxic exposure was also found to alter energy metabolism in *U. tumidus*, evidenced by shifts in the NADH/NAD⁺ ratio. In *M. galloprovincialis*, maintenance of redox balance relied heavily on the mobilization of non-enzymatic antioxidants. In particular, exposure to microplastics resulted in an increased GSH redox index alongside elevated levels of metal-saturated metallothioneins, whereas exposure to caffeine and combined factors promoted the formation of their apo-metallothioneins.

Crucially, the concurrent application of these pollutants generated non-additive effects, manifested as attenuation (in *U. tumidus*) or neutralization (in *M. galloprovincialis*) of oxidative stress markers, indicating mutual compensation of toxic effects under multistressor conditions.

The functioning of the xenobiotic biotransformation system also exhibited pronounced species specificity, with higher metabolic efficiency observed in *M. galloprovincialis* compared to *U. tumidus*. In the marine species, exposure to chlorpromazine induced a synergistic activation of Phase I and Phase II detoxification enzymes, confirming the involvement of cytochrome P450 and glutathione-dependent

conjugation pathways in its metabolism. In contrast, in *U. tumidus*, phase I activation was observed only under caffeine exposure, whereas other factors led to inhibition of biotransformation enzymes. Combined exposure resulted in modulation of detoxification pathways, with attenuation of extreme enzymatic activity changes, indicating partial compensation of toxic effects and facilitating a shift to a new level of functional adaptation under multistressor conditions.

Lysosomal membrane destabilization was identified as a universal marker of cytotoxicity and a highly vulnerable indicator in both species, even at minimal doses of the studied substances. Interestingly, mechanisms of programmed cell death exhibited marked selectivity: in *U. tumidus*, suppression of apoptotic pathways was induced during chlorpromazine treatments, whereas in *M. galloprovincialis*, a similar effect was caused by caffeine exposure. A key feature of combined exposure was the induction of effector caspase-3 in both model organisms. This pro-apoptotic response to multicomponent stress is interpreted as a protective mechanism aimed at eliminating damaged cellular structures, facilitating a reduction in protein carbonylation products in the digestive gland. Multivariate statistical analysis confirmed that multi-component exposures generate a unique metabolic profile, distinct from isolated toxicant impacts. Ultimately, incorporating microplastics into pharmaceutical mixtures induces non-additive (antagonistic) responses through shifts in the bioavailability and toxicokinetics of xenobiotics, leading to a reductive shift in redox status and activation of damaged cell elimination pathways.

This research documents homologous similarities between certain biochemical responses in molluscs and those in higher vertebrates (including EROD induction and zinc homeostasis lability) reinforcing the potential of these hydrobionts for testing pharmaceutical compounds. From a practical standpoint, this dissertation establishes a predictive set of biomarkers, where lysosomal destabilization and decreased Zn/Cu ratio are proposed as priority rapid indicators of physiological and biochemical disturbance. The proposed methodological framework establishes a scientific basis for improving biomonitoring programs within aquatic ecosystems and designing

robust strategies to defend hydrobionts from global contamination by emerging chemical stressors.

Key words: oxidative stress, redox system, defense system, antioxidant enzymes, bivalve mollusc, *Unio tumidus*, *Mytilus galloprovincialis*, adaptive reactions, protein carbonyls, lysosomal dysfunction, thiol-containing compounds, zinc, apoptosis, xenobiotics, multistress.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці в яких опубліковані наукові результати дисертації:

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

1. **Yunko, K.**, Martyniuk, V., Gnatyshyna, L., Khoma, V., Matskiv, T., Tulaidan, H., Mykhalyuk, O., Karitonas, R., Gylyte, B., Manusadžianas, L., & Stoliar, O. (2025). Alleviation of specific responses in the combined exposure of freshwater mussel *Unio tumidus* to psychoactive substances and microplastics. *Environmental toxicology and pharmacology*, 116, 104682. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2025.104682>
2. Impellitteri, F., Briglia, M., Porcino, C., Stoliar, O., **Yunko, K.**, Germanà, A., Piccione, G., Faggio, C., & Guerrera, M. C. (2024). The odd couple: Caffeine and microplastics. Morphological and physiological changes in *Mytilus galloprovincialis*. *Microscopy research and technique*, 87(5), 1092–1110. <https://doi.org/10.1002/jemt.24483>
3. Impellitteri, F., **Yunko, K.**, Calabrese, G., Porretti, M., Martyniuk, V., Gnatyshyna, L., Nava, V., Potorti, A. G., Piccione, G., Di Bella, G., Stoliar, O., & Faggio, C. (2024). Chlorpromazine's impact on *Mytilus galloprovincialis*: a multi-faceted investigation. *Chemosphere*, 350, 141079. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.141079>
4. Impellitteri, F., **Yunko, K.**, Martyniuk, V., Khoma, V., Piccione, G., Stoliar, O., & Faggio, C. (2023). Cellular and oxidative stress responses of *Mytilus galloprovincialis* to chlorpromazine: implications of an antipsychotic drug exposure study. *Frontiers in physiology*, 14, 1267953. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1267953>
5. Impellitteri, F., **Yunko, K.**, Martyniuk, V., Matskiv, T., Lechachenko, S., Khoma, V., Mudra, A., Piccione, G., Stoliar, O., & Faggio, C. (2023). Physiological and biochemical responses to caffeine and microplastics in *Mytilus galloprovincialis*. *The Science of the total environment*, 890, 164075. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164075>

Наукові фахові видання:

1. **Yunko, K.**, Impellitteri, F., Martyniuk, V., Multisanti, C. R., Zabolotna, M., Khoma, V., & Matskiv, T. (2024). The biochemical responses of bivalve molluscs to neuroleptic chlorpromazine are comparable with the responses of higher vertebrates. *Biotechnologia Acta*. 17 (2), 90-92.
<https://doi.org/10.15407/biotech17.02.090>

2. **Yunko, K.**, Martyniuk, V., Khoma, V., Gnatyshyna, L., Mykhalyuk, O., Baranovskii, V., Gladiuk, M., Tulaidan, H., Mudra, A., & Stoliar, O. (2024). Vulnerability of freshwater mussel *Unio tumidus* to waterborne mixture of psychoactive substances and microplastic. *Scientific Issues Ternopil Volodymyr Hnatiuk National Pedagogical University Series: Biology*. 84 (3-4), 29.
<https://doi.org/10.25128/2078-2357.24.3-4.4>

Патенти:

1. Столяр О., Мартинюк В., **Юнко К.**, Мацьків Т., Тулайдан Г., Барановський В., Романюк Л. Спосіб біоіндикації загальної токсичності водних екосистем: 158278 UA, МПК А61К 35/618 (2015.01), G01N 33/52 (2006.01), G01N 33/18 (2006.01) № u202403091; заявл. 12.06.2024; опубл. 15.01.2025, Бюл. № 3. <https://sis.nipo.gov.ua/uk/search/detail/1836725/>

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. **Yunko K.**, Martyniuk V., Khoma V., Gnatyshyna L., Mudra A., Gylyte B., Karitonas R., Manusadzianas L., Stoliar L. Cumulative effect of neuroleptics and microplastics in the exposure of bivalve molluscs to their mixture. *Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології: матеріали VII Міжнародної наукової конференції (м. Дніпро, 3-4 жовтня 2024 р.). Дніпро, 2024.* С. 77-79.
https://www.biochemistry-dnu.dp.ua/wp-content/uploads/2024/10/zbirnyk-Dnipro-3_4-Oct-2024.pdf

2. **Yunko K.**, Impellitteri F., Martyniuk V., Multisanti C. R., Gnatyshyna L., Zabolotna M., Khoma V., Matskiv T., Gylyte B., Bednarska I., Panasiuk I., Tymkiv A., Mazepa M., Lehkyi V., Zabolotna O., Manusadzianas L., Faggio C.,

Stoliar O. Multi-marker approach for the evaluation of neuroleptic chlorpromazine environmental toxicity utilizing bivalve molluscs as bioindicators. *Ternopil Bioscience – 2024: VIII International scientific conference*. (Ternopil, April, 18–19). Ternopil, 2024. P. 203-206. <http://194.44.132.109/handle/123456789/34075>

3. **Yunko K.**, Impellitteri F., Martyniuk V., Multisanti C. R., Gnatyshyna L., Zabolotna M., Khoma V., Matskiv T., Gylyte B., Manusadžianas L., Faggio C., Stoliar O. Biochemical responses of marine and freshwater bivalve molluscs to neuroleptic chlorpromazine. *Youth and Progress of Biology: XX International scientific conference for students and PhD students*. (Lviv, April, 18–20). Lviv, 2024. P. 104-105
<https://bioweb.lnu.edu.ua/wp-content/uploads/2024/04/Zbirnyk-Molod-i-postup-biolo-hii-2024-2.pdf>

4. Impellitteri F., **Yunko K.**, Martyniuk V., Matskiv T., Piccione G., Stoliar O., Faggio C. Combination of caffeine and microplastics on sentinel organisms: detrimental effects on digestive gland. *95th National Congress of the Italian Society for Experimental Biology*. (Trieste, Italy, April, 12–15). Trieste, 2023. P. 8-9.
<https://www.researchgate.net/publication/375546765>

5. Impellitteri F., **Yunko K.**, Martyniuk V., Piccione G., Stoliar O., Faggio C. Physiological and biochemical responses of *Mytilus galloprovincialis* exposed to antipsychotic drug chlorpromazine. *73rd SIF National Congress*. (Pisa, Italy, September, 6-9). Pisa, 2023. P. 166.
<https://www.researchgate.net/publication/375547277>

6. **Yunko K.**, Impellitteri F., Martyniuk V., Lechachenko S., Simchuk S., Gush N., Khoma V., Faggio C., Stoliar O. Biochemical responses of marine mussel *Mytilus galloprovincialis* to caffeine and microplastics in the single and combine exposures. *Youth and progress of biology: XIX International scientific conference for students and Phd students*. (Lviv, April, 26–28). Lviv, 2023. P. 53-54.
<https://bioweb.lnu.edu.ua/wp-content/uploads/2023/04/Youth-and-Progress-of-Biology.-Abstracts-of-XIX-International-Scientific-Conference-for-Students-and-PhD-Students-Lviv-April-26-28-2023..pdf>

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- Caff — кофеїн
- Cas-3 - каспаза-3
- CAT — каталаза
- Spz — хлорпромазин
- EROD — етоксирезорфуфін-О-деетилаза (активність CYP450)
- GSH — глутатіон відновлений
- GSSG — глутатіон окиснений
- GST — глутатіон-S-трансфераза
- MP — мікропластик
- Mix — суміш
- MT — металотіонеїни
- MT-SH — металотіонеїни, визначені за кількістю SH-груп (загальний вміст)
- NAD⁺ — нікотинамідаденіндинуклеотид (окиснена форма)
- NADH — нікотинамідаденіндинуклеотид (відновлена форма)
- NRR — показник стабільності лізосомальних мембран (Neutral Red Retention).
- PC — окисні модифікації протеїнів
- RI GSH — редокс- індекс глутатіону
- SOD — супероксиддисмутаза
- TBARS — перекисне окиснення ліпідів
- Zn-MT — концентрація цинку у складі металотіонеїнів
- АФК — активні форми кисню
- ДТНБ — 5,5-дитіобіс-2-нітробензойна кислота
- ЕДТА — етилендіамінтетраоцтова кислота
- УФ-спектри — спектри абсорбції в ультрафіолетовому діапазоні
- ФМСФ — фенілметилсульфонілфторид

ВСТУП

Актуальність теми

Невід'ємною складовою розвитку суспільства є масове використання фармацевтичних препаратів та засобів особистої гігієни, що за останні десятиліття призвело до їхнього виокремлення у нову масштабну категорію екологічних мікрозабруднювачів (Adenaya et al., 2024). Внаслідок неефективної роботи очисних споруд та наявності прямих побутових стоків (Burgos-Aceves et al., 2021), ці сполуки безперервно потрапляють до водних об'єктів різного типу — від прісних водойм до естуаріїв та Світового океану (Korekar et al., 2020; Patel et al., 2019). Висока біологічна активність цих речовин та їхня повсюдна присутність у водних екосистемах створюють нові екологічні ризики, що викликає обґрунтовану стурбованість наукової спільноти (Bottoni et al., 2010; Fabbri and Franzellitti, 2016; Porretti et al., 2022; Martyniuk et al., 2023 Turani et al., 2019). Серед новітніх забруднювачів особливе занепокоєння викликають речовини психоактивної дії (Escudero et al., 2021; Moreira et al., 2022). Зростання їхнього надходження у довкілля зумовлене глобальним поширенням неврологічних розладів, які охоплюють близько 100 мільйонів осіб і становлять 20% від загального масиву захворювань у світі (Aleya and Uddin, 2020). Особливу актуальність загроза нестабільного психічного стану становить для зон військових конфліктів та, у першу чергу, для населення України (Lushchak et al., 2024). Ключова небезпека антипсихотиків як забруднювачів криється у їхньому складному фармакологічному профілі. Здатність цих сполук неселективно взаємодіяти з множинними типами рецепторів, еволюційно спільними для різних таксономічних груп організмів, критично ускладнює прогнозування їхнього екотоксикологічного впливу на гідробіонтів (Escudero et al., 2021).

Хлорпромазин (Срз) — антипсихотик групи фенотіазинів, внесений до переліку основних лікарських засобів ВООЗ як один із ключових препаратів для терапії шизофренії та психотичних розладів (Dudley et al., 2017). Сьогодні актуальність вивчення Срз стрімко зростає через масштабне розширення його

терапевтичного профілю. Завдяки полівалентному механізму дії, препарат виявився ефективним у критично важливих галузях сучасної медицини: від онкології, оскільки Crz здатний індукувати апоптоз та підвищувати чутливість резистентних ліній ракових клітин до цитостатиків (Lee et al., 2015; Xu et al., 2022), до вірусології, зокрема через його мембрано-дестабілізуючу активність проти SARS-CoV-2 (Stip et al., 2020). Така переорієнтація на лікування масових непсихіатричних захворювань неминуче призводить до кратного збільшення його надходження у доквілля. Попри високу фармакологічну активність, екотоксикологічний профіль Crz залишається недослідженим (Reichert et al., 2019; Wronski and Brooks, 2023).

Кофеїн (Caff) — алкалоїд групи метилксантинів, що є найбільш вживаним психостимулятором у світі, безперервне і масове споживання якого у складі напоїв та медикаментів перетворило його на універсальний глобальний маркер антропогенного забруднення водойм (Buerge et al., 2003; Li et al., 2020). У сучасній терапевтичній практиці Caff викликає значний науковий інтерес завдяки здатності забезпечувати захист від окисного стресу при нейродегенеративних патологіях, виявляти протиракові ефекти та модулювати процеси накопичення металів (Kachroo et al., 2010; Liu et al., 2017; Lu et al., 2008; Rossowska and Nakamoto, 1992). Відомо, що для безхребетних Caff виступає нейротоксичним репелентом (Barua et al., 2021), а його здатність накопичуватися в тканинах молюсків свідчить про реальну загрозу для гідробіонтів (López-García et al., 2019). Дефіцит інформації про екотоксикологічні наслідки присутності Caff у водоймах обґрунтовує необхідність дослідження його біохімічної дії на нецільові організми.

Дія обох обраних психотропних препаратів пов'язана з метаболізмом кальцію та, в результаті неселективного характеру катіонних каналів поширюється і на гомеостаз цинку (Chen et al., 2024), що привертає увагу до вивчення ролі цинк-депонувальних протеїнів металотіонеїнів у реакції організму на їх вплив.

Особливої актуальності екотоксикологічна оцінка Crz та Caff набуває в умовах масштабного забруднення водою мікропластиком (MP). Гідрофобна та амфифільна природа досліджуваних сполук зумовлює їхню здатність сорбуватися на поверхні полімерних часток, що спричиняє виникнення векторного ефекту або так званого ефекту «Троянського коня» (Amelia et al., 2021; de Sá et al., 2018). У реальних екологічних умовах гідробіоти піддаються впливу не ізольованих чинників, а їхніх складних багатокомпонентних сумішей, де MP докорінно змінює біодоступність та шляхи надходження ксенобіотиків (Aliko et al., 2022). Результати сучасних досліджень комбінованого впливу MP з різними класами органічних мікрозабруднювачів свідчать про виникнення мультистресових ефектів, що якісно відрізняються від наслідків ізольованої дії окремих чинників (González-Soto et al., 2019; Syberg et al., 2017). Такий мультифакторний вплив зумовлює нелінійний характер біохімічних відповідей, які неможливо спрогнозувати на основі класичних монотоксикологічних тестів (González-Soto et al., 2019; Martyniuk et al., 2022a; Syberg et al., 2017).

У якості експериментальних моделей у дослідженні впливу ксенобіотиків обрано двостулкових молюсків, які завдяки прикріпленому способу життя та інтенсивності фільтрації є універсальними біоіндикаторами, здатними акумулювати широкий спектр ксенобіотиків (Chahouri et al., 2023; Pagano et al., 2020). Морська мідія *Mytilus galloprovincialis* є еталонним об'єктом міжнародної програми біомоніторингу «Mussel Watch» і визнаним індикатором для оцінки токсичності ксенобіотиків (Gonzalez-Rey et al., 2014; Provenza et al., 2022).

Водночас, хоча саме прісні водойми є первинним резервуаром накопичення фармацевтичних забруднювачів порівняно з морським середовищем (Wronski and Brooks, 2023), реакції прісноводних видів, зокрема *Unio tumidus*, вивчалися значно менше. Оскільки адаптивні можливості та механізми резистентності гідробіотів тісно детерміновані еволюційним розвитком і середовищем їхнього існування, науковим припущенням дослідження стало існування видоспецифічних відмінностей у стратегіях біохімічної відповіді на токсичний вплив. У зв'язку з цим, виникає потреба у

порівняльній оцінці біомаркерів морського виду *M. galloprovincialis* та прісноводного *U. tumidus*, які представляють різні гідрохімічні ніші.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконувалась у межах міжнародної наукової співпраці з Університетом Мессіни (Messina, Italy) та держбюджетної теми МОН України №М/48-2024, М/48-2025 (номер державної реєстрації № 0124U003217) Спільний науково-дослідний проєкт "Оцінка ризиків для водної біоти внаслідок забруднення середовища рідкоземельними елементами, спричиненого сучасними (включно з військовими) технологіями" з Центром природних досліджень, Вільнюс, Литва в рамках білатерального міжнародного наукового співробітництва з Литовською Республікою.

Мета і завдання дослідження.

Мета роботи - дослідити видові особливості біохімічних реакцій прісноводного та морського видів двостулкових молюсків на субхронічний вплив психоактивних препаратів та мікропластику за умов їх окремої та комбінованої дії.

Для досягнення мети було визначено наступні *завдання*:

1. Охарактеризувати стан функціонування системи антиоксидантного захисту у двостулкових молюсків *U. tumidus* та *M. galloprovincialis* за умов впливу мікропластику, кофеїну, хлорпромазину та їх комбінованої дії.
2. З'ясувати ступінь залучення низькомолекулярних тіолових сполук глутатіону та металотіонеїну до підтримання окисно-відновного гомеостазу за дії досліджуваних чинників.
3. Оцінити функціональний стан системи метаболічної біотрансформації ксенобіотиків у двостулкових молюсків за дії досліджуваних чинників.
4. З'ясувати стан клітинної життєздатності та прояви цитотоксичних ефектів у травній залозі молюсків за умов субхронічного впливу ксенобіотиків.
5. Здійснити порівняльний аналіз реакцій *U. tumidus* та *M. galloprovincialis* молюсків для виявлення спільних закономірностей і

відмінностей у їхніх адаптивних стратегіях за умов субхронічного токсичного навантаження.

6. Виокремити та обґрунтувати комплекс високочутливих біомаркерів травної залози, що відображають специфіку ранньої метаболічної відповіді двостулкових молюсків за умов токсичного впливу.

Об'єкт дослідження - системи окисно-відновного гомеостазу та біотрансформації двостулкових молюсків.

Предмет дослідження - показники окисного/відновного стресу, стан низькомолекулярних тіолових сполук, активність ензимів біотрансформації ксенобіотиків та маркери клітинної життєздатності у тканинах прісноводного та морського двостулкових молюсків за умов окремої та комбінованої субхронічної дії на організм психоактивних препаратів і мікропластику.

Методи дослідження - методи препаративної біохімії, гель-розподільча хроматографія (виділення та очищення металотіонеїнів), спектрофотометричні (визначення активності ензимів антиоксидантного захисту, біотрансформації, кількісна оцінка продуктів окисного ушкодження, вмісту низькомолекулярних тіолів, акумуляції металів та концентрації нікотинамідних коензимів), методи оцінки цитотоксичності та апоптозу (визначення стабільності лізосомальних мембран і активності каспази-3), методи математичної статистики.

Наукова новизна одержаних результатів. У дисертаційній роботі вперше здійснено порівняльний аналіз реакцій систем окисно-відновного гомеостазу та детоксикації ксенобіотиків морського та прісноводного видів двостулкових молюсків, встановлено вразливість систем антиоксидантного захисту та біотрансформації нецільових організмів до екстремально низьких (піко- та наномолярних) концентрацій психоактивних фармацевтичних препаратів, аналогію за низкою ознак із специфічними реакціями вищих організмів та залежні від виду відмінності за здатністю до забезпечення реакції окисного стресу, відновного зміщення та біотрансформації ксенобіотиків. Доведено, що комбінований вплив чинників спричиняє ефекти взаємокомпенсації та нівелювання індивідуальних токсичних проявів,

активацію апоптозу, що підтверджує роль мікропластику як вектора, який докорінно змінює біодоступність та токсикокінетику ксенобіотиків.

Практичне значення одержаних результатів. Запропонований методологічний підхід формує наукову базу для вдосконалення програм біомоніторингу водних екосистем за глобального забруднення новітніми мікрозабруднювачами. Запропоновано комплекс високочутливих біомаркерів травної залози, що відображають специфіку токсичності та ранньої метаболічної відповіді прісноводного та морського молюсків на мультистресове навантаження. Зниження стабільності лізосомальних мембран та співвідношення Zn/Cu в організмі молюсків є інформативними експрес-індексами порушення їх фізіолого-біохімічного статусу за екологічно реального впливу психоактивних препаратів.

Особистий внесок здобувача. Автором здійснювався самостійно підбір та аналіз літератури з обраної тематики, постановка, реалізація методик дослідження та опрацювання отриманих даних. Проведення експерименту здійснювалось спільно з іншими співробітниками держбюджетної теми, які аналізували спектр показників, не включений у зміст дисертації. Внесок учасників експерименту відображений у публікаціях. Планування стратегії досліджень, аналіз отриманих даних та їх обговорення проведено спільно з науковим керівником д.б.н. проф. Оксаною Столяр.

Апробація результатів дисертації. Апробацію результатів дослідження здійснено на міжнародних наукових конференціях та конгресах, зокрема на: XIX та XX Міжнародних наукових конференціях студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2023, 2024), VIII Міжнародній науковій конференції «Тернопільські біологічні читання – Ternopil Bioscience» (Тернопіль, 2024), VII Міжнародній науковій конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології» (Дніпро, 2024), Міжнародній науковій конференції «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2024» (Київ, 2024), 95th National Congress of the Italian Society for Experimental Biology (Трієст, Італія, 2023), 73rd National Congress of the Italian Society of Physiology

(SIF) (Піза, Італія, 2023), а також під час міжнародного стажування аспірантів «BUP CAPABLE PhD Student Conference» (Уппсала, Швеція, 2024) та Erasmus (Університет Мессіни, Італія, 2026).

Публікації. За результатами дисертаційного дослідження опубліковано 14 наукових праць, серед яких: 1 патент України на корисну модель, 7 статей у наукових фахових виданнях (з них 5 проіндексовано у міжнародній наукометричній базі Scopus; h-індекс = 6, Scopus Author ID: 57404704400) та 6 публікацій у збірниках матеріалів наукових конференцій та з'їздів.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація викладена на 179 сторінках комп'ютерного набору. Робота 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 358 найменувань, з яких 357 — латиницею. Робота ілюстрована 33 рисунками та 4 таблицями.

РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ДЖЕРЕЛ ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Екотоксикологічний профіль психоактивних речовин у водних екосистемах

Фармацевтичні препарати є одним із найвизначніших досягнень сучасної медицини та фармацевтичної науки, оскільки вони істотно продовжили тривалість життя, знизили рівень смертності від інфекційних і хронічних захворювань та підвищили якість життя мільйонів людей у всьому світі. Однак широке застосування цих сполук і постійне зростання обсягів їх виробництва спричинили масштабне антропогенне навантаження на довкілля, перетворивши фармацевтичні речовини на одну з найбільш швидкозростаючих груп забруднювачів навколишнього середовища (Miller et al., 2019; Patel et al., 2019). Недосконалість існуючих технологій очищення стічних вод і неналежна утилізація лікарських засобів сприяють їхньому надходженню у водні екосистеми, де їх наявність зафіксовано у поверхневих та підземних водах, донних відкладах, а також у живих організмах, що є представниками біоти різних трофічних рівнів, включно з безхребетними, рибами та водоростями (aus der Beek et al., 2016; Patel et al., 2019; Wilkinson et al., 2022). Варто зазначити, що на відміну від традиційних забруднювачів, фармацевтичні препарати розроблені для здійснення специфічного терапевтичного впливу навіть у низьких дозах. Вони взаємодіють із конкретними молекулярними мішенями (зокрема рецепторами, іонними каналами, транспортерами), які збереглися в процесі еволюції і є спільними для хребетних та безхребетних тварин (Fabbri et al., 2023). Ця особливість зумовлює потенційні ризики для здоров'я гідробіонтів, які зазнають хронічного впливу цих речовин у концентраціях, наявних у навколишньому середовищі.

Першочерговим чинником надходження фармацевтичних препаратів у довкілля є відходи життєдіяльності людини та тварин (Boxall et al. 2012), що зумовлено неповною біотрансформацією активних речовин та їх подальшою екскрецією (Kazakova et al., 2022; Samal et al., 2022; Ternes et al., 1999). Ситуацію значно ускладнює неналежна утилізація населенням протермінованих

або невикористаних медикаментів, частка якої сягає близько 50%. Це формує потужне дифузне джерело забруднення, сприяючи міграції активних речовин у поверхневі води (Delgado et al., 2023; Gwenzi et al., 2023). Паралельно, додаткове навантаження створює аграрний сектор, оскільки використання ветеринарних лікарських засобів у тваринництві спричиняє їхнє потрапляння у водойми через стік з ферм, змив з полів удобрених гноєм або стічними водами, та з систем зрошення. Сукупність цих стоків через каналізаційну мережу потрапляє на муніципальні очисні споруди, які виступають основним джерелом емісії зазначених сполук у водні екосистеми (Zuccato et al., 2010; Santos et al., 2007).

Окрему екологічну загрозу становлять стічні води спеціалізованих медичних установ, зокрема психіатричних стаціонарів та онкологічних центрів. Вони характеризуються підвищеним вмістом специфічних груп препаратів — психоактивних речовин, антибіотиків та цитостатиків, концентрації яких суттєво перевищують аналогічні показники у побутових стоках (Ulvi et al., 2022). Водночас, у регіонах з розвиненою фармацевтичною індустрією недостатнє очищення виробничих вод призводить до формування локальних «гарячих точок» із вмістом діючих речовин на рівні міліграмів на літр, що створює зони гострого токсичного впливу на водні екосистеми (Ebele et al., 2017). Усі потоки забруднення зрештою акумулюються на муніципальних очисних спорудах. Однак традиційні технології багатоступеневого очищення не забезпечують повної елімінації фармацевтичних сполук (Fatta-Kassinos et al., 2011), що призводить до їх постійного надходження у поверхневі води в концентраціях від нанограмів до мікрограмів на літр (Patel et al., 2019; Wilkinson et al., 2022). Це призводить до присутності у стічних водах широкого спектра ксенобіотиків, зокрема контрастних речовин, антидепресантів, анальгетиків, нестероїдних протизапальних засобів, психостимуляторів, антибіотиків тощо (Luo et al., 2014; Shaik et al., 2016a,b), вміст яких варіює в межах від $\text{нг}\cdot\text{л}^{-1}$ до $\text{мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ (Ebele et al., 2017; Patel et al., 2019).

Тенденція до накопичення забруднювачів у довкіллі тісно корелює з глобальною динамікою використання ліків. За прогнозами Інституту людських даних IQVIA, споживання лікарських засобів на душу населення збільшиться у більшості регіонів, за винятком Африки та Близького Сходу, де зростання обсягів буде зумовлене виключно демографічними чинниками (Gradinariu et al., 2025). Особливо помітний вплив на структуру споживання мала пандемія COVID-19, яка спричинила різке зростання призначення та продажів лікарських засобів, що традиційно застосовуються для лікування розладів психічного здоров'я, зокрема депресії, тривоги, стресу та пов'язаних із ними станів. Унаслідок пандемії значно зріс рівень стресу, тривожності та депресивних розладів, що призвело до збільшення кількості пацієнтів, які звертаються по психіатричну допомогу (Flament et al., 2021; Hernández Martínez et al., 2023). Це зумовило підвищений попит на такі фармакологічні групи, як антипсихотики, антидепресанти, стимулятори, транквілізатори та ноотропи. Вони характеризуються високою біологічною активністю та здатністю впливати на центральну і периферичну нервову систему навіть у надзвичайно низьких концентраціях. Їхній полімодальний механізм дії охоплює взаємодію з рецепторами дофаміну, серотоніну, ацетилхоліну та γ -аміномасляної кислоти, які є еволюційно давніми сполуками, і зустрічаються у багатьох живих істот у навколишньому середовищі, у літературі їх часто описують як препарати з поліфармакологічним профілем (або «dirty drugs»). Токсичний вплив яких підтверджено випадками зміни поведінки, порушення репродуктивних процесів, гормональної регуляції, а також ростових і метаболічних зрушень у водних організмів (Escudero et al., 2021; Liu et al., 2025; Moreira et al., 2022; Patel et al., 2019; Wronski and Brooks, 2023).

Гетерогенний клас лікарських засобів, що нині класифікують як антипсихотичні препарати (також відомі як нейролептики), сформувався майже 70 років тому завдяки випадковому відкриттю хлорпромазину — похідного фенотіазину з молекулярною формулою $C_{17}H_{19}ClN_2S$, відомого також як 2-хлоро-10-[3-(диметиламіно)пропіл]фенотіазин (Рис. 1.1.1) (NCBI, 2024).

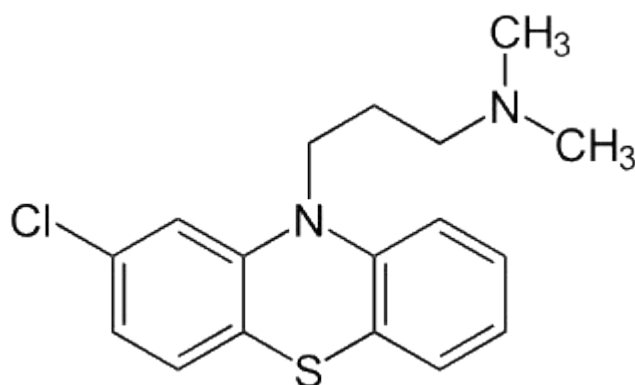


Рис. 1.1.1 Структурна формула хлорпромазину (https://www.drugfuture.com/chemdata/chlorpromazine.html#google_vignette).

Хлорпромазин, як представник групи фенотіазинів, включений до Переліку основних лікарських засобів Всесвітньої організації охорони здоров'я і визнаний одним із п'яти пріоритетних препаратів для терапії шизофренії та шизофреноподібних психозів (Dudley et al., 2017; Varga et al., 2017). Його фармакодинаміка як нейролептика першого покоління ґрунтується на структурній аналогії з дофаміном, що забезпечує ефективну блокаду дофамінергічних рецепторів. Водночас препарат демонструє широкий спектр рецепторного антагонізму, пригнічуючи активність гістамінових, адренергічних, мускаринових та серотонінових (5-HT) рецепторів, а також блокує натрієві, кальцієві та калієві іонні канали (Kon et al., 1994, Ogata and Narahashi, 1990). Така багатогранна дія зумовила клінічну універсальність препарату. З часу впровадження спектр його застосування суттєво розширився і охоплює терапію різноманітних станів у пацієнтів усіх вікових груп: від шизофренії, біполярного розладу та депресії до розладів аутистичного спектру, синдрому дефіциту уваги з гіперактивністю та поведінкових симптомів деменції (Kuroda et al., 2019).

Окремий науковий інтерес становить потенціал перепрофілювання хлорпромазину для лікування соматичних патологій. У країнах, що розвиваються, він розглядається як резервний засіб проти малярії та туберкульозу, а також демонструє активність щодо пріонів (Korth et al., 2001).

Доведена його ефективність проти широкого спектру вірусів (грип, ВІЛ, герпес, JC-вірус), а також коронавірусів MERS-CoV, SARS-CoV-1 і SARS-CoV-2, що пов'язують зі здатністю інгібувати клатрин-опосередкований ендоцитоз (Amaral et al., 2004; Plaze et al., 2020; Stip et al., 2020). Крім того, увага дослідників зосереджена на його протипухлинному потенціалі. Встановлено, що Crz має здатність інгібувати кальмодулін та протеїнкіназу С, чинити антипроліферативну дію, пригнічувати транспортну функцію Р-глікопротеїну (Jaszczyszyn et al., 2012), підвищувати чутливість мультирезистентних ракових клітин до протипухлинних засобів (Escudero et al., 2021; Varga et al., 2017). Crz впливає на топоізомерази та клітинний цикл, подібно до деяких протиракових препаратів (Darkin et al., 1984; Lee et al., 2015; Xu et al., 2022).

У ветеринарній практиці Crz традиційно застосовували як седативний, протиблювотний засіб та стимулятор росту. Проте через ризики для здоров'я людини його використання для продуктивних тварин нині заборонено у ЄС та суворо регламентується у Японії і Китаї (Dai et al., 2025).

Особливості розподілу та накопичення хлорпромазину в організмі безпосередньо залежать від його фізико-хімічних характеристик. Хлорпромазин є високоліпофільною сполукою з низькою молекулярною масою (318,86 г/моль), що забезпечує його легке проникнення через гематоенцефалічний бар'єр шляхом дифузії (Pardridge, 2022). Препарат здатний взаємодіяти з клітинними мембранами, зокрема з мембранними ліпідами, завдяки фенотіазиновій структурі, яка сприяє його інтеграції у ліпідні бішари. Встановлено, що Crz переважно локалізується на внутрішньому лефлеті мембрани, проявляючи високу спорідненість до фосфоінозитидів та фосфатидилсерину (Chen et al., 2003; Sheetz and Singer, 1974). Після всмоктування Crz метаболізується переважно в печінці та нирках за участю ізоензимів цитохрому Р450. Після метаболізму в печінці та нирках за участю цитохрому Р450 утворюється 10–12 метаболітів, при цьому близько 20% дози виводиться із сечею у незміненому вигляді, а 80% — у формі кон'югатів (Wojcikowski et al., 2012). Період напіввиведення з організму в середньому складає приблизно 30 годин, проте

може коливатися залежно від індивідуальних особливостей організму, дози, частоти введення, стану печінки/нирок тощо. Враховуючи поширеність шизофренії (близько 1% населення) та високі терапевтичні дози (400–800 мг/день), екскреція препарату та його надходження у стічні води є значними (DrugBank).

Присутність Crz у водних екосистемах часто залишається непоміченою. За результатами Vieno et al. (2017), середній рівень видалення Crz на муніципальних очисних спорудах (МОС) становить близько 81%, однак дані багаторічних моніторингів свідчать про його стабільне виявлення у госпітальних стоках, випусках муніципальних очисних споруд та поверхневих водах, що вказує на тривалу присутність сполуки у гідросфері та обмежену ефективність існуючих технологій очищення.

Рівні забруднення варіюють залежно від локації. Наприклад, у Пекіні (Китай) вміст Crz у стоках психіатричних лікарень коливався від 5 до 364 нг·л⁻¹ залежно від точки відбору (інфлюент чи ефлюент), причому найвищі значення фіксувалися у безпосередній близькості до джерел скиду (Yuan et al., 2013). Подібні діапазони підтверджує Frédéric and Yves (2014), де Crz було виявлено серед 15 особливо небезпечних хімічних речовин, присутніх у високих концентраціях (мг·л⁻¹) у стічних водах лікарень. Узагальнення літературних даних за останні два десятиліття (Feng et al., 2022) свідчить, що концентрації Crz у стоках та поверхневих водах зазвичай коливаються у межах 1–364 нг·л⁻¹. Навіть після очищення, повного видалення не відбувається: моніторинг у Швеції виявив Crz в очищених ефлюентах очисних споруд у середньому - 11,3 12 нг·л⁻¹ (Baresel et al., 2015). У поверхневих водах концентрації дещо нижчі внаслідок розведення: так, у водоймах Іспанії були зафіксовані значення від 0,9 до 2,6 нг·л⁻¹ (Fernandez et al., 2010).

Доля сполуки у воді залежить від умов середовища. Лабораторні дослідження встановили, що за умов обмеженого освітлення Crz зберігається у природній воді щонайменше чотири тижні та має високу здатність адсорбуватися на донних відкладах (Jiménez et al., 2016; Nałecz-Jawecki et al.,

2006). Під дією сонячного світла або ультрафіолетового опромінення при початковій концентрації $2 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ повна деградація відбувається менш ніж за чотири години, але при цьому утворюється щонайменше 16 фотопродуктів, частина з яких зберігає або навіть перевищує токсичність вихідної сполуки (Jiménez et al., 2016).

Як вже зазначалось, хлорпромазин є високоліпофільною сполукою: його коефіцієнт розподілу октанол/вода становить $K_{ow}=5,35$. Таке високе значення вказує на значний потенціал речовини до міграції з води у ліпідні тканини живих організмів (Tanoue et al., 2020). Ця теоретична закономірність підтверджується польовими дослідженнями. Зокрема, Liu et al. (2015) встановили, що концентрації Crz у тканинах риб ($3,0\text{--}128,4 \text{ нг}\cdot\text{г}^{-1}$) є суттєво вищими порівняно з оточуючою водою ($15,4\text{--}384,5 \text{ нг}\cdot\text{л}^{-1}$). Однак лабораторні експерименти свідчать про те, що процес біоаккумуляції є видоспецифічним і нелінійним. Зокрема, Impellitteri et al. (2024b) у експерименті з *M. galloprovincialis* (експозиція 14 діб) виявили, що при збільшенні концентрації у воді в 1000 разів (з $12 \text{ нг}\cdot\text{л}^{-1}$ до $12 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$) вміст Crz у тканинах молюсків зріс з $0,46 \text{ нг}\cdot\text{г}^{-1}$ до $0,61 \text{ мкг}\cdot\text{г}^{-1}$ ($610 \text{ нг}\cdot\text{г}^{-1}$), тобто приблизно у 1300 разів. Водночас коефіцієнт біоконцентрації (BCF) збільшився непропорційно — лише від 2,61 до 19,67 $\text{л}\cdot\text{кг}^{-1}$ (у $\sim 7,5$ разів). Така динаміка свідчить про наявність у молюсків фізіологічних механізмів обмеження внутрішнього вмісту фармацевтичних речовин (Trombini et al., 2022). Тим не менш, здатність досягати значущих рівнів у тканинах робить цей вид важливим маркером забруднення морських екосистем.

Натомість у ракоподібних, зокрема *Daphnia magna*, спостерігається інша токсикокінетична стратегія. Дослідженням Yang et al. (2025) було встановлено високу гостру чутливість цього виду до Crz ($LC_{50} = 0,73 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$). Кінетичний аналіз показав, що навіть за мінімальних концентрацій ($0,001 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$) токсикант інтенсивно надходить в організм: константа швидкості поглинання (K_u) становила $180,0 \pm 6,23 \text{ л}\cdot\text{кг}^{-1}\cdot\text{год}^{-1}$. Проте це компенсується ефективною роботою систем детоксикації: константа швидкості виведення (K_d) склала 0,166

$\pm 0,025 \text{ год}^{-1}$, що забезпечує швидке очищення організму. Під час фази депурації (відновлення в чистій воді) залишкова концентрація речовини зменшувалася більш ніж на 80% протягом 12 годин. Як наслідок, отримані значення BCF демонструють помірний потенціал накопичення і не перевищують критеріїв ЄС щодо високої біоаккумулятивності ($\text{BCF} > 2000 \text{ л}\cdot\text{кг}^{-1}$), незважаючи на інтенсивне поглинання сполуки.

Наведені дані підкреслюють важливість вивчення впливу Crz на водні екосистеми, проте через широкий спектр біологічної активності передбачити його ефекти вкрай складно. Різні прояви токсичності були зареєстровані у представників різних таксонів. У личинок мідій *M. galloprovincialis* короткочасна експозиція (72 год) інгібувала метаморфоз за LC_{50} на рівні $0,5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ ($1,6 \text{ мкМ}$) (Yang et al., 2011). Субхронічна токсичність проявляється переважно порушеннями на популяційному рівні. У *Daphnia magna* тривала експозиція (21 день) навіть до низьких концентрацій ($250\text{--}710 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$) призводила до зменшення кількості нащадків і пригнічення росту популяції (de Oliveira et al., 2016). Особливу чутливість демонструє коловертка *Brachionus calyciflorus*. Вплив Crz спричиняв скорочення тривалості життя, зниження чистого коефіцієнта відтворення, часу генерації, темпів росту популяції та концентрації дофаміну. Ці ефекти спостерігалися як за умов гострого впливу (у діапазоні $0,8\text{--}3,2 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$), так і при 7-денній експозиції у концентраціях $0,125$; $0,25$ та $0,5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ (Feng et al., 2022). Щодо механізмів токсичності, то біохімічні відповіді, зокрема прояви окисного стресу, детально описані переважно у риб (*Carassius auratus*), яких піддавали впливу високих концентрацій ($1,11$; $0,43$ та $0,32 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$) протягом 24, 48 і 96 годин (Li et al., 2008). У безхребетних реакції менш однозначні: так, у *Daphnia magna* короткочасний вплив (48 год) у діапазоні $10 \text{ нг}\cdot\text{л}^{-1}$ – $250 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ не викликав суттєвих змін активності холінестерази чи антиоксидантних ензимів, окрім активації каталази при $1 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$, яку автори визнали майже незначною (Oliveira et al., 2015). У своїх оглядах Reichert et al. (2019) та Wronski and Brooks (2023) наголошують, що Crz є поширеним глобальним забруднювачем, який залишається недостатньо

дослідженим у контексті впливу на водні екосистеми. Особливо це стосується біохімічних реакцій двостулкових молюсків на низькі, екологічно релевантні концентрації. Наскільки нам відомо, такі дослідження (зокрема при концентрації 56 нМ) проводилися лише у попередніх роботах (Khoma et al., 2020b; Khoma et al., 2022a), що підкреслює актуальність подальших досліджень.

Водночас, для комплексної оцінки якості водного середовища, окрім специфічних токсикантів, необхідно враховувати вплив речовин, що є маркерами антропогенного тиску. Класичним прикладом глобального індикатора забруднення стічними водами визнано **кофеїн** (Ferreira et al., 2005). Кофеїн (1,3,7-триметилксантин) — це природний алкалоїд із сімейства метилксантинів, який ідентифіковано у понад 60 видах рослин, зокрема каві, какао та чаї, з молекулярною формулою $C_8H_{10}N_4O_2$ (Asghar et al., 2018). Характерними фізико-хімічними властивостями речовини є дуже низька леткість та висока розчинність у воді, показники якої, за різними даними, становлять 13–20 г·л⁻¹ (Asghar et al., 2018; Edwards et al., 2015; Silva et al., 2014). Низьке значення коефіцієнта розподілу в системі октанол-вода (Kow) додатково підтверджує його гідрофільність та загальну стабільність у водному розчині (Rigueto et al., 2020). Сполука вирізняється резистентністю до впливу основних екологічних параметрів, таких як температура, рН, солоність та освітлення (Kurissery et al., 2012). Деградація кофеїну в навколишньому середовищі відбувається переважно біологічним та фотохімічним шляхами. Окрім природного походження, кофеїн продукується синтетично і характеризується як потужний нейроактивний агент (Rigueto et al., 2020). Через свою стійкість та поширення він розглядається як повсюдний забруднювач категорії «нових викликів» (emerging contaminants) у водних екосистемах (Vieira et al., 2022).

Кофеїн є домінуючим психостимулятором за рівнем світового споживання та географічної поширеності (Lawrence et al., 2005; Moore et al., 2008), що зумовлено поєднанням його стимулювальної дії та глибокої культурної інтеграції (Fisone et al., 2004). Щоденне споживання оцінюється у 460 тонн (Moore et al., 2008), причому близько 90% дорослого населення планети вживає

принаймні один кофеїновмісний продукт щодня (Nehlig, 2018). Кількісні оцінки середньодобового надходження кофеїну варіюють у широкому діапазоні — від 70 мг до 800 мг на людину залежно від регіону та методики розрахунку (Buerge et al., 2003; Paíga and Delerue-Matos, 2017). Зокрема, у Європі цей показник становить 36,5–319,4 мг·добу⁻¹ (Verster et al., 2017), у Канаді — 224 мг·добу⁻¹ (Caffeine, 2011), а в Австралії — 143 мг·добу⁻¹ (Watson et al., 2016). Надзвичайно широка сфера застосування кофеїну охоплює як харчовий сектор (кава, чай, енергетичні напої, шоколад), так і фармацевтичну галузь, де він є компонентом анальгетиків, діуретиків, засобів проти застуди та стимуляторів (Kleywegt et al., 2019; Kosma et al., 2014). В основі механізму дії кофеїну лежить його здатність виступати неселективним антагоністом аденозинових рецепторів (Cervený et al., 2022). Оскільки аденозин відіграє ключову роль у регуляції циклів сну та неспання, блокування цих рецепторів призводить до стимуляції центральної нервової системи та модуляції активності нейромедіаторів (Santos-Silva et al., 2018; Zhang et al., 2021). На практичному рівні це проявляється у зміні психомоторних функцій: впливі на увагу, пильність, втому, час реакції та точність виконання завдань (Einöther and Giesbrecht, 2013). Важливо зазначити, що поведінкові ефекти кофеїну є концентраційнозалежними: при низьких і середніх дозах спостерігається збільшення рухової активності, тоді як високі дози можуть призводити до її пригнічення (Marin et al., 2011).

Амфифільні властивості молекули кофеїну зумовлюють її здатність вільно дифундувати крізь біологічні мембрани, швидко розподіляючись у біологічних рідинах та тканинах організму. У людини максимальна концентрація сполуки в крові досягається через 45–120 хвилин після вживання, а період напіввиведення становить до 4,5 годин (Fredholm et al., 1999). Основний метаболізм кофеїну (до 99%) відбувається в печінці за участі CYP1A2. У процесі біотрансформації шляхом метилювання та окиснення утворюються три основні форми метаболітів: близько 70–80% речовини розщеплюється до параксантину (1,7-диметилксантин), 7–8% перетворюється на теофілін (1,3-диметилксантин), а інші 7–8% — на теобромін (3,7-диметилксантин). Варто зазначити, що окрім

незміненої речовини, її метаболіти (зокрема параксантин) також здатні впливати на поведінку та фізіологію організму. Здатність кофеїну долати плацентарний бар'єр на тлі сповільненого метаболізму у плода створює ризики порушення розвитку (Fredholm et al., 1999; Thorn et al., 2012). Зокрема, добове споживання понад 100 мг асоціюється із затримкою внутрішньоутробного росту, а понад 200 мг — зі зниженням маси тіла новонароджених (CARE Study Group, 2008). Кінцеві продукти метаболізму та незначна частка незміненої речовини виводяться з організму із сечею (Gracia-Lor et al., 2017). Згідно з дослідженнями, приблизно 1–10% спожитого кофеїну екскретується у неметаболізованому вигляді (Beltrame et al., 2018). Саме цей шлях екскреції є ключовим чинником потрапляння кофеїну у побутові стічні води та подальшого забруднення довкілля.

Антропогенне надходження кофеїну у водні екосистеми відбувається переважно через комунально-побутові та промислові стічні води. Ключовими джерелами емісії є продукти метаболізму людини, пряма утилізація залишків напоїв і фармацевтичних засобів, а також стоки лікувальних установ (Edwards et al., 2015; Li et al., 2020). Сучасні технології очищення стічних вод, зокрема методи біодеградації, демонструють високу ефективність елімінації цієї сполуки, яка, за даними різних моніторингових досліджень, варіює в межах 73–100% (Li et al., 2020; Kosma et al., 2014). Проте, незважаючи на високу ефективність очисних споруд, масове глобальне споживання кофеїну призводить до того, що абсолютна кількість речовини, яка надходить у водойми з очищеними стоками, залишається критично високою. Кінетика розпаду кофеїну у водних екосистемах характеризується значною варіабельністю. Якщо у поверхневих водах середній період напіввиведення сполуки може становити лише близько 1,5 доби (Lam et al., 2004), то за інших умов цей показник зростає до 100–240 днів (Vieira et al., 2022) і навіть до 10 років (Edwards et al., 2018). Швидкість надходження у довкілля перевищує темпи його природної деградації, що зумовлює постійне поповнення запасів кофеїну у поверхневих водах та його статус псевдостійкого забруднювача (Zhu et al., 2013).

Зростаюча кількість наукових праць підтверджує повсюдну наявність кофеїну в різних водних матрицях по всьому світу (Vieira et al., 2022). Найвищі концентрації та частота виявлення речовини закономірно спостерігаються у стічних водах. Діапазон вмісту Caff у вхідних та очищених стоках коливається від 0,02 до 86 000 мкг·л⁻¹ (Oliveira et al., 2015). Зокрема, у неочищених стічних водах (на вході до очисних споруд) фіксувалися концентрації на рівні 230–293 мкг·л⁻¹, тоді як на виході ці показники знижувалися до 0,18–18 мкг·л⁻¹ (Heberer et al., 2002; Weigel et al., 2004). Однак у деяких випадках рівні забруднення залишаються критичними. Наприклад, у Сінгапурі концентрація кофеїну у стічних водах сягала 3594 мкг·л⁻¹, посівши перше місце серед 17 досліджених ксенобіотиків. У Кувейті в місці несанкціонованого випуску стічних вод було виявлено 13 мкг·л⁻¹ речовини (Smith et al., 2015).

Наявність кофеїну дедалі частіше фіксується у прісноводних екосистемах по всьому світу (Korekar et al., 2020). Хоча типові концентрації речовини у поверхневих водах зазвичай не перевищують 1 мкг·л⁻¹ (Cervený et al., 2022), а максимальний зафіксований рівень у Європі становив 39,8 мкг·л⁻¹ (Zhou et al., 2019), глобальна картина забруднення характеризується значною неоднорідністю та наявністю екстремальних показників.

Зокрема, у низці регіонів виявлено суттєво вищі рівні забруднення: у Коста-Риці концентрації сягали 1 мкг·л⁻¹ (1000 мкг·л⁻¹) (Cervený et al., 2022), в озері Амбазері (Індія) — до 174 нг·л⁻¹ (Archana et al., 2017), а в річці Ріу-Гранді-ду-Сул (Бразилія) — до 28,44 нг·л⁻¹ (Peteffi et al., 2018). Географія поширення ксенобіотика охоплює також водойми Північної Америки та Азії: у струмках Канади (Онтаріо) вміст кофеїну варіював від 60 до 1202 нг·л⁻¹ (Comeau et al., 2008; Du et al., 2018), тоді як у Малайзії та Лівані фіксувалися нижчі значення — 37 нг·л⁻¹ (Praveena et al., 2018) та 24 нг·л⁻¹ (Mokh et al., 2017) відповідно.

У прибережних водах урбанізованих зон вміст кофеїну варіює в межах 0,016–8,23 мкг·л⁻¹ (Weigel et al., 2002), досягаючи рекордних 11 мкг·л⁻¹ в Австралії (French et al., 2015). Регіональний розподіл демонструє значну

амплітуду: від 140–1600 нг·л⁻¹ у США та 3,1 мкг·л⁻¹ в Егейському морі до фонових 0,01–0,17 нг·л⁻¹ у Середземномор'ї (Szymczucha et al., 2020). Варто зазначити, що концентрації речовини в естуаріях часто перевищують показники очищених стічних вод. Цей факт є прямим свідченням скидання неочищених каналізаційних стоків безпосередньо у прибережні екосистеми (Komori et al., 2013). Проникаюча здатність забруднювача підтверджується його виявленням у ґрунтових водах (0,01–0,68 мкг·л⁻¹) та навіть у питній воді (0,50–35 мкг·л⁻¹) (Ismail et al., 2019; Paíga et al., 2017), що підкреслює необхідність постійного моніторингу для оцінки ризиків для біоти та людини (Roveri et al., 2020).

Внаслідок повсюдного поширення кофеїну в навколишньому середовищі його наявність фіксується у тканинах широкого спектру гідробіонтів — від мікродоростей до риб. Рівні акумуляції ксенобіотика суттєво варіюють залежно від таксономічної приналежності організму та географічного регіону. Зокрема, у коралах на Мальдівах концентрація речовини досягала 37 нг·л⁻¹ (Rizzi et al., 2020), тоді як у водоростях із Червоного моря (Саудівська Аравія) — до 41 нг·г⁻¹ (Ali et al., 2018). Значну здатність до накопичення демонструють двостулкові молюски: у тканинах азійської зеленої мідії *Perna viridis* та молюска *Polymesoda expansa* з Сінгапуру зафіксовано рівні до 11 нг·г⁻¹ (Bayen et al., 2016), а у мідіях (*Mytilus spp.*) з узбережжя Каліфорнії — до 140 нг·г⁻¹ сухої маси (Maruya et al., 2014). У риб максимальні зафіксовані концентрації сягають 74 нг·г⁻¹ (Ali et al., 2018), причому спостерігається виражена тканинна специфічність розподілу речовини. Наприклад, у *Sarda orientalis* вміст кофеїну становив 50 нг·г⁻¹ у філе та 65 нг·г⁻¹ у печінці, тоді як у морського ляща *Pteryogymnus laniarius* концентрація у кишечнику та зябрах не перевищувала 2 нг·г⁻¹ (Ojemaue and Petrik, 2019). Це свідчить про те, що інтенсивність накопичення кофеїну залежить від виду та типу тканини.

Традиційні дослідження токсичності кофеїну фокусувалися на визначенні летальних доз. Було встановлено, що для виникнення гострого отруєння у бактерій, водоростей, ракоподібних та риб необхідні надзвичайно високі концентрації речовини — від 87 до 3490 мг·л⁻¹ (OECD, 2002). Оскільки такі

рівні є недосяжними у природних умовах, тривалий час кофеїн не розглядали як значну загрозу. Тому сучасний науковий фокус змістився на оцінку хронічного впливу екологічно значущих концентрацій (від $\text{нг}\cdot\text{л}^{-1}$ до $\text{мкг}\cdot\text{л}^{-1}$), за яких у нецільових організмів спостерігаються репродуктивні порушення, зміни поведінки, нейротоксичні, генотоксичні ефекти та ознаки окисного стресу (Aguirre-Martínez et al., 2013; Aguirre-Martínez et al., 2015; Cerveny et al., 2022; Cruz et al., 2016; Diogo et al., 2023; Korekar et al., 2020; Nunes et al., 2022; Pires et al., 2016; Teixeira et al., 2025; Vieira et al., 2022). Незважаючи на те, що наявні бази даних містять обмежену інформацію щодо екотоксичності кофеїну для прісноводних видів, низка досліджень демонструє чутливість гідробіонтів навіть до мікрокількостей речовини. Згідно з наявними літературними даними, вплив кофеїну на водні організми супроводжується вираженими прооксидантними ефектами, що було підтверджено як для безхребетних (Cruz et al., 2016; Vieira et al., 2022), так і для риб (Li et al., 2012). Зокрема, у поліхет *Diopatra neapolitana* та *Arenicola marina* низькі концентрації Caff (0,5, 3,0 та $18,0 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$) протягом 28 днів експозиції викликали підвищення активності SOD та інтенсифікацію перекисного окиснення ліпідів на фоні зниження співвідношення GSH/GSSG, проте не впливали на активність каталази (Pires et al., 2016). Аналогічні закономірності щодо порушення стабільності лізосомальних мембран та індукції пошкоджень ДНК у тканинах гепатопанкреасу були зафіксовані для краба *Carcinus maenas* при дії Caff у діапазоні концентрацій $5\text{--}50 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ (Aguirre-Martínez et al., 2013). У молюска *Ruditapes philippinarum* після 28-денного впливу Caff (0,5, 3 та $18 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$) було виявлено активування системи антиоксидантного захисту та одночасне підвищення перекисного окиснення ліпідів (Cruz et al., 2016). Для риб (*Carassius auratus*) було показано, що високі концентрації Caff ($0,4 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ і вище) підвищували активність SOD після 1, 2, 4 та 7 днів впливу (Li et al., 2012). Варто зауважити, що на відміну від зазначених гідробіонтів, для людини описувалася антиоксидантна активність кофеїну (Liang and Kitts, 2014).

Оскільки аденозинові рецептори еволюційно збережені у хребетних, включно з рибами (Boehmler et al., 2009), присутність кофеїну у воді здатна провокувати поведінкові аномалії у нецільових видів. Zhou et al. (2019) встановили значний вплив речовини на локомоторну активність личинок *Danio rerio* при концентраціях 1, 10 та 100 мкг·л⁻¹. Важливо підкреслити, що найнижча дієва концентрація (1 мкг·л⁻¹) є приблизно у 40 разів нижчою за максимальні рівні (39,8 мкг·л⁻¹), виявлені у поверхневих водах Європи, що свідчить про високий екологічний ризик. Подібні результати щодо впливу екологічно значущих концентрацій на рухову активність личинок *D. rerio* отримали також Steele et al. (2018). Натомість інші дослідження поведінкових ефектів (Neri et al., 2019; Ruiz-Oliveira et al., 2019) оперували концентраціями понад 10 000 мкг·л⁻¹, що не відповідає природним реаліям. Варто також зауважити відсутність даних щодо впливу на дикі популяції, оскільки експерименти обмежувалися лабораторними особинами.

Особливий інтерес викликає вплив нейроактивних речовин на добові ритми, які є критичними для адаптації організмів (Patiño et al., 2011; Tamai et al., 2012). Хоча фізіологічні циркадні ритми, контрольовані секрецією мелатоніну, є відносно стабільними (Sánchez-Vázquez et al., 2019), поведінкові реакції виявляються вразливішими до хімічних стресорів. Це підтверджується тим фактом, що зміни локомоторної активності личинок *D. rerio* під впливом кофеїну фіксувалися лише в темний період експерименту (Zhou et al., 2019). Наявні бази даних характеризуються суттєвим дефіцитом інформації щодо хронічної токсичності для водних організмів, насамперед прісноводних видів. Це зумовлює відсутність екотоксикологічно значущих даних про вплив кофеїну на екосистеми внутрішніх водойм. Ця проблема поглиблюється тим, що компенсувати нестачу даних шляхом узагальнення результатів інших досліджень вкрай складно через значну варіабельність біологічних відповідей. Філогенетично та фізіологічно відмінні види (прісноводні порівняно з морськими) можуть демонструвати абсолютно різні реакції на ідентичні умови середовища (Glazier et al., 2005). Більше того, навіть у межах філогенетично

близьких таксономічних груп реакції організмів на екологічно значущі концентрації ксенобіотиків можуть бути непередбачуваними та суттєво різнитися, що унеможлиблює пряму екстраполяцію даних.

1.2. Роль мікропластику в модуляції токсичності ксенобіотиків та екотоксикологічні ризики їх сумісної дії

Проблема накопичення антропогенних відходів набула глобального масштабу (González-Pleiter et al., 2020), а забруднення пластиком визначено як один із пріоритетних екологічних викликів сучасності. Масштабування виробництва синтетичних полімерів, зумовлене їхніми технологічними перевагами, демонструє стрімку динаміку: від 2 млн тонн у 1950 році до 381 млн тонн у 2015 році та 348 млн тонн у 2017 році (Fu and Wang, 2019). За прогнозами, до 2050 року кумулятивний обсяг виробництва може досягти 33 млрд тонн (Yu et al., 2020). Таке зростання призвело до утворення значних обсягів відходів, які за період 1950–2015 років оцінюються у 6,3 млрд тонн (Ding et al., 2022). Критичність ситуації посилюється низькою ефективністю утилізації: за даними Geyer et al. (2017), лише 9% пластику переробляється, 12% спалюється, а 79% акумулюється в екосистемах або на звалищах. Неналежний менеджмент відходів у поєднанні зі зростанням світового споживання пластику є основним чинником забруднення водних об'єктів мікропластиком.

Мікропластик (MP) — це пріоритетний забруднювач, що протягом останніх десятиліть перебуває у фокусі уваги як наукової спільноти, так і громадськості (Lebreton and Andrady, 2019). До цієї категорії зазвичай відносять частинки розміром від 10 мкм до 5 мм, хоча нижня межа розмірності залишається предметом дискусій. Процеси подальшої фрагментації можуть призводити до утворення частинок діаметром менше 100 нм — нанопластику, який у сучасній літературі часто розглядається як субкатегорія загального терміну «мікропластик» (Moriwaki et al., 2022; Yang et al., 2022a).

За хімічною природою MP класифікують відповідно до полімерного складу. До найбільш поширених у навколишньому середовищі типів належать: поліетилен (PE), поліпропілен (PP), полістирол (PS), полівінілхлорид (PVC),

поліетилентерефталат (PET), а також поліуретан і полікарбонат (Lozano et al., 2021). Ключовим чинником, що визначає поведінку МР у довкіллі, є мономерна структура полімерів. Зокрема, наявність оксигеновмісних функціональних груп суттєво впливає на адсорбційну здатність поверхні та її взаємодію з іншими супутніми забруднювачами. Враховуючи, що значна частина мікропластику у Світовому океані складається з високомолекулярних полімерів, вони характеризуються високою резистентністю до деградації, зберігаючи стійкість у водному середовищі протягом десятиліть (Hitchcock and Mitrovic, 2019).

За механізмом утворення МР класифікують на дві основні категорії: первинний та вторинний. Первинний цілеспрямовано виготовляється у мікророзмірному діапазоні для промислового використання, тоді як вторинний є продуктом деградації макропластикових відходів під впливом абіотичних (УФ-випромінювання, механічне стирання, вивітрювання) та біотичних (біодеградація) чинників. Основними резервуарами накопичення цих забруднювачів є водні екосистеми, куди вони потрапляють через поверхневий стік, промислові скиди, а також внаслідок діяльності морського транспорту та рибальства (Lebreton et al., 2017). З морфологічної точки зору, МР (<5 мм) диференціюють на мікрокульки, мікрОВОлокна, мікрофрагменти, мікроплівки та мікрогранули (Sharma et al., 2023). Кожен із цих типів має специфічні джерела походження та шляхи міграції. Через високу стійкість до розкладання та малі розміри, ці волокна та мікрокульки із косметичних засобів (Zhou et al., 2023) проходять крізь системи очищення стічних вод, призводячи до довготривалого забруднення водних басейнів (Napper and Thompson, 2016).

Утворення вторинного МР зумовлене фізико-хімічною резистентністю полімерів, які замість повної біодеградації зазнають фрагментації на дрібніші уламки. Цей процес забезпечує циркуляцію пластикових частинок в біогеохімічних циклах атмосфери, гідросфери та літосфери (Lwanga et al., 2022). Деструкція МР в довкіллі відбувається синергічно під впливом вивітрювання, гідродинамічного навантаження та антропогенної діяльності. Критичними чинниками деградації є фотоокиснення під дією

УФ-випромінювання, гідроліз та термічний стрес, що викликають появу мікротріщин і втрату структурної цілісності матеріалу. Процес посилюється біотичними агентами — діяльністю мікроорганізмів та фауни (Aliko et al., 2022), а також хімічною взаємодією полімерної матриці із зовнішніми забруднювачами, що послаблює хімічні зв'язки. Результатом сукупності цих впливів є перетворення побутових відходів (пляшок, пакетів, текстильних волокон) на стійкий вторинний мікропластик (Impellitteri et al., 2024a).

Важливо підкреслити, що вплив чинників навколишнього середовища (фотоокиснення, термічних коливань, механічного навантаження та біотичної активності) не обмежується лише фізичною фрагментацією пластику. Ці процеси трансформують інертний матеріал у високореактивні частинки (Zhang et al., 2021). Деградація фундаментально змінює хімію поверхні та, як наслідок, фізико-хімічні властивості МР, посилюючи його реакційну здатність (Liu et al., 2020). Як показали Mohana et al. (2022), процес старіння супроводжується утворенням поверхневих дефектів (мікротріщин), що призводить до зростання питомої площі поверхні, а також до значного накопичення оксигеновмісних функціональних груп. Така модифікація поверхні суттєво підвищує адсорбційну ємність МР як до гідрофільних, так і до гідрофобних сполук. Додатковим аспектом екологічної небезпеки є власний хімічний склад полімерної матриці. Для покращення експлуатаційних характеристик у процесі виробництва до пластмас вводять різноманітні добавки: пластифікатори, термостабілізатори, антиоксиданти та барвники. Міграція (вилуговування) цих сполук у довкілля створює хронічні токсикологічні ризики та становить значну загрозу для функціонування водних екосистем (Liu et al., 2020; Santos et al., 2020).

Поглинання МР гідробіонтами ініціює комплекс негативних наслідків, які диференціюють на фізичні та хімічні (Scherer et al., 2018). Фізична токсичність реалізується насамперед через механічний вплив на шлунково-кишковий тракт: абразивні пошкодження епітелію, обструкція просвіту кишечника, деструкція слизової оболонки та виникнення ефекту «псевдонасичення» (Mallik et al., 2021; Wright and Kelly, 2017). Зазначені патологічні стани призводять до

зниження ефективності асиміляції поживних речовин, виникнення енергетичного дефіциту, затримки онтогенетичного росту та підвищення рівня смертності (Jabeen et al., 2018; Jovanović et al., 2017). Резистентність синтетичних полімерів до ензиматичного гідролізу створює надмірне навантаження на травну систему, провокуючи гіперемію, гістопатологічні зміни кишкової стінки та інгібування каталітичної активності травних ензимів (Romano et al., 2018). Окрім трофічного впливу, акумуляція МР у зябровому апараті зменшує корисну площу респіраторної поверхні та порушує газообмін, що призводить до гіпоксії тканин і зниження резистентності організму до інфекційних агентів (Jabeen et al., 2018). Системний вплив МР також супроводжується поведінковими змінами, зокрема зниження харчової активності, пригнічення хижацької поведінки та порушення локомоторної координації (Qiang and Cheng, 2021), а також через дисфункцію репродуктивної системи (Klavins et al., 2022).

Емпірична база досліджень підтверджує виражений токсикологічний вплив МР на фізіологію гідробіонтів. На рівні хребетних зафіксовано суттєві порушення енергетичного метаболізму: так, у риб *Sebastes schlegelii* виявлено інгібування приросту маси на 65,4% та зниження питомої швидкості росту на 65,9%, а у риб *Oryzias latipes* — спектр сублетальних розладів (Pannetier et al., 2020). Окрім соматичного росту, МР впливає на мікробіоценоз кишечника: експеримент на молодих особинах *Lates calcarifer* продемонстрував, що 21-денна експозиція поліетилену та біорозкладного мікропластику призводить до їх накопичення у шлунково-кишковому тракті та значного збіднення різноманітності кишкового мікробіому (Xie et al., 2022). У безхребетних токсичні ефекти реалізуються переважно через імуносупресію та порушення розвитку. Зокрема, у раків *Procambarus clarkii* акумуляція частинок поліетилену (3–20 мкм) індукує окисний стрес, гемоцитарну інкапсуляцію та пригнічення активності фенолоксидази (Zhang et al., 2022). Паралельно, у личинок голкошкірих відзначено онтогенетичні збої, такі як затримка метаморфозу та зниження ефективності живлення (Lizárraga et al., 2017).

Адсорбція забруднюючих речовин є однією з найбільш поширених форм поведінки мікропластику у водному середовищі, що безпосередньо обумовлено великою питомою площею поверхні та вираженою гідрофобністю полімерних частинок. Враховуючи ці характеристики, мікропластик здатний діяти як ефективний сорбент і, як наслідок, виступати носієм (вектором) широкого спектру інших забруднювачів довкілля, зокрема стійких органічних забруднювачів, вуглеводнів, фармацевтичних препаратів та інших (Klavins et al., 2022). У наукових роботах було експериментально доведено адсорбційне зв'язування мікропластику з важкими металами (Brennecke et al., 2016), серед яких ідентифіковано слідові кількості Ag, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb та Zn (Brennecke et al., 2016; Atugoda et al., 2021). Поряд з неорганічними сполуками, гідрофобна природа та високе співвідношення площі поверхні до об'єму сприяють акумуляції на поверхні мікропластику органічних забруднювачів (Wang et al., 2021), таких як поліциклічні ароматичні вуглеводні, поліхлоровані біфеніли, перфторовані алкільні речовини, полібромовані дифенілові ефіри, дихлордифенілтрихлоретан (ДДТ), а також фармацевтичних препаратів та засобів особистої гігієни (Atugoda et al., 2021).

Процес сорбції є багатофакторним, оскільки кожен тип пластику проявляє індивідуальні фізичні та хімічні властивості, які визначають його екологічну поведінку, швидкість розкладання та здатність утримувати забруднюючі речовини. Залежно від природи полімерної матриці та хімічної структури речовини, взаємодія може здійснюватися за допомогою різних механізмів: сил Ван-дер-Ваальса, гідрофобної взаємодії, водневих зв'язків, сил електростатичної взаємодії-відштовхування, галогенних зв'язків, π - π взаємодії або ефекту розподілу (Рис. 1.2.1.) (Luo et al., 2022).

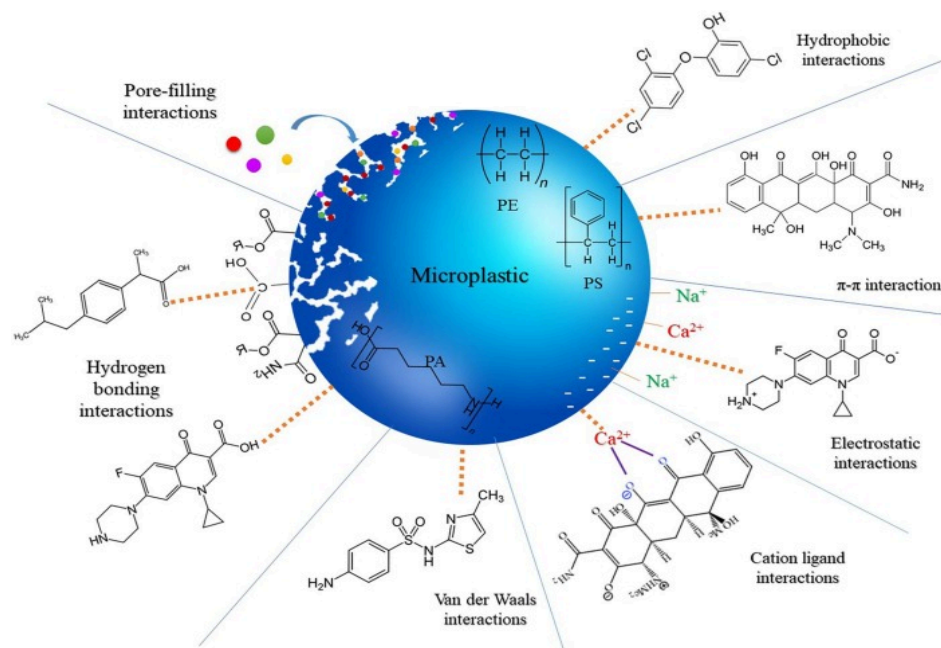


Рис. 1.2.1. Типи взаємодії між забруднювачами та поверхнями мікропластику (Atugoda et al., 2021)

Критичним чинником, що регулює ефективність зв'язування, є гідрофобність сполук. Гідрофобні органічні забруднювачі загалом характеризуються високою схильністю до адсорбції на неполярних поверхнях, включаючи природні осади та органічну речовину, однак часто вони виявляють значно більшу спорідненість саме до пластикових поверхонь (Carbery et al., 2018). Як правило, гідрофобні органічні сполуки адсорбуються на мікропластику краще, ніж гідрофільні. Ця закономірність пояснюється через коефіцієнт розподілу *n*-октанол-вода та його зв'язок з константою розподілу, що слугують індикаторами для кількісної оцінки розподілу речовини між фазами і, отже, є ключовими параметрами в оцінці екологічного ризику хімічних речовин через їхню доступність, вплив і токсичність (Mohana et al., 2022).

Мікропластик формує у водному середовищі значну площу твердої поверхні, що спричиняє ефект концентрування: кількість органічних забруднювачів, що накопичуються на поверхні пластику, може бути на кілька порядків вищою, ніж у навколишніх водах. Лабораторні дослідження продемонстрували, що сорбційна здатність мікропластику до водорозчинних органічних сполук варіює в межах від 1 до 10 000 нг·г⁻¹ (Hartmann et al., 2017).

Полюві дані підтверджують цю тенденцію: так, у Японії кількість накопичених поліхлорованих біфенілів та полібромованих дифенілових ефірів на пластикових гранулах була у 10^5 – 10^6 разів вищою, ніж у навколишній морській воді (Mato et al., 2001). Аналогічні результати отримано при моделюванні умов морської води, де максимальна сорбційна здатність поліпропіленових мікрочастинок для 3,3',4,4'-тетрахлорбіфенілу оцінювалася приблизно у $350 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}$ (Zhan et al., 2016). Такі високі показники сорбції підкреслюють роль мікропластику як потужного концентратора токсичних речовин у гідросфері.

Нещодавно в науковій літературі було розглянуто взаємодію МР з фармацевтичними препаратами та іншими новими забруднювачами, проте дані свідчать про те, що недостатньо досліджень було присвячено глибокому розумінню механізмів, що лежать в основі цих взаємодій (Atugoda et al., 2021). Наявні емпіричні дані демонструють варіативність сорбції залежно від типу полімеру та класу речовини. Так, Elizalde-Velázquez et al. (2020) досліджували сорбцію трьох поширених нестероїдних протизапальних препаратів (НПЗП) – ібупрофену, напроксену та диклофенаку – на PE, PP та PS. Було встановлено, що НПЗП інтенсивно сорбувалися на МР у кислих умовах, причому частинки PE демонстрували найвищу спорідненість до всіх трьох фармацевтичних сполук. В іншому дослідженні Li et al. (2018) вивчали адсорбцію п'яти антибіотиків на п'яти типах МР у прісноводних та морських системах. Автори встановили найбільшу адсорбційну здатність поліаміду для антибіотиків зі значенням коефіцієнта розподілу (K_d) від $7,36 \pm 0,257$ до $756 \pm 48,0 \text{ л} \cdot \text{кг}^{-1}$ у прісноводних системах, пояснюючи це пористою структурою полімеру та утворенням водневих зв'язків. Ці результати показали, що частинки поліаміду, які часто спостерігаються у довкіллі, можуть служити переносниками антибіотиків у водному середовищі. Також Razanajatovo et al. (2018) досліджували сорбцію та десорбцію сульфаметоксазолу (SMX), β -блокатора пропранололу (PRP) та антидепресанту сертраліну (SER) за допомогою мікропластиків PE. Концентрація препаратів на поверхні становила 86,78, 133,49 та 329,97 $\text{мкг} \cdot \text{г}^{-1}$ для SMX, PRP та SER відповідно, за початкової

концентрації у розчині менше $1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$. Водночас, відсотки десорбції двох гідрофобних фармацевтичних препаратів для мікропластиків PE становили лише 8% для PRP та 4% для SER через 3 години, що свідчить про міцність утворених комплексів. Наприклад, Fang et al. (2025) продемонстрували, що MP можуть впливати на біодоступність та динаміку токсичності важких металів і пестицидів за допомогою механізмів електростатичної адсорбції, поверхневого комплексоутворення та формування біоплівки.

Антибіотики та мікропластик, маючи схожі джерела та шляхи міграції, формують складне комбіноване забруднення. Адсорбція антибіотиків на поверхні MP викликає складні токсичні ефекти, оскільки мікропластик може модулювати екотоксикологічний вплив фармацевтичних препаратів, впливаючи на їхню стійкість та долю в навколишньому середовищі. Однією з пріоритетних груп забруднювачів є також пестициди. Реїа et al. (2023) показали, що завдяки малому розміру, великій площі поверхні та гідрофобності, MP ефективно адсорбують пестициди, змінюючи їхню екологічну поведінку. Зокрема, Wang et al. (2020) виявили, що поліетиленові частинки впливають на деградацію та розподіл пестицидів, значно збільшуючи їхній період напіврозпаду у водних екосистемах.

У контексті даного дослідження особливу увагу привертає хлорпромазин — психотропний препарат, що має гідрофобну природу, що загалом вказує на досить високий сорбційний потенціал. У лабораторних експериментах він продемонстрував найбільшу сорбцію на частинках поліетилену серед досліджених полімерів (PE, PS, PA, PN), досягаючи насичення при концентрації 50 мг мікропластику на 20 мл розчину (Klavins et al., 2022). Важливим чинником впливу виявилася іонна сила розчину: підвищення солоності середовища, що знижувало сорбцію хлорпромазину на поліетилені, що свідчить про перевагу прісноводних умов для формування стійких комплексів системи «мікропластик–фармацевтик».

Організми, що мешкають у забрудненому середовищі, зазвичай зазнають впливу складної суміші хімічних забруднювачів. Цей вплив може спричиняти

токсичні ефекти навіть тоді, коли окремі стресори присутні у концентраціях, нижчих за рівень NOEC (No Observable Effect Concentration — концентрація, за якої не спостерігається ефекту) (Beyer et al., 2014). Це явище, відоме як комбінований ефект, токсичність суміші, спільна токсичність або «коктейль-ефект», базується на взаємодії речовин із подібним або різним механізмом дії. Забруднювачі можуть впливати на токсичність один одного, створюючи практично необмежену кількість можливих адитивних, синергічних або антагоністичних комбінацій. Зростаюча кількість доказів свідчить про те, що такі суміші можуть становити значно більший екологічний ризик і спричиняти гірші наслідки для біоти, ніж сполуки окремо.

Проблема ускладнюється тим, що оцінка хімічної токсичності в межах екологічного ризику зазвичай проводиться для кожної речовини окремо, без урахування можливих ефектів суміші. Це створює ризик недооцінення реального шкідливого впливу комбінацій забруднювачів у довкіллі. Через величезну кількість потенційних хімічних контамінантів і складність природних систем проведення (еко)токсикологічних тестів для кожної можливої суміші є практично неможливим. Додатково ситуацію ускладнюють нехімічні чинники, які також можуть виступати стресорами. Тому в сучасній регуляторній токсикології виникає нагальна потреба у спрощеному, але надійному підході для оцінки екотоксичності, що базується на визначенні детальних шляхів небажаних наслідків (AOP) для кращого розуміння механізмів дії (Silva et al., 2022).

Відтак, мета нашого дослідження була зумовлена спорадичністю досліджень реакцій двостулкових молюсків як визнаних біоіндикаторних організмів на вплив психотропних фармацевтиків водного середовища за умов, наближених до екологічно реальних за концентрацією та поєднанням з іншими новітніми забруднювачами, а також обмеженим колом інформації щодо порівняльної здатності морських та прісноводних видів адаптуватись до новітніх ксенобіотиків.

РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Дослідні групи та умови експерименту

Для дослідження використовували мікропластик на основі поліетиленових кульок, розміром 34–50 мкм надвисокої молекулярної маси з модифікованою поверхнею, порошок, (434272), хлорпромазину гідрохлорид (2-хлор-10-(3-диметиламінопропіл)фенотіазину гідрохлорид ($\geq 98\%$ (TLC), CAS №: 69-09-0), Sigma-Aldrich (Сент-Луїс, Міссурі). Кофеїн фармацевтичної якості був наданий ПАТ НВП «Борщагівський ХФЗ», всі інші реагенти/хімікати найвищого аналітичного класу були придбані у Sigma-Aldrich (Сент-Луїс, Міссурі) або Synbias (Київ, Україна).

У ролі модельних організмів було обрано двостулкових молюсків двох видів: прісноводного *Unio tumidus* (Philipson, 1788) (*Unionidae*) та морського *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) (*Mytilidae*). Вибір зазначених біологічних моделей зумовлений їхньою високою чутливістю до впливу ксенобіотиків, а також важливою екологічною роллю у відповідних водних екосистемах (Oehlmann et al., 2003).

Експериментальна частина роботи складалася з трьох серій досліджень, у межах яких оцінювали токсикологічний вплив окремих та комбінованих чинників:

I серія – дослідження впливу мікропластику, кофеїну та хлорпромазину як окремих чинників, а також їх комбінації, на організм *U. tumidus*;

II серія – оцінка дії кофеїну, мікропластику та їхньої комбінації на організм *M. galloprovincialis*;

III серія – вивчення впливу хлорпромазину у двох концентраціях на організм *M. galloprovincialis*.

Для першої серії досліджень було зібрано 200 особин *U. tumidus* середньою довжиною мушлі $9,5 \pm 0,4$ см та масою тіла $65,7 \pm 9,1$ г. Відбір молюсків здійснювався у верхів'ї р. Серет (притока Дністра у середній течії, $49^{\circ}32'53.9''N$ $25^{\circ}34'45.1''E$), у регіоні, що раніше був охарактеризований як умовно чиста водойма (Falfushynska et al., 2009) (Рис. 2.1.1 А). Вилов молюсків

проводили траловим методом на глибині приблизно 1 м. Транспортування здійснювалося у 25-літрових ємностях з аерованою нативною водою. Адаптація молюсків тривала 7 діб у резервуарах із аерованою, дехлорованою та пом'якшеною водопровідною водою (температура – $18 \pm 1^\circ\text{C}$; вміст CaCO_3 – $86,8 \pm 1,0 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$; концентрація розчиненого кисню – $8,67 \pm 0,51 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$; рН – $7,3 \pm 0,2$; концентрація $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ та NO_2^- – $<0,1 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$). Годування молюсків здійснювали кожні дві доби (500 мг Tropical SuperVit Basic із β -1,3/1,6-глюканом).



Рис. 2.1.1 Географічне розташування місць відбору зразків. А - р. Серет (притока Дністра у середній течії, $49^\circ32'53.9''\text{N}$ $25^\circ34'45.1''\text{E}$); Б - комерційна ферма «Lago Faro» (Società FARAU SRL, Frutti di Mare, Messina, Італія)
Використані карти:

<https://gameo.org/index.php?title=File:Map-of-Ukraine-political-enwiki.jpg>,
<https://images.app.goo.gl/dD2DcCE5DEPzDJEe6>

По закінченню підготовчого етапу молюски були розподілені на п'ять груп: С-група (контрольна) – без впливу ксенобіотиків; МР-група – експозиція мікропластику (поліетилен, концентрація $1 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$, розмір частинок 35–50 мкм); Сaff-група – експозиція кофеїну фармацевтичного походження (концентрація $20,0 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$, що відповідає 0,11 нМ або $6,3 \times 10^{18}$ молекул); Срз-група – експозиція хлорпромазину (концентрація $12 \text{ нг}\cdot\text{л}^{-1}$, що відповідає 37 пМ); Міх-група – комбінація вищезазначених концентрацій мікропластику, кофеїну

та хлорпромазину. Тривалість експозиції становила 14 діб за температури 18°C. Для запобігання токсичному впливу продуктів метаболізму воду у резервуарах оновлювали кожні дві доби та поновлювали концентрації досліджуваних ксенобіотиків. По завершенні експозиційного періоду здійснювали забір травної залози для біохімічного аналізу.

Для другої та третьої серії експериментів було використано близько 240 особин *M. galloprovincialis* середньою довжиною мушлі $5,9 \pm 0,6$ см та масою тіла $15,3 \pm 3,8$ г. Відбір молюсків здійснювали на комерційній фермі «Lago Faro» (Società FARAU SRL, Frutti di Mare, Messina, Італія) (Рис. 2.1.1 Б). Адаптація молюсків до лабораторних умов тривала 14 діб у 25-літрових акваріумах із постійною аерацією та підтримкою стабільних фізико-хімічних параметрів води (солоність – $3,4 \pm 0,02\%$, рН – $7,6 \pm 0,01$, температура – $17 \pm 1^\circ\text{C}$).

По завершенні підготовчого етапу молюски другої серії експерименту були розділені на чотири групи: С-група – контроль (не зазнавали впливу ксенобіотиків); МР-група - мікропластик (поліетилен, постачальник Sigma Aldrich) концентрацією $1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$, розміром частинок від 35 до 50 мкм; Caff-група - кофеїн концентрацією $20,0 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$, що відповідає 0,11 нМ або $6,3 \times 10^{18}$ молекул; Міх-група - суміш вищезазначених концентрацій мікропластику та кофеїну. Експозиція тривала 14 діб.

Третя серія включала дослідження молюсків, які зазнавали впливу двох концентрацій хлорпромазину (Срз) протягом 14 діб: Срз I-група - $12 \text{ нг} \cdot \text{л}^{-1}$ (37 пМ); Срз II-група - $12 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$ або 37 нМ). Контрольна група молюсків (С) без додавання ксенобіотиків досліджувалися через той самий період інкубації.

Кожні дві доби здійснювали повну заміну води в експериментальних резервуарах, одночасно поновлюючи концентрації ксенобіотиків відповідно до експериментального дизайну. Після завершення експозиційного періоду молюсків вилучали та відбирали травну залозу для подальших біохімічних аналізів. Відібрані зразки заморожували при -80°C . Для кожної дослідної групи готували окремі зразки з восьми окремих особин для всіх аналізів, за

виключенням виділення металотіонеїнів та їх аналізу методом хроматографії, де відбирали об'єднані зразки з п'яти екземплярів групи та досліджували їх у чотирьох повторах кожний.

2.2 Методи визначення показників окисного стресу

2.2.1 Активність супероксиддисмутази

Активність супероксиддисмутази (SOD, КФ 1.15.1.1) визначали шляхом оцінки здатності ензиму інгібувати відновлення нітротетразолію синього (НТЗС) супероксид-аніонами, що генеруються в реакційній суміші. Метод базується на принципах, описаних Fried (1975), і дозволяє кількісно визначити загальну активність SOD, а також активність її ізоформ, Mn-SOD і Cu,Zn-SOD. Для аналізу використовували 10% гомогенат травної залози, приготований в 50 мМ калій-фосфатному буфері (рН 7,8). Гомогенат центрифугували при 10 000 об/хв протягом 10 хвилин при 4°C. Надосад отриманий після центрифугування, використовували для експерименту. Реакційна суміш містила 50 мМ калій-фосфатний буфер (рН 7,8), 30 мМ L-метіонін, 100 мкМ ЕДТА, 750 мкМ НТЗС, 20 мкМ рибофлавін та 50 мкл супернатант. Для забезпечення точності експерименту готували три типи контрольних зразків: холостий зразок, що містить всі компоненти, крім НТЗС і супернатанту, який не опромінювали. Контрольний зразок містить всі компоненти, крім НТЗС. Стандартна проба містить усі компоненти, крім супернатанту. Зразки були опромінені протягом 20 хв флуоресцентною лампою (400 люкс, 15 Вт) у спеціальному боксі, накритому алюмінієвою фольгою, після цього вимірювали оптичну густину зразків при 560 нм. Зразок, що не містив супернатанту та НТЗС використовували для корекції базового поглинання. Розрахунок активності SOD здійснювали за формулою, що базується на порівнянні оптичної густини стандартної проби ($D_{ст}$) та дослідного зразка ($D_{д}$) за вирахуванням фонового поглинання контролю ($D_{к}$). Кінцевий результат корегували відповідно до коефіцієнта розведення (d) та вмісту загального протеїну в пробі ($C_{прот}$).

Визначення активності Mn-SOD здійснювали шляхом інкубації зразків з 15% розчином ацетоціаногідрину при 0°C протягом 60 хвилин, що призводить

до інгібування активності Cu,Zn-SOD. Активність Cu,Zn-SOD обчислювали як різницю між загальною активністю SOD та активністю Mn-SOD. Результати виражають в одиницях активності ензиму на міліграм розчинного протеїну (у.о. · мг⁻¹ протеїну). За умовну одиницю активності SOD приймали ту кількість ензиму, яка необхідна для пригнічення реакції відновлення НТЗС на 50%

2.2.2 Активність каталази

Активність каталази (CAT, КФ 1.11.1.6) визначали спектрофотометричним методом, принцип якого полягає у вимірюванні зміни оптичної густини при розкладанні пероксиду водню каталазою (Aebi, 1974). Для аналізу використовували 10% гомогенат тканини травної залози в 50 мМ калій-фосфатному буфері (рН 7.0). Досліджувана суміш складалася з 50 мМ калій-фосфатного буферу (рН 7.0), 15 мМ H₂O₂, реакція ініціювалася додаванням 20 мкл супернатанту. Загальний об'єм досліджуваного зразка становив 3 мл. Вимірювали оптичну густину зразків при довжині хвилі 240 нм з інтервалом 60 с. Для розрахунку активності каталази використовували мілімолярний коефіцієнт екстинкції H₂O₂ ($\epsilon = 0,04 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$), який виражався в мкмоль · хв⁻¹ · мг⁻¹ протеїну.

2.2.3 Кількісна оцінка продуктів перекисного окиснення ліпідів та окисних модифікацій протеїнів

Для визначення продуктів окисного ушкодження макромолекул у тканинах використовували гомогенат. До 1 мл 10% гомогенату в 50 мМ калій-фосфатному буфері (рН 7,4) додавали 2 мл 20% сульфосаліцилової кислоти, після цього суміш піддавали центрифугуванню протягом 20 хвилин при 3500 об/хв та 4°C. Після центрифугування осад використовували для визначення протеїнових карбонілів (PC), а надосад використовували для аналізу продуктів перекисного окиснення ліпідів (TBARS). Кількісне визначення продуктів перекисного окиснення ліпідів визначали за утворенням ТБК-активних продуктів за методикою Ohkawa et al. (1979). Для цього до 2 мл вищезгаданого надосаду додавали 1,5 мл 0,7 мМ розчину 2-тіобарбітурової кислоти (ТБК) в 0,1 М HCl, після чого зразки нагрівали на водяній бані при

100°C протягом 20 хвилин. Оптичну густину утвореного комплексу вимірювали при 532 нм, для обчислень використовували молярний коефіцієнт екстинкції $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ та виражали в нмоль·г⁻¹.

Визначення карбонілів протеїнів, які є маркерами окиснення протеїнів, здійснювали з використанням 2,4-динітрофенілгідразину (ДНФГ), який утворює стабільні 2,4-динітрофенілгідразони з карбонільними групами (Reznick and Packer, 1994). Осад, отриманий з гомогенату, до якого додавали сульфосаліцилову кислоту, використовували для подальшої інкубації з 1 мл 0,1 М розчину ДНФГ у 2 М НСІ. Реакційну суміш інкубували при 37 °С протягом 1 години при періодичному струшуванні. Після завершення періоду інкубації зразки піддавали центрифугуванню, а потім тричі промивали 5% трихлороцтвою кислотою. Отриманий осад розчиняли у 8 М сечовині та кипятили на водяній бані при 100 °С до повного розчинення. Вимірювання поглинання утворених протеїнових карбонілів проводили при довжині хвилі 370 нм, обчислення проводили використовуючи молярний коефіцієнт екстинкції $22000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Результати виражали мкмоль·г⁻¹ тканини

2.3 Дослідження низькомолекулярних тілових сполук

2.3.1 Екстракція металотіонеїнів методом гель-розподільчої хроматографії

Для виділення металотіонеїнів (МТ) застосовували метод гель-розподільчої хроматографії, який ґрунтується на розподілі молекул за молекулярними масами відповідно до їхньої здатності проникати в пори гелеподібного матеріалу, що слугує нерухомою фазою хроматографічної колонки (Coyle et al., 2002; Roesijadi and Fowler, 1991). Для проведення аналізу готували 10% гомогенат тканини травної залози в 10 мМ Трис-НСІ буфері (рН 8,0), до якого додавали 10 мМ 2-меркаптоетанол для запобігання окисненню SH-груп і 0,1 мМ фенілметилсульфонілфториду (ФМСФ) для інгібування протеаз. Гомогенат готували з об'єднаних наважок травної залози восьми тварин. Після центрифугування зразок піддавали термообробці при 85°C протягом 5 хвилин, а потім повторно центрифугували для видалення

нерозчинних частинок. Отриманий супернатант, що містив термостабільні розчинні сполуки, піддавали гель-розподільчій хроматографії на колонці (30×1,5 см), заповненій Sephadex G-50. Хроматографічне розділення проводили в 0,01 М Трис-НСІ буфері (рН 8,0) за стабільної температури, яку підтримували за допомогою охолоджувального кожуха. Збирали 20 фракцій елюенту по 5 мл кожна (зі швидкістю 0,33 мл/хв). Для запобігання втрат зв'язаних металів до елюенту не додавали ЕДТА. Оптичну густину отриманих фракцій вимірювали при D254 та D280 (Roesijadi and Fowler, 1991). Хроматографічну колонку калібрували за допомогою стандартних протеїнових маркерів із відомими молекулярними масами: сироваткового альбуміну (66,0 кДа), хімотрипсину (25,8 кДа), цитохрому С (12,3 кДа) та інсуліну (5,8 кДа) (маркери фірми «Sigma-Aldrich»). Металотіонеїни ідентифікували на основі їхнього характерного світлопоглинання, зокрема за фракціями, що демонстрували найвищі значення співвідношення D254/D280, специфічного для низькомолекулярних термостабільних протеїнів. Дві фракції, які містили металотіонеїни об'єднували для подальшого визначення концентрації цинку у металотіонеїнах.

2.3.2 Кількісне визначення тіолових груп у складі металотіонеїнів

Щоб визначити загальний вміст металотіонеїнів у травній залозі використовували методику, що базується на визначенні концентрації тіолових (SH-) груп за методом Viarengo et al. (1999). Принцип методу полягає у взаємодії SH-груп з реактивом Елмана, в результаті чого утворюється забарвлений продукт – 5-тіо-2-нітробензойна кислота. Для аналізу готували 30% гомогенат тканин у 20 мМ трис-сахарозному буфері (рН 8,6), до якого додавали суміш інгібіторів протеаз (0,5 мМ ФМСФ і 6 мкМ лейпептину) для запобігання деградації протеїнів, а також 0,01% β-меркаптоетанолу для підтримання відновленого стану тіолових груп. Отримані зразки центрифугували при 12000 об/хв і температурі 4°C, 45 хв, використовували супернатант. МТ екстрагували охолодженою сумішшю етанолу та хлороформу. Після додавання екстрагенту зразки повторно центрифугували для

відокремлення протеїнової фракції, що містить МТ. Концентрацію тіолових груп у зразках визначали спектрофотометрично за оптичною густиною розчину при довжині хвилі 412 нм. Розрахунки проводили з використанням молярного коефіцієнта екстинкції 5-тіо-2-нітробензоату ($\epsilon = 14150 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) та молекулярних характеристик металотіонеїну *U. tumidus*. Відповідно до даних UniProt (<https://www.uniprot.org/uniprot/A4UHT8>), протеїнова молекула містить 21 залишок цистеїну та має молекулярну масу 7,090 Да. Для визначення концентрації металовмісних металотіонеїнів (МТ-Ме) визначали вміст цинку, які утворюють метал-тіолатні кластери зі сульфгідрильними групами МТ у певних стехіометричних співвідношеннях. Розрахунок здійснювали за модифікованим рівнянням Гамільтона, яке враховує співвідношення між металами та молекулами МТ: $C(\text{МТ-Ме}) = M(\text{МТ}) [v(\text{Zn})/7 + v(\text{Cu})/12 + v(\text{Cd})/7]$, де v – кількість зв'язаного металу (мкмоль·г⁻¹ тканини), $M(\text{МТ})$ – молярна маса металотіонеїнів (7000 мкг·мкмоль). При повному насиченні одна молекула МТ зв'язує 7 йонів $\text{Zn}^{2+}/\text{Cd}^{2+}$ або 12 йонів Cu^+ . Отримані результати виражали у нмоль·г⁻¹ тканини (Nielson and Winge, 1985).

2.3.3 Визначення концентрації металів у складі металотіонеїнів та тканині

Концентрацію цинку (Zn) визначали у тканині травної залози та в об'єднаному елюаті (10 мл), що містив МТ, виділені методом гель-розподільчої хроматографії. Метод базувався на спектрофотометричному аналізі комплексу Zn(II) з 2-(5-бром-2-піридилазо)-5-[N-пропіл-N-(3-сульфопропіл)аміно]фенолом (5-Br-PAPS) (Karaman and Menek, 2012; Wang et al., 2018). Значення рН підтримували в межах 5–11, оскільки такі умови запобігають розкладанню 5-Br-PAPS у кислому середовищі. Відібрані зразки тканини (100 мг) або елюат (10 мл) висушували при 105°C, після чого розчиняли у нітратній кислоті та випарювали до отримання золи. Осад розчиняли в 1% розчині ТХО, після чого додавали 5-Br-PAPS у кінцевій концентрації 36 нМ, розчинений у 200 мМ бікарбонатному буфері (рН 9,8), та інкубували протягом 30 хвилин при 20°C. Оптичну густина комплексів Zn(II)-5-Br-PAPS реєстрували при 550 нм, а

концентрацію цинку визначали за калібрувальною кривою. Іони Fe та Cu селективно зв'язували додаванням саліцилальдоксиму, та цитрату натрію. Отримані результати виражали у нмоль·г⁻¹ тканини.

Концентрацію міді (Cu) у тканині травної залози визначали спектрофотометрично за методом Peterson and Boiler (1955) із використанням реагентного набору Copper Test 1.14767 (Merck Millipore, «Sigma-Aldrich»). Для вивільнення зв'язаного Cu та окиснення Cu(I) у Cu(II) зразки тканини гомогенізували у 2Н НСl у співвідношенні 1:2 (мас./об.), після чого додавали рівний об'єм 20% трихлороцтової кислоти. Значення рН доводили до 8,0 за допомогою концентрованого NH₄OH. У підготовані проби додавали Copper Test відповідно до інструкції виробника та витримували 5 хвилин для стабілізації забарвлення. Оптичну густина вимірювали при 600 нм, а концентрацію Cu розраховували за допомогою молярного коефіцієнта екстинкції 16 000 М⁻¹·см⁻¹ (Marczenko and Balcerzak, 2000). Отримані результати виражали у нмоль·г⁻¹ тканини.

2.3.4 Визначення вмісту глутатіону та його редокс-індексу у тканинах

Загальну концентрацію глутатіону (GSH total), що включає відновлену (GSH) та окиснену (GSSG) форми, визначали спектрофотометрично за методом, що ґрунтується на взаємодії реактиву Елмана з тіоловими групами. Використовували глутатіонредуктазу, яка за участі NADPH відновлює GSSG до GSH (Griffith, 1980).

Для отримання безпротеїнового екстракту 20% (мас./об.) гомогенат тканини змішували з 0,1 М калій-фосфатним буфером (рН 7,4), до якого додавали 1 мМ ЕДТА, 100 мМ КСl та 0,1 мМ ФМСФ, а також сульфосаліцилову кислоту у співвідношенні 1:3. Отриману суміш центрифугували при 3000 об/хв за температури 4°C протягом 5 хвилин. До 2,3 мл 0,4 М Трис-НСl буфера (рН 8,9), що містив 1 мМ реактив Елмана і 200 мкМ β-NADPH, додавали 0,2 мл супернатанту. Після ретельного змішування зразки інкубували при 30°C протягом 5 хвилин. Реакцію ініціювали додаванням глутатіонредуктази (50 од./мл, 38 мкл), і швидкість утворення 5-тіонітробензойної кислоти вимірювали

спектрофотометрично при 412 нм кожні 30 секунд протягом 2 хвилин. Вміст GSH розраховували за калібрувальною кривою та виражали в $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ тканини.

Для визначення концентрації GSSG 0,6 мл депротейнізованого зразка інкубували з 2-вінілпіридином у кінцевій концентрації 2% протягом 1 години перед аналізом. Концентрацію GSSG, виражену в еквівалентах GSH, визначали за калібрувальною кривою. Редокс-індекс глутатіону (RI GSH) розраховували як відношення концентрацій GSH до GSSG

2.4 Визначення концентрації нікотинамідних коензимів

Для визначення вмісту NADH і NAD^+ у тканині травної залози застосовували методику, описану Yang et al. (2015). Гомогенізацію зразків проводили у 0,1 М HCl для визначення NAD^+ та у 0,1 М NaOH для визначення NADH. Після цього зразки піддавали термічній обробці: нагрівали, охолоджували та центрифугували при 10000 об/хв. Отримані супернатанти нейтралізували та повторно центрифугували за аналогічних умов. Визначення концентрації NADH та NAD^+ здійснювали на основі ензиматичного циклу, модифікованого Lowry et al. (1961) і Zhu et al. (2012). Метод ґрунтується на окисненні етанолу до ацетальдегіду під дією алкогольдегідрогенази, у ході якого NAD^+ відновлюється до NADH. Утворений NADH переносить електрони до 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолію броміду у присутності феназинетасульфату, що спричиняє формування фіолетового формазанового продукту. Концентрацію формазану визначали спектрофотометрично при 570 нм, використовуючи молярний коефіцієнт поглинання $13\ 000\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Результати виражали у $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ тканини.

2.5 Маркери цитотоксичності

2.5.1 Визначення стабільності лізосомальних мембран

Стабільність лізосомальних мембран (NRR тест) клітин травної залози оцінювали за здатністю лізосом живих клітин утримувати катіонний барвник нейтральний червоний (НЧ), згідно з методом, описаним El Naj et al. (2019). Для цього 30 мг тканини травної залози інкубували протягом 1 години в розчині НЧ

(0,04%, рН 7,3–7,4) для захоплення барвника клітинами. Після інкубації зразки центрифугували при 500 об/хв протягом 10 хвилин при температурі 4°C, після чого тричі промивали розчином Рінгера для видалення залишкового барвника, центрифугували після кожного промивання (500 об/хв, 10 хв). Зразки фіксували в розчині формальдегіду (0,5 % в 1 % CaCl₂) та інкубували в холодильнику протягом 1 години. Після цього супернатант декантували. Екстракцію барвника здійснювали розчином 1% оцтової кислоти та 50% етанолу, витримуючи зразки 1,5 години при кімнатній температурі. Світлопоглинання вимірювали при 550 нм, використовуючи розчин для екстракції як контроль. При обробці тканин ушкоджені мембрани лізосом руйнуються, що призводить до виходу барвника, тоді як інтактні лізосоми продовжують його утримувати. Таким чином, зниження рівня поглинання та утримання барвника свідчить про дестабілізацію лізосомальних мембран. Результати виражали у розрахунку на грам тканини.

2.5.2 Визначення активності каспази-3

Для визначення активності каспази-3 (Cas-3, КФ 3.4.22.56) використовували метод, описаний Kaushal et al. (2014), який ґрунтується на ензиматичному розщепленні тетрапептиду ацетил-Асп-Глу-Вал-Асп-п-нітроаніліду, що призводить до утворення забарвленого продукту — п-нітроаніліну. Для визначення активності ензиму використовували гомогенати травної залози у співвідношенні 1:3 (мас./об.) з лізуючим буфером, що містив 4% Тритон Х-100, 5 мМ дитіотреїтолу, 150 мМ NaCl, 5 мМ ЕДТА та 1 мМ ФМСФ. Зразки інкубували протягом 10 хв на льоду, після чого центрифугували протягом 10 хв при 12 000 об/хв. До супернатанту додавали 50 мкл буферу та 10 мкл 2 мМ розчину синтетичного субстрату ацетил-Асп-Глу-Вал-Асп-п-нітроаніліду («Sigma-Aldrich»), інкубували протягом 2 год при 37°C. Інтенсивність поглинання п-нітроаніліну визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 405 нм. Утворення п-нітроаніліну є прямо пропорційним гідролізу субстрату. Активність каспази-3 обчислювали, використовуючи мілімолярний коефіцієнт екстинкції 10,5 мМ⁻¹·см⁻¹, та виражали в пмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ протеїну (Du et al., 1997)

2.6 Показники системи біотрансформації ксенобіотиків

2.6.1 Визначення цитохром Р450 залежної активності

Активність системи мікосомального окиснення (I фаза біотрансформації) оцінювали за активністю етоксирезорурфін-О-деетилази (EROD), що є маркерним ензимом цитохром Р450 (СYP)-залежного монооксигеназного комплексу. Методика базується на спектрофотометричному визначенні активності ензиматичного деетилювання 7-етоксирезорурфіну (Klotz et al., 1984). Для проведення аналізу зразки тканини гомогенізували в 0,1 М фосфатному буфері (рН 7,4), що містив 100 мМ КСl, 1 мМ ЕДТА та 0,1 мМ ФМСФ. Отриманий гомогенат центрифугували при 6000 об/хв протягом 10 хвилин, після чого відбирали супернатант. Для забезпечення точності аналізу використовували свіжоприготований розчин 7-етоксирезорурфіну, який розчиняли в нагрітому метанолі, після чого охолоджували, фільтрували та доводили кінцеву концентрацію до 100 мкМ. Якість робочого розчину контролювали спектрофотометрично, вимірюючи його оптичну густину при 482 нм, використовуючи молярний коефіцієнт екстинкції $22,5 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Реакційну суміш готували шляхом змішування 2,2 мл 0,1 М Трис-НСl буфера (рН 8,0), що містив 0,1 М NaCl, 2 мкМ 7-етоксирезорурфіну та 5–150 мкг мікосомального протеїну, доводячи загальний об'єм до 2,5 мл. Для ініціації реакції додавали 0,25 мл 5 мМ розчину NADPH. Інкубацію проводили у водяній бані при 25°C, реєструючи утворення резорурфіну спектрофотометрично при 572 нм. Активність EROD обчислювали на основі мілімолярного коефіцієнта екстинкції $73,2 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, а отримані результати виражали у нмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ протеїну.

2.6.2 Активність глутатіон-S-трансферази

Активність ензиму II фази біотрансформації ксенобіотиків (GST, КФ 2.5.1.18), визначали спектрофотометрично, використовуючи 1-хлоро-2,4-динітробензол (CDNB) як субстрат. Принцип методу ґрунтувався на кон'югації CDNB і GSH з утворенням комплексу S-2,4-динітрофенілглутатіону (Habig et al., 1974), що супроводжувалося зміною оптичної густини при 340 нм. Для проведення аналізу реакційну суміш готували, змішуючи 2,1 мл 100 мМ

Трис-НСІ буфера (рН 7,4), 0,1 мл 1 мМ розчину GSH та 0,05 мл супернатанту. Реакцію ініціювали додаванням 0,1 мл 1 мМ CDNB, розчиненого в етанолі. Інкубували при кімнатній температурі, фіксуючи збільшення оптичної густини при 340 нм протягом 2 хвилин. Як контрольну пробу використовували реакційну суміш без додавання супернатанту, яку замінювали відповідним об'ємом буфера. Активність GST розраховували за допомогою молярного коефіцієнта екстинкції комплексу ($9,6 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) та виражали в $\text{нмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ протеїну.

2.7 Визначення вмісту протеїну

Для кількісного визначення вмісту протеїну у тканині та перерахунку активності ензимів у розчинній фазі гомогенату використовували метод Lowry et al. (1951). Цей метод ґрунтується на здатності іонів купруму, зв'язаних із протеїнами, відновлювати реактив Фоліна, утворюючи інтенсивно забарвлені продукти, концентрація яких є пропорційною вмісту протеїну в зразку. Для аналізу у пробірку додають 0,01 мл супернатанту та 0,99 мл дистильованої води. До отриманої суміші вносять 4 мл лужного розчину міді, який готують шляхом змішування 50 мл 2% розчину карбонату натрію (реактив «А») із 0,1 Н розчином їдкою натру та 1 мл 0,5% розчину сульфату міді у 1% розчині тартрату натрію-калію (реактив «В»). Суміш інкубують протягом 10 хвилин, що сприяє відновленню міді в комплексах із протеїнами. Після цього додають 0,4 мл розведеного реактиву Фоліна (реактив «Е»), комерційно доступного від компанії Sigma-Aldrich. Інкубують протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. Оптичну густину зразків вимірювали при довжині хвилі 750 нм. Для розрахунків використовували калібрувальну криву, побудовану на основі стандартного зразка альбуміну бичачої сироватки. Отримані результати виражають у $\text{мг}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}$ тканини.

2.8 Статистична обробка даних

Представлення отриманих результатів у тексті дисертації та графічному матеріалі виконано у вигляді середнього арифметичного значення (M) \pm стандартного відхилення (SD). Обсяг вибірки становив 8 зразків, за винятком

визначення вмісту Zn в МТ, здійснювали чотири повторності. Характер розподілу показників у досліджуваних групах оцінювали за критерієм Шапіро–Вілка. Порівняльний аналіз середніх значень здійснювали за допомогою t-тесту Стьюдента для незалежних вибірок визначаючи статистичну значущість при $p < 0,05$. Відмінності між групами вважали достовірними при цьому рівні значущості. Наявність та характер взаємозалежностей між досліджуваними біохімічними показниками встановлювали за допомогою кореляційного аналізу, використовуючи коефіцієнт кореляції Пірсона (r) зі статистичною значимістю на рівнях $p < 0,05$ та $p < 0,01$. Додатково здійснювали аналіз головних компонент (РСА) для виявлення взаємозв'язків між досліджуваними показниками, застосовуючи метод Varimax із нормалізацією Кайзера. Для диференціації експонованих груп за сукупністю визначених параметрів використовували канонічний дискримінантний аналіз. Для перевірки адекватності факторного аналізу розраховували коефіцієнт КМО та застосовували критерій сферичності Бартлетта. Обробку отриманих даних виконували за допомогою програмного забезпечення IBM SPSS Statistics (версія 24 для Windows). Графічні матеріали були візуалізовані за допомогою GraphPad Prism 6.

РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Окисно-відновний гомеостаз і видоспецифічні особливості антиоксидантної відповіді у двостулкових молюсків

Біохімічна відповідь організмів на забруднення, як правило, починається з порушення клітинного гомеостазу, зумовленого надмірним утворенням активних форм кисню (АФК). Це призводить до зміни окисно-відновного статусу клітини — балансу між окисними та відновними реакціями, що забезпечує нормальне функціонування клітинних процесів (Sies et al., 2017). Така зміна визначається як окисний або відновний стрес.

Окисний стрес виникає тоді, коли стаціонарна концентрація АФК тимчасово або хронічно перевищує нормальний рівень, що призводить до порушення клітинного метаболізму, регуляції та пошкодження клітинних компонентів. Формування окисного стресу є універсальним механізмом токсичної дії забруднювачів, таких як важкі метали, поліциклічні ароматичні вуглеводні та пестициди, особливо у водних організмів. У свою чергу, відновний стрес визначають аналогічно, з тією лише різницею, що стаціонарна концентрація АФК знижується нижче фізіологічного рівня (Aliko et al., 2019; Benedetti et al., 2022; Silvestre, 2020).

Надлишок АФК спричиняє ушкодження клітинних структур, дисбаланс метаболічної регуляції та порушення гомеостазу, що призводить до активації антиоксидантної відповіді. Така відповідь включає експресію захисних генів та посилення активності ензимів першої лінії антиоксидантного захисту. Антиоксидантна система відіграє провідну роль у знешкодженні надмірних кількостей АФК, і її стан вважається раннім індикатором клітинної відповіді на токсичну дію забруднювачів (Stoliar and Lushchak, 2012).

3.1.1 Функціонування системи антиоксидантного захисту *U. tumidus* в умовах дії психоактивних препаратів і мікропластику

Оцінка активності антиоксидантних ензимів показала, що загальна активність супероксиддисмутази (SOD total) достовірно підвищувалася лише за впливу мікропластику і не зазнавала статистично значущих змін порівняно з

контролем за інших варіантів експозиції (Рис. 3.1.1.1 А). Mn-SOD була домінуючою ізоформою супероксиддисмутази у всіх досліджуваних групах. Такий розподіл пояснюється мітохондріальною локалізацією Mn-SOD — головного джерела генерації АФК (Zhang et al., 2020). Mn-SOD каталізує дисмутацію супероксид-аніону ($O_2^{\bullet-}$) у матриксі мітохондрій, що забезпечує захист біомембран від перекисного окиснення та збереження цілісності ДНК.

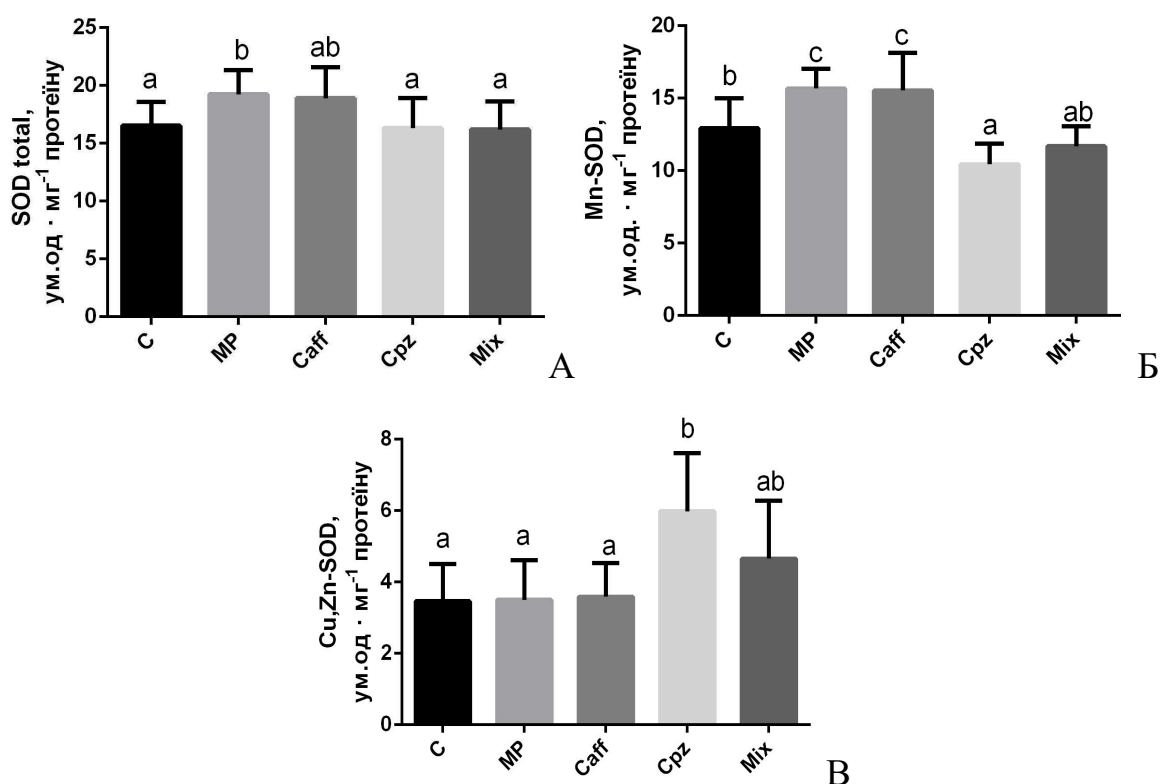


Рис. 3.1.1.1 Активність ізоформ супероксиддисмутази у травній залозі *U. tumidus* після 14-денної експозиції до мікропластику (MP), кофеїну (Caff), хлорпромазину (Cpz) та їх суміші (Mix): А — загальна активність супероксиддисмутази (SOD total); Б — мітохондріальна Mn-SOD; В — цитозольна Cu,Zn-SOD. $M \pm SD$, $n=8$.

Примітка: Тут і далі: різні літери над колонками вказують на наявність достовірних відмінностей між варіантами дослідження, $P < 0,05$.

Підвищення активності Mn-SOD у групах MP та Caff відображає активацію мітохондріального антиоксидантного механізму у відповідь на накопичення АФК. Натомість Cpz пригнічував активність Mn-SOD, а комбінований вплив частково згладжував ці протилежні ефекти, що вказує на

можливість взаємокомпенсації токсичних механізмів (Рис. 3.1.1.1 Б). У свою чергу, активність Cu,Zn-SOD залишалася відносно стабільною, проте під впливом Crz спостерігалась її активація (Рис. 3.1.1.1 В). Cu,Zn-SOD локалізована переважно у цитоплазмі та міжмембранному просторі мітохондрій. Її активація може свідчити про компенсаторну відповідь клітини на зниження функціональної активності мітохондріальної ізоформи (Mn-SOD), спрямовану на нейтралізацію супероксидних радикалів, що проникають у цитозоль (Birben et al., 2012).

Активність каталази знижувалася виключно під впливом хлорпромазину, тоді як у групах, що зазнавали дії мікропластику, кофеїну та їх суміші, вона залишалася на рівні контролю (Рис. 3.1.1.2). Така специфічна чутливість каталази до Crz, ймовірно, пов'язана з порушенням клітинної антиоксидантної рівноваги. Дослідження на рибах *Clarias gariepinus* демонструють, що Crz у концентраціях мкг–мг·л⁻¹ достовірно знижує активність як CAT, так і SOD, що свідчить про пригнічення ензиматичної ланки антиоксидантного захисту (Atama et al., 2022). Аналогічні порушення, зокрема коливання активності антиоксидантних ензимів, задокументовані й у інших дослідженнях на водних хребетних (Li et al., 2008).

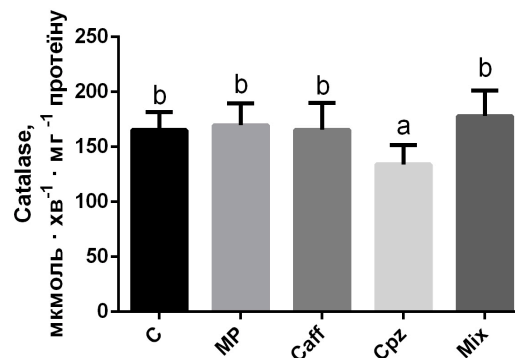


Рис. 3.1.1.2 Активність каталази у травній залозі *U. tumidus* після 14-денної експозиції до мікропластику (MP), кофеїну (Caff), хлорпромазину (Crz) та їх суміші (Mix), $M \pm SD$, $n=8$.

Утворення продуктів перекисного окиснення ліпідів (TBARS) є одним із найчутливіших показників окисного стресу у водних організмів (Regoli and Giuliani, 2014). Підвищення рівня TBARS є ключовим наслідком токсичної дії

багатьох хімічних агентів у водному середовищі і широко використовується як один із основних біомаркерів у екотоксикологічних дослідженнях (Hook et al., 2014). Окрім ушкодження ліпідів, АФК сприяють утворенню окисних модифікацій протеїнів, які включають карбонілювання амінокислотних залишків, що в результаті призводить до порушення функцій протеїнів, їхньої просторової будови, що негативно впливає на клітинний метаболізм і гомеостаз (Hook et al., 2014; Regoli and Giuliani, 2014).

Отримані результати свідчать, що рівні TBARS і PC були підвищені у всіх експозиційних групах, за винятком комбінованого впливу, де вміст карбонілів був нижчим за контрольні значення (Рис. 3.1.1.3 А, Б). Цей ефект може свідчити про зміну механізму ушкодження протеїнів або про модифіковану клітинну відповідь у разі дії суміші забруднювачів.

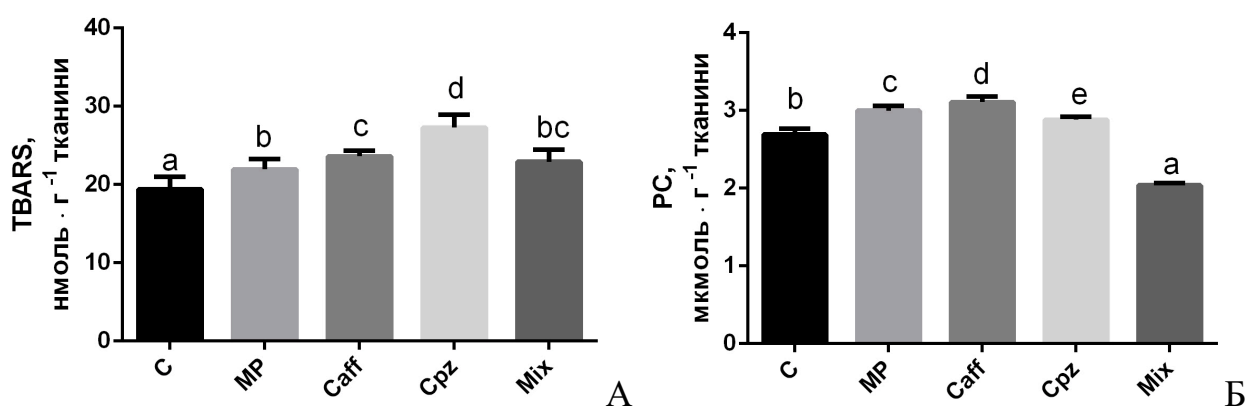


Рис. 3.1.1.3 Параметри окисного пошкодження макромолекул у травній залозі *U. tumidus* після 14-денної експозиції до мікропластику (MP), кофеїну (Caff), хлорпромазину (Cpz) та їх суміші (Mix): А – ТБК-активні продукти (TBARS); Б – карбоніли протеїнів (PC), $M \pm SD$, $n=8$.

Відтак, окисні пошкодження не супроводжувалися значними змінами активності антиоксидантних ензимів, що може свідчити про залучення альтернативних захисних механізмів - редокс-активних тіолів, зокрема глутатіону та металотіонеїнів (Stoliar and Lushchak, 2012).

3.1.2. Характеристика низькомолекулярних тіолів та відновних коензимів у травній залозі *U. tumidus* за впливу на організм мікропластику, кофеїну та хлорпромазину

Глутатионова система є центральною ланкою клітинного редокс-гомеостазу, забезпечуючи неензиматичний захист від окисних ушкоджень. Відновлена форма трипептиду - GSH виконує функцію основного низькомолекулярного антиоксиданту, здатного безпосередньо нейтралізувати реактивні АФК, зокрема гідроксильний радикал, супероксид-аніон та перекис водню. При цьому GSH окиснюється до дисульфідної форми - GSSG, яка відновлюється назад до GSH під дією глутатіонредуктази. GSH виступає коензимом у численних реакціях відновлення, зокрема у процесах за участю глутатіонпероксидази та глутатіон-S-трансферази, а також забезпечує відновлення протеїнових тіолів після окиснення (Lushchak, 2012). Співвідношення GSH/GSSG розглядається як інформативний індекс клітинного окисного стану — його зниження вказує на стресову активацію редокс-систем (Ellgaard et al., 2018; Xiao and Loscalzo, 2020).

За результатами дослідження концентрація GSH була достовірно підвищена у всіх експозиційних групах, найбільш виражено — у групі MP (зростання на 55 % порівняно з контролем) (Рис. 3.1.2.1 А). Водночас у групах MP та Caff спостерігалось підвищення рівня GSSG (Рис. 3.1.2.1 Б), що призвело до зниження співвідношення GSH/GSSG у групі Caff (Рис. 3.1.2.1 В). Натомість у групах Crz і Міх цей показник збільшився, що може свідчити про активацію компенсаторних механізмів редокс-захисту. Подібна динаміка глутатионових біомаркерів зафіксована і в інших дослідженнях на водних безхребетних. Зокрема, у *Dreissena polymorpha* вплив кофеїну та мікропластику спричиняв підвищення рівня GSH та/або зростання редокс-індексу, що відображає стресову активацію глутатіон-залежного захисту навіть при комбінованій дії чинників (Matskiv and Stoliar, 2023; Matskiv et al., 2024).

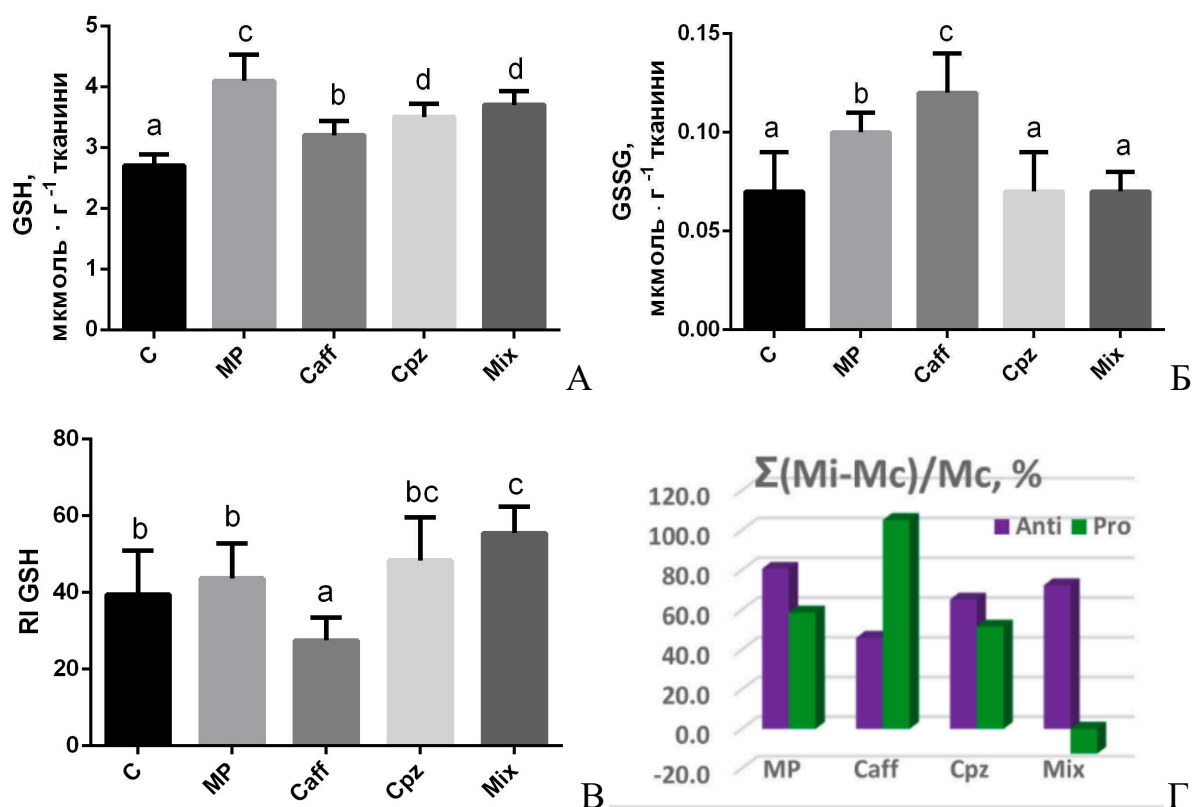


Рис. 3.1.2.1 Вміст глутатіону у травній залозі *U. tumidus* після 14-денної експозиції до мікропластику (MP), кофеїну (Caff), хлорпромазину (Cpz) та їх суміші (Mix): А — відновлена форма глутатіону (GSH); Б — окиснена форма (GSSG); В — редокс-індекс глутатіону (RI GSH); Г — антиоксидантно-прооксидантний баланс (АПБ), $M \pm SD$, $n=8$.

Для комплексної оцінки реакції системи антиоксидантного захисту на токсичне навантаження було розраховано антиоксидантно-прооксидантний баланс (АПБ) (Рис. 3.1.2.1 Г). Цей індекс відображає зсув рівноваги між сумою показників антиоксидантного захисту (Mn-SOD, Cu,Zn-SOD, CAT, GSH) та прооксидантних проявів (TBARS, PC, GSSG). Розрахунок базувався на стандартизованих відхиленнях кожного показника у дослідних групах відносно контролю за формулою: $A = 100 \times (M_i - M_c) / M_c$, де M_i — середнє значення у дослідній групі, M_c — у контролі. Інтегральний індекс АПБ визначали як різницю між сумою відсоткових змін антиоксидантних і прооксидантних маркерів (Broeg and Lehtonen, 2006). Позитивні значення АПБ у групах MP (22,1%), Cpz (13,6%) та Mix (84,8%) свідчать про переважання антиоксидантного захисту над окисним ушкодженням, тоді як негативне

значення у групі Caff (–59,2 %) вказує на домінування прооксидантної активності. Найвищий компенсаторний потенціал зафіксовано при комбінованій дії чинників, а найбільший прооксидантний зсув — при впливі кофеїну. Ці дані узагальнюють індивідуальні біомаркери та підтверджують наявність суттєвих відмінностей у редокс-відповіді організму залежно від природи чинників.

Важливою складовою цієї відповіді є також зміна вмісту специфічних термостабільних протеїнів. Результати елюції термостабільних протеїнів (Рис. 3.1.2.2) підтверджують наявність піку з молекулярною масою, що відповідає металотіонеїнам (Рис. 3.1.2.2 А), та типовим для цих протеїнів УФ-спектром поглинання (Рис. 3.1.2.2 Б), що свідчить про присутність метало-тіолатних кластерів.

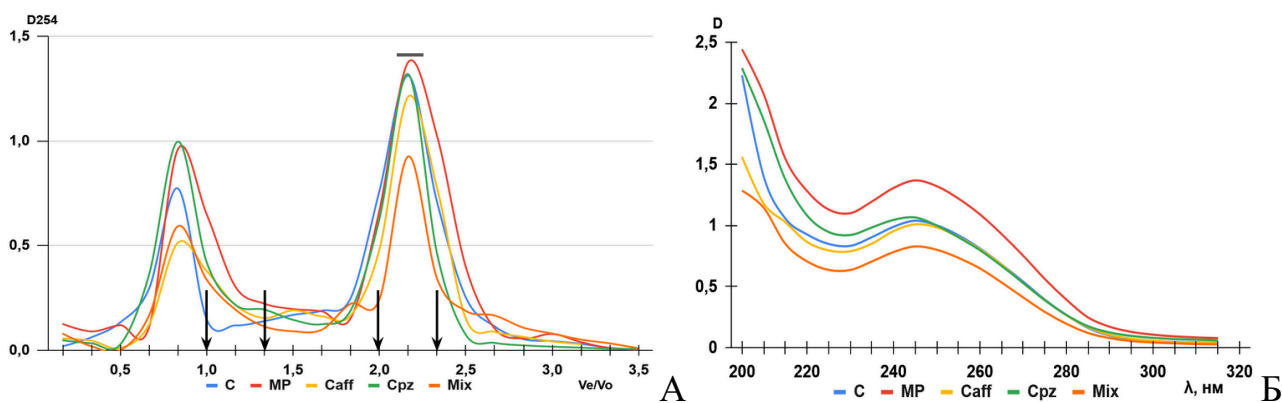


Рис. 3.1.2.2 Хроматографічні профілі елюції (А) та УФ-спектри (Б) термостабільних протеїнів травної залози *U. tumidus* за умов експозиції до мікропластику (MP), кофеїну (Caff), хлорпромазину (Cpz) та їх суміші (Mix).

Примітка: стрілками (А) позначено об'єми 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; пік, що містить металотіонеїни, виділено горизонтальною лінією.

Металотіонеїни, як і глутатіон, належать до групи низькомолекулярних тіолових сполук, які мають критичне значення для захисту клітин від окисного стресу. Вони володіють високою здатністю зв'язувати важкі метали та підтримувати редокс-баланс. У ході дослідження було виявлено зростання

загального рівня MT-SH у тканинах травної залози *U. tumidus* (Рис. 3.1.2.3 А). При цьому концентрація металованої форми Zn-MT залишалася стабільною або навіть знижувалася, особливо в групі Caff (Рис. 3.1.2.3 Б). Було встановлено зміни фракційного складу металотіонеїнів за впливу кофеїну. Попри подібне до інших груп зростання загального пулу MT-SH, саме кофеїн спровокував найбільш виражену деметалізацію протеїну. Це призвело до формування найвищого рівня вільних апо-форм (апо-MT) на фоні зниження вмісту цинк-асоційованих фракцій (Рис. 3.1.2.3 В). Такий ефект свідчить про специфічний вплив Caff на стабільність металотіолатних кластерів та мобілізацію внутрішньоклітинного цинку.

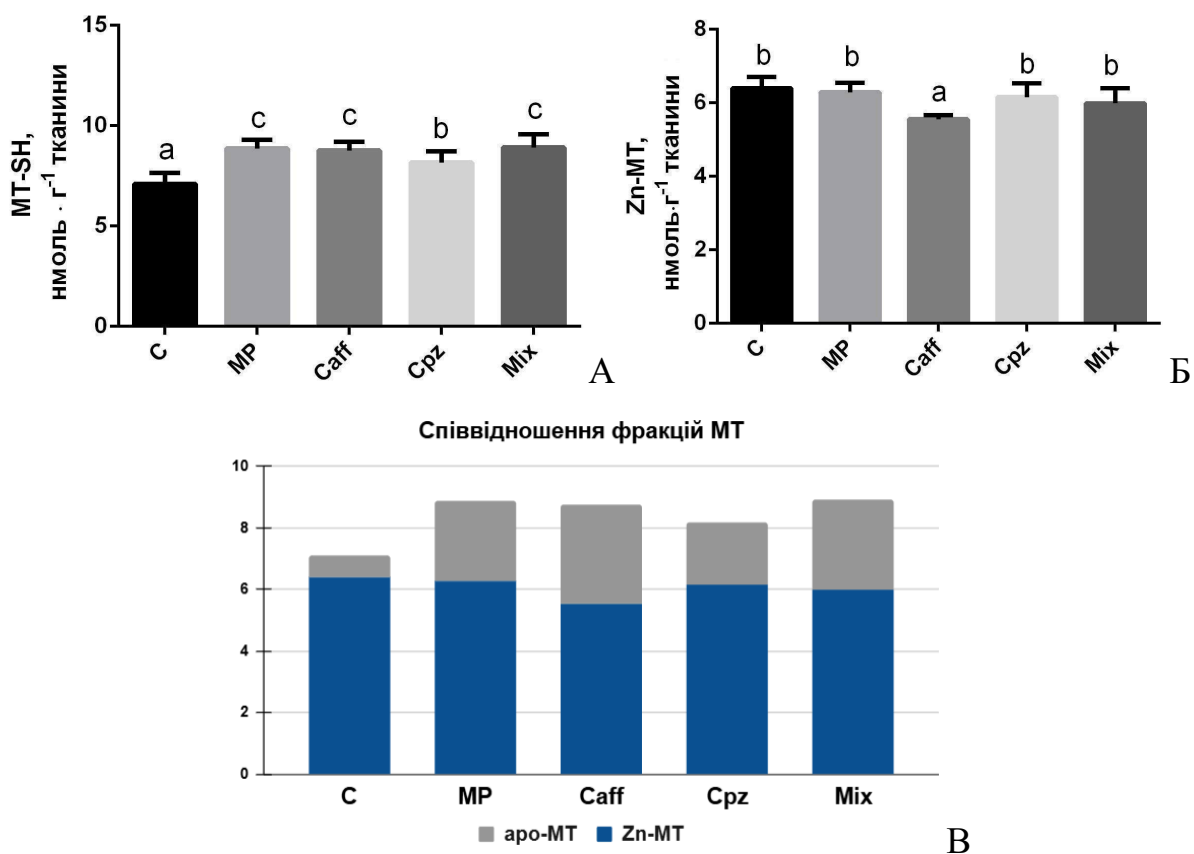


Рис. 3.1.2.3 Вміст металотіонеїнів у травній залозі *U. tumidus* після 14-денної експозиції до мікропластику (MP), кофеїну (Caff), хлорпромазину (Spz) та їх суміші (Mix): А — загальний вміст металотіонеїнів (MT-SH); Б — вміст металованої форми (Zn-MT); В — співвідношення фракцій MT в складі MT-SH, $M \pm SD$, $n=8$.

Таким чином найістотніші зрушення редокс-балансу зафіксовані саме на рівні металотіонеїнової системи. Незважаючи на те, що вміст MT-SH у травній залозі *U. tumidus* приблизно у 20 разів нижчий, ніж глутатіону, ці низькомолекулярні тіолвмісні протеїни, що містять до 21 залишку цистеїну на молекулу відіграють ключову роль у підтриманні клітинного гомеостазу (Gnatyshyna et al., 2020; Khoma et al., 2020a,b; Khoma et al., 2021; Krężel and Maret, 2017; Martyniuk et al., 2022b; Mosna et al., 2023). Підвищення рівня GSH, що супроводжувало вплив ксенобіотиків, може додатково підтримувати відновлений стан апо-MT, критично важливий для його ефективного функціонування як редокс-буфера (Xiao and Loscalzo, 2020).

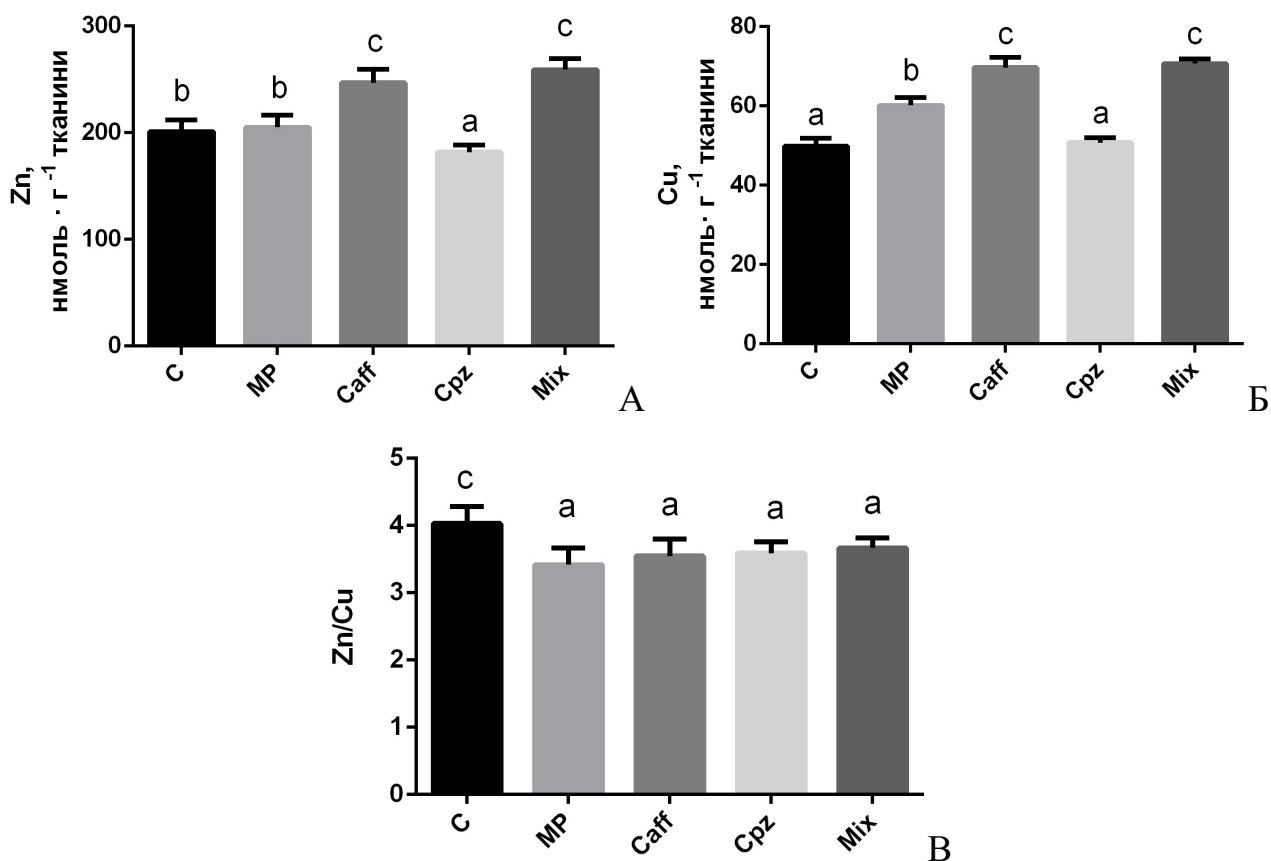


Рис. 3.1.2.4 Вміст металів у травній залозі *U. tumidus* після 14-денної експозиції до мікропластику (MP), кофеїну (Caff), хлорпромазину (Cpz) та їх суміші (Mix): А — цинку (Zn); Б — купруму (Cu); В — співвідношення Zn/Cu, $M \pm SD$, $n=8$.

У нашому дослідженні концентрація Cu у травній залозі достовірно зростала у всіх групах, окрім Cpz (Рис. 3.1.2.4 Б). Рівень Zn варіював,

знижувався у групі Crz, але підвищувався у групах Caff та Міх (Рис. 3.1.2.4 А). Відповідно, співвідношення Zn/Cu, знижувалося у всіх експозиційних групах порівняно з контролем (з 4,0 до 3,6) (Рис. 3.1.2.4 В).

Активація металотіонеїнової системи супроводжувалася значними змінами у вмісті зв'язаних з нею металів — цинку та купруму, які мають вирішальне значення для клітинного метаболізму. Відомо, що Zn^{2+} є основним фізіологічним лігандом металотіонеїнів, регулює стабільність і експресію цих протеїнів, тоді як Cu^{2+} здатний заміщувати Zn^{2+} у зв'язувальних сайтах, порушуючи функціональну цілісність МТ (Krežel and Maret, 2017).

Співвідношення $NADH/NAD^{+}$ є фундаментальним показником цитозольного редокс-стану та енергетичного статусу клітин (Müller et al., 2012). У тканині травної залози *U. tumidus* обидва коензими виявилися чутливими до експозиції: під впливом мікропластику концентрації NAD^{+} та $NADH$ знижувалися відповідно в 1,9- та 2,4-рази порівняно з контролем (Рис. 3.1.2.5 А, Б). Аналогічне пригнічення обох показників спостерігалось в групі кофеїну, тоді як у експозиції хлорпромазину рівень $NADH$ залишався на контрольному рівні, а NAD^{+} знижувався. Редокс-індекс, визначений як співвідношення $NADH/NAD^{+}$ знизився в 1,5 раза під дією МР і Caff, але підвищився до 2,4 раза в групах Crz та Міх (Рис. 3.1.2.5 В). Такі результати вказують на гальмування гліколітичних та анаеробних шляхів метаболізму в більшості експозицій, що може знижувати стресостійкість клітин (Telek et al., 2023). Зростання $NADH/NAD^{+}$ у групах Crz і Міх, навпаки, свідчить про втрату окисного балансу та потенційне накопичення відновних еквівалентів. Подібні порушення співвідношення $NADH/NAD^{+}$ здатні посилювати утворення АФК і сприяти розвитку окисних ушкоджень, що збігається з підвищенням TBARS та PC у цьому дослідженні (Xiao and Loscalzo, 2020).

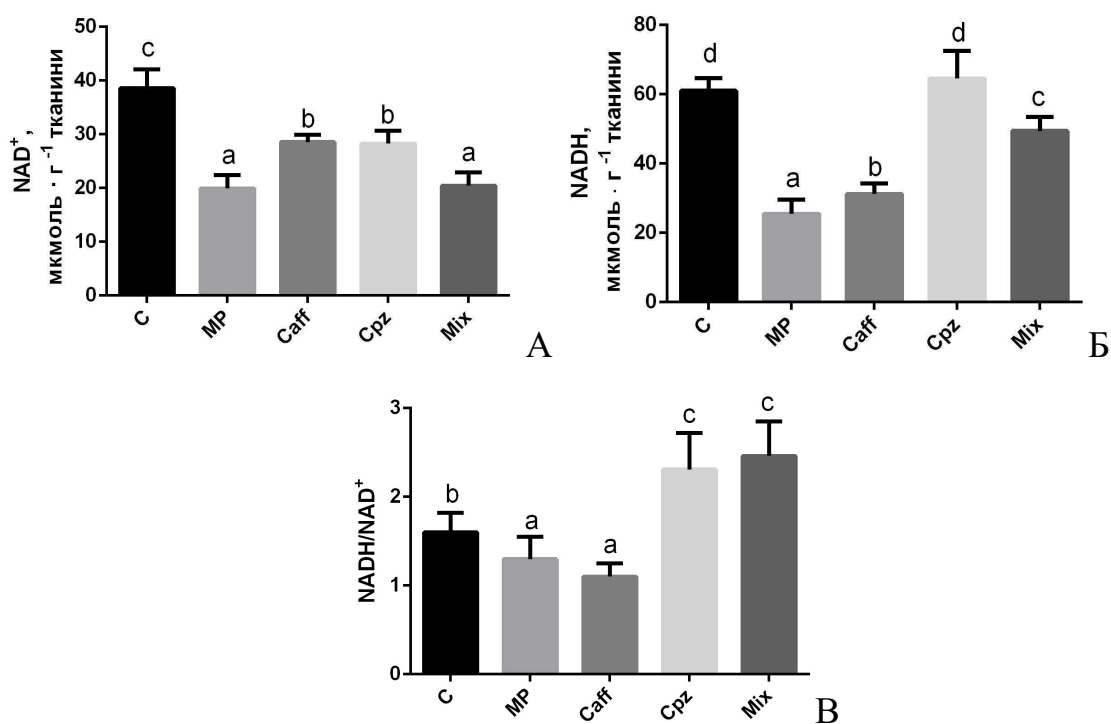


Рис.3.1.2.5 Вміст нікотинамідних коензимів у травній залозі *U. tumidus* після 14-денної експозиції до мікропластику (MP), кофеїну (Caff), хлорпромазину (Cpz) та їх суміші (Mix): А — NAD⁺; Б — NADH; В — співвідношення NADH/NAD⁺, M±SD, n=8.

Висновок до підрозділу 3.1.2

Результати 14-денної експозиції *U. tumidus* свідчать про розвиток окисного стресу в травній залозі та запуск диференційованих компенсаторних механізмів залежно від природи ксенобіотика. Вплив MP та Caff активує мітохондріальну Mn-SOD через гіперпродукцію АФК, тоді як Cpz інгібує ключові ензими (Mn-SOD та CAT), спричиняючи дисбаланс, який лише частково нівелюється активацією цитозольної Cu,Zn-SOD. Індивідуальна дія речовин посилює ліпопероксидацію та окисну модифікацію протеїнів, проте за їх комбінованого впливу рівень карбонілювання знижується, що вказує на взаємокомпенсацію токсичних ефектів.

За умов пригнічення ензиматичного захисту редокс-гомеостаз підтримують низькомолекулярні тіоли. Достовірне зростання концентрації GSH та MT-SH в усіх групах підтверджує їхню роль як головних клітинних редокс-буферів. Зокрема, у групі Caff виявлено специфічну деметалізацію

металотіонеїнів з формуванням значного пулу апо-форм. Водночас активація цієї системи супроводжується порушенням метало-гомеостазу: зниження індексу Zn/Cu вказує на ослаблення її буферної ємності, що є раннім маркером цитотоксичності.

Токсичне навантаження трансформує пул нікотинамідних коензимів: якщо MP та Caff знижують співвідношення NADH/NAD⁺ (гальмування енергетичного метаболізму), то дія Crz та суміші стрімко підвищує цей індекс, сприяючи накопиченню відновних еквівалентів. Розрахунок інтегрального індексу АПБ підтвердив найбільший прооксидантний тиск у групі кофеїну, тоді як комбінована дія ксенобіотиків характеризується найвищим компенсаторним потенціалом системи антиоксидантного захисту.

Представлені у підрозділі 3.1.2 результати опубліковано у статтях Yunko et al., 2024a, b; Yunko et al., 2025.

3.1.3 Функціональний стан антиоксидантної системи *M. galloprovincialis* за дії мікропластику, кофеїну та їх суміші

Після детального аналізу редокс-механізмів і системи антиоксидантного захисту у прісноводного двостулкового молюска *U. tumidus* логічним є розглянути реакції морського представника двостулкових молюсків — *M. galloprovincialis*. Цей вид є широко вживаною моделлю в екотоксикологічних дослідженнях, що дозволяє порівняти та узагальнити адаптивні механізми антиоксидантного захисту двостулкових молюсків різних середовищ існування за умов однакового впливу.

Активність антиоксидантної системи у *M. galloprovincialis* за впливу мікропластику та комбінованого впливу зазнала значного пригнічення: знизилась функціональна активність ключових ензимів — SOD total, Mn-SOD, Cu, Zn-SOD, CAT. При цьому жодна з експозицій не спричинила їх активації (Рис. 3.1.3.1). Рівні прооксидантних маркерів — TBARS та PC — не підвищувалися, а в групі MP навіть спостерігалось зниження TBARS (Рис. 3.1.3.2 А). Вплив кофеїну не викликав суттєвих змін у жодному з оцінених

параметрів, що свідчить про низьку чутливість цього виду до даного токсиканта за умов дослідження.

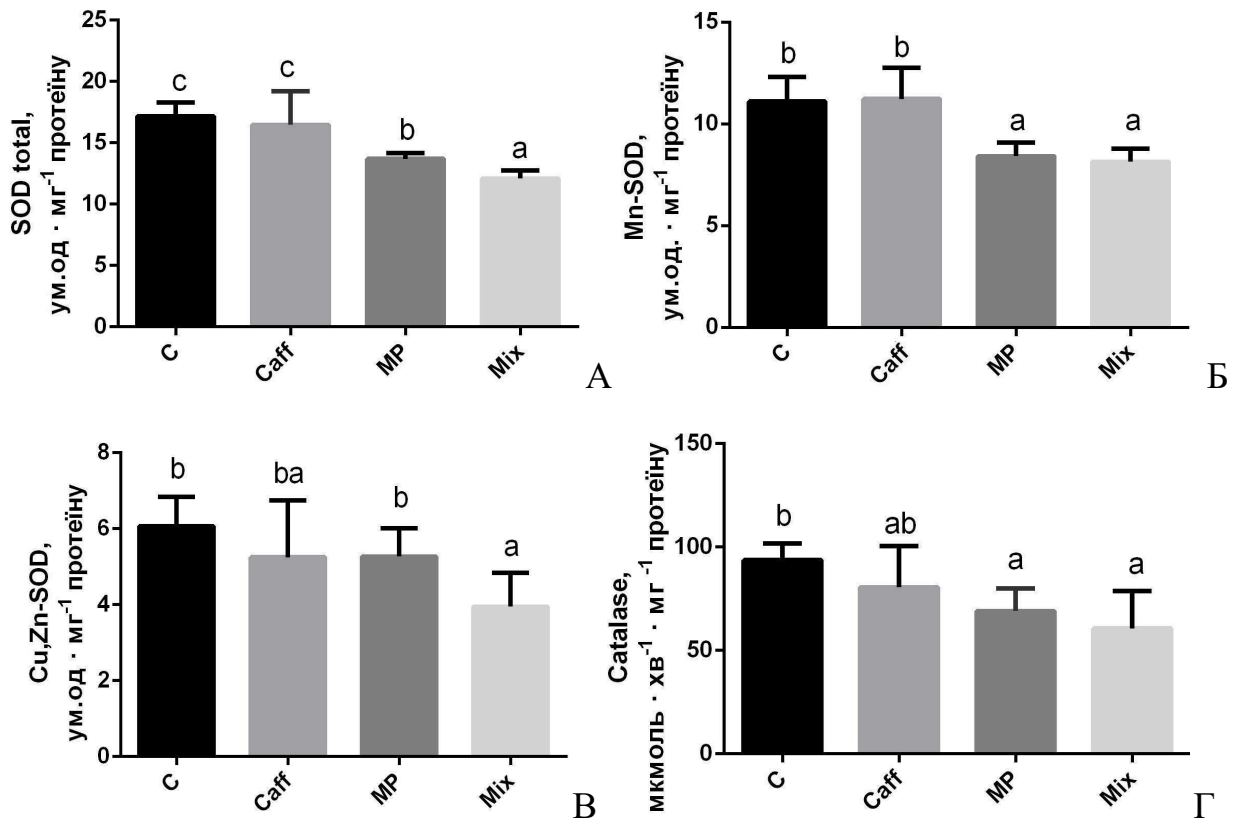


Рис. 3.1.3.1 Активність ключових антиоксидантних ензимів у травній залозі *M. galloprovincialis* після 14-денної експозиції до мікропластику (MP), кофеїну (Caff) та їхньої суміші (Mix): А — SOD total; Б — Mn-SOD; В — Cu,Zn-SOD; Г — CAT, $M \pm SD$, $n=8$.

Пригнічення ензиматичної активності та зниження прооксидантних маркерів під впливом MP і Mix можуть свідчити про зменшення енергетичних резервів і редукцію адаптивних можливостей організму при тривалому токсичному навантаженні (Shang et al., 2021). Аналогічно, реакція *U. tumidus* на мікропластик виявляється залежною від розміру частинок: дрібні (2 мкм) не впливали на активність Mn-SOD і TBARS, тоді як більші частинки (0,1–0,5 мм) призводили до їх зростання (Martyniuk et al., 2022a, 2023). Аналіз досліджень на *Mytilus* spp. підтверджує варіабельність ефектів мікропластику, які можуть варіювати від активації до пригнічення ензимів залежно від концентрації та тривалості експозиції (Gardon et al., 2020; Magara et al., 2018; Revel et al., 2019).

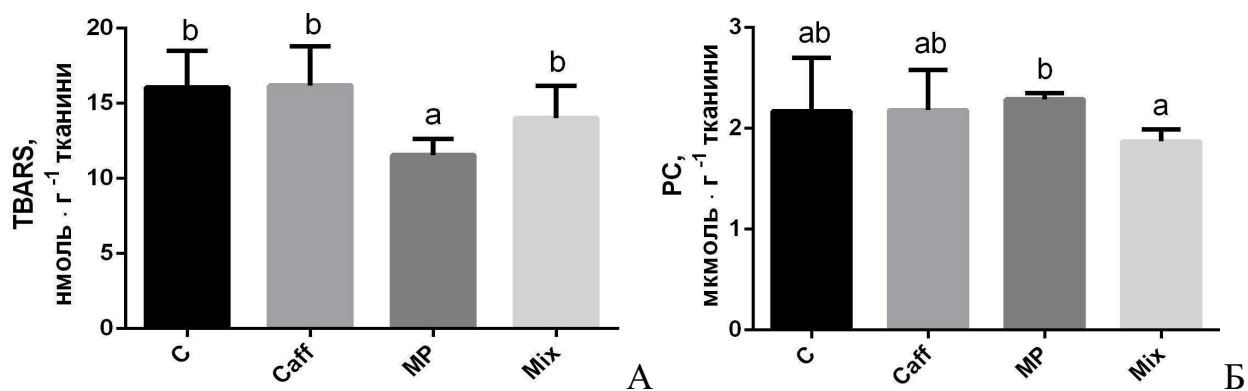


Рис. 3.1.3.2 Концентрація продуктів окисного пошкодження ліпідів (А) та протеїнів (Б) у травній залозі *M. galloprovincialis* після 14-денної експозиції до мікропластику (MP), кофеїну (Caff) та їхньої суміші (Mix), $M \pm SD$, $n=8$.

Щодо кофеїну, попередні дослідження демонстрували індукцію антиоксидантної відповіді у різних водних організмів при низьких концентраціях (0,5–18 мкг/л) (Aguirre-Martínez et al., 2013; Cruz et al., 2016; Li et al., 2012; Pires et al., 2016). Однак у *M. galloprovincialis* в рамках цього дослідження кофеїн не спричинив значущих змін, що вказує на видоспецифічну низьку чутливість до цього ксенобіотика.

Цікаво, що було зафіксовано достовірне підвищення рівня відновленої форми глутатіону у групі, одночасно зі зниженням рівня окисненої форми (Рис. 3.1.3.3 А, Б). Це призвело до підвищення редокс-індексу цього трипептиду, що свідчить про збереження або навіть посилення неензиматичного антиоксидантного потенціалу попри пригнічення ензиматичної ланки захисту (Рис. 3.1.3.3 В). У групі Caff зміни у рівнях GSH і GSSG не спостерігалися, що вказує на відсутність значущого редокс-дисбалансу. Отже, адаптивна активація глутатіонової системи є ключовим механізмом підтримання клітинного гомеостазу у *M. galloprovincialis* за субхронічного токсичного впливу. Підтвердженням поширеності цих механізмів служать раніше опубліковані дані про підвищення GSH та RI GSH у *M. galloprovincialis* як у лабораторних, так і у польових умовах (Cappello et al., 2021; Regoli and Principato, 1995), а також подібні ефекти у прісноводного двостулкового моллюска *U. tumidus* після 14-денної дії мікропластику (Martyniuk et al., 2022b).

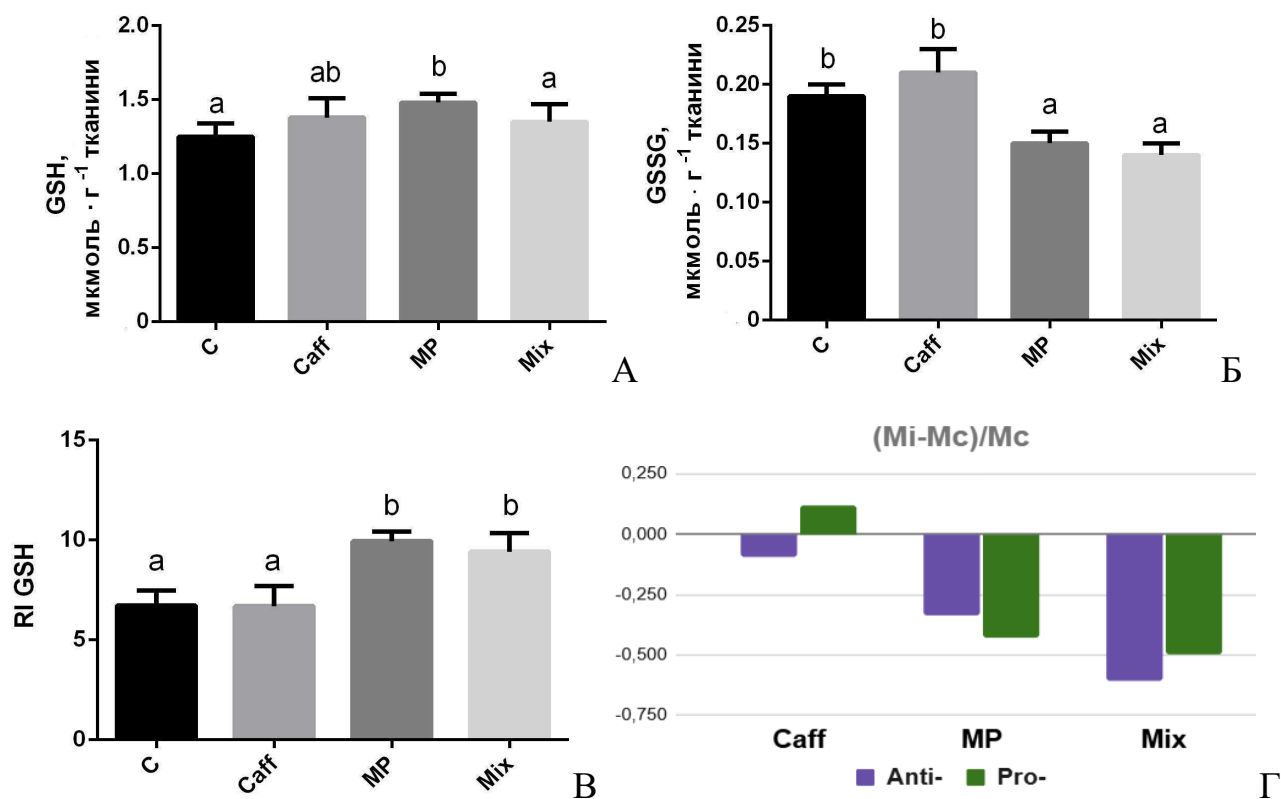


Рис. 3.1.3.3 Вміст глутатіону у травній залозі *M. galloprovincialis* після 14-денної експозиції до мікропластику (MP), кофеїну (Caff) та їхньої суміші (Mix): А — рівень відновленої форми глутатіону (GSH); Б — вміст окисненої форми (GSSG); В — редокс-індекс глутатіону (RI GSH); Г — антиоксидантно-прооксидантний баланс (АПБ), $M \pm SD$, $n=8$.

Хоча більшість досліджень токсичності мікропластику охоплювали ензиматичні маркери антиоксидантного захисту та продуктах перекисного окиснення ліпідів, то функціонування буферних редокс-систем, зокрема глутатіонової, залишалося недостатньо вивченим. В цьому контексті підвищення RI GSH у групах MP і Mix є важливим індикатором компенсаторної активації антиоксидантної відповіді. Разом з тим, підтримання редокс-гомеостазу забезпечується не лише глутатіоновою ланкою, а й активацією специфічних тіолових протеїнів.

Аналіз АПБ виявив специфічну трансформацію редокс-статусу гідробіонтів (Рис. 3.1.3.3 Г). Вплив кофеїну спричиняє розбалансування системи: пригнічення антиоксидантної ланки на тлі зростання прооксидантного тиску. Дія мікропластику та особливо суміші призводить до депресії обох

складових балансу. Найбільш критичний дефіцит антиоксидантного резерву зафіксовано за комбінованого впливу, що свідчить про виснаження адаптаційного потенціалу молюсків за умов мультистресового навантаження.

На профілях елюції термостабільних протеїнів (Рис. 3.1.3.4) ідентифіковано пік у зоні виходу металотіонеїнів. Його спектральні властивості підтверджують наявність метало-тіолатних зв'язків.

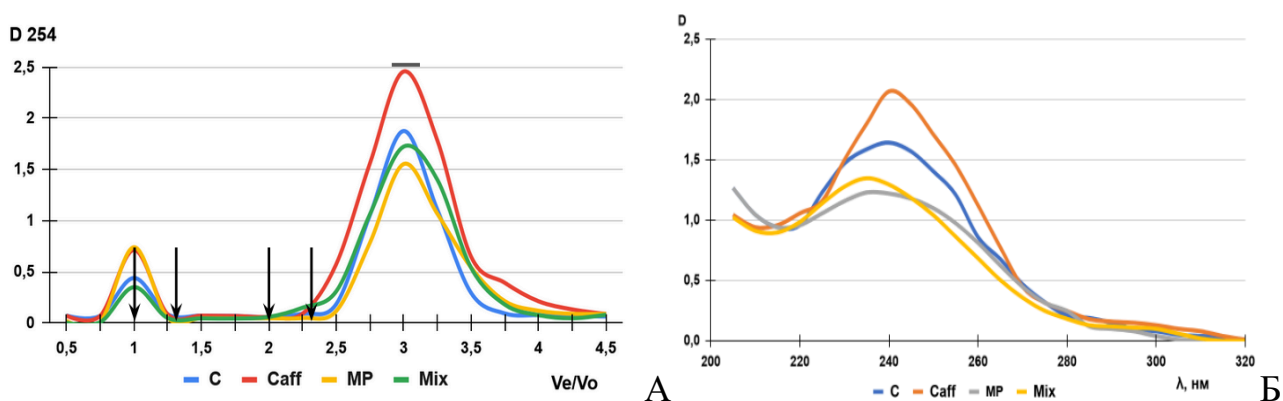


Рис. 3.1.3.4. Хроматографічне розділення (Sephadex G-50) термостабільних протеїнів низької молекулярної маси, виділених із травної залози *M. galloprovincialis* після 14-денної експозиції до мікропластику (MP), кофеїну (Caff) та їхньої суміші (Mix): А — динаміка елюції фракцій; Б — спектральні характеристики (УФ-діапазон) виділеного металотіонеїнового піку.

Примітка: положення маркерів молекулярної маси (25,8–3,4 кДа) та їхніх відносних об'ємів елюції (V_e/V_o) позначено стрілками; фракцію металотіонеїнів виділено горизонтальною лінією.

Результати дослідження показали, що достовірно підвищення загального вмісту МТ-SH відбулося лише в групі MP порівняно з контролем (Рис. 3.1.3.5 А). Водночас рівні металозв'язаної форми МТ-Zn зростали тільки у групі MP, тоді як у Caff та Mix залишалися на контрольному рівні (Рис. 3.1.3.5 Б). Аналіз фракційного складу металотіонеїнів (Рис. 3.1.3.5 В) свідчить про стабільність пулу апо-МТ за більшості варіантів експозиції. Зокрема, у групі Mix співвідношення фракцій МТ відповідало контрольним значенням, а у групі Caff відмічено лише незначну тенденцію до накопичення деметальованої форми. Натомість у групі MP, попри інтенсивну індукцію загального вмісту МТ-SH,

спостерігалось практично повне завантаження пулу іонами цинку (MT-Zn). Мінімальний вміст апо-MT у групі MP вказує на відсутність процесів деметалізації та пріоритетність метаболічної функції білка за умов впливу MP.

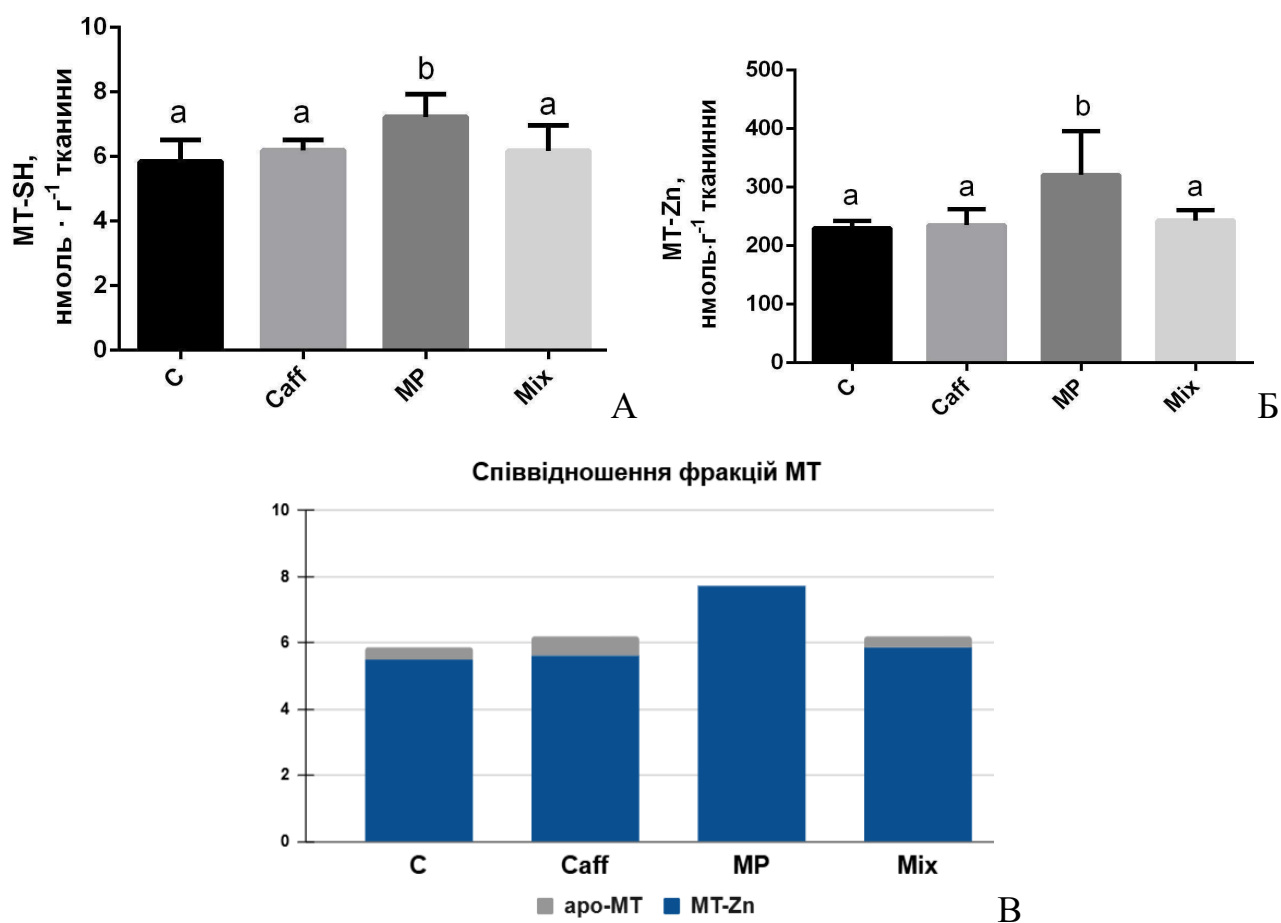


Рис. 3.1.3.5 Вміст металотіонеїнів у травній залозі *M. galloprovincialis* після 14-денної експозиції до мікропластику (MP), кофеїну (Caff) та їх суміші (Mix): А — Загальний вміст металотіонеїнів (MT-SH); Б — Рівень металованої форми (MT-Zn); В — співвідношення MT-Zn/apo-MT, $M \pm SD$, $n=8$.

Висновок до підрозділу 3.1.3

Система антиоксидантного захисту морського моллюска *M. galloprovincialis* за умов експозиції до мікропластику, кофеїну та їх суміші забезпечує збалансовану реакцію редокс-гомеостазу без зростання маркерів окисного ушкодження. Попри певне пригнічення ензиматичної ланки, підтримання окисно-відновної рівноваги реалізується через мобілізацію неензиматичних антиоксидантів. Зокрема, у групі MP спостерігається зростання рівня GSH та його редокс-індексу, що супроводжується підвищенням загального вмісту

MT-SH із високим ступенем металонасичення. Натомість за дії кофеїну та суміші чинників захисний ефект забезпечується зміщенням балансу металотіонеїнової системи у бік деметалюваних апо-форм. Відсутність достовірних змін за окремої дії кофеїну підтверджує низьку видоспецифічну чутливість *M. galloprovincialis* до цього ксенобіотику. Відтак, реакція тіолової ланки у мідії характеризується помірною інтенсивністю та специфічністю залежно від природи діючого чинника.

Представлені у підрозділі 3.1.3 результати опубліковано у статті Impellitteri et al., 2023b).

3.1.4 Концентраційнозалежні ефекти хлорпромазину на функціонування системи антиоксидантного захисту у *M. galloprovincialis*

Експозиції хлорпромазину спричиняли прооксидантний дисбаланс у тканинах молюсків, що проявлявся різноспрямованими змінами активності антиоксидантних ензимів та підвищенням маркерів окисного ушкодження. Зокрема, активність загальної SOD достовірно зростала у групах Crz I та Crz II (Рис. 3.1.4.1 А), що, ймовірно, відображає компенсаторну відповідь на підвищене утворення супероксид-аніонів. Натомість активність САТ, особливо у групі Crz II, була суттєво знижена (Рис. 3.1.4.1 Б), що може свідчити про порушення здатності до детоксикації пероксиду водню — ключового субстрату каталази, який є проміжним продуктом реакції SOD. Цей дисбаланс між ензиматичними ланками потенційно сприяє накопиченню H_2O_2 та утворенню гідроксильних радикалів ($\bullet OH$), що призводить до пошкодження клітинних біомолекул (Alam et al., 2022; Ransy et al., 2020).

Паралельно відзначалося посилення окисного ушкодження — TBARS та PC (Рис. 3.1.4.1 В, Г), що підтверджує розвиток проокисного стану в тканинах. Отримані дані узгоджуються з попередніми дослідженнями, які демонструють чутливість каталази до фармацевтичних забруднювачів у водних організмів (Fabbri and Franzellitti, 2016; Matozzo et al., 2020; Oliveira et al., 2015). Таким чином, САТ виявляється вразливою мішенню окисного ушкодження за дії Crz, а її пригнічення є одним із ключових чинників формування проокисного зсуву в

клітинах молюсків. Ці висновки узгоджуються з даними інших авторів про реакцію двостулкових молюсків на фармацевтичні стресори (Gnatyshyna et al., 2020; Lushchak, 2011; Moreira et al., 2016; Paital et al., 2016).

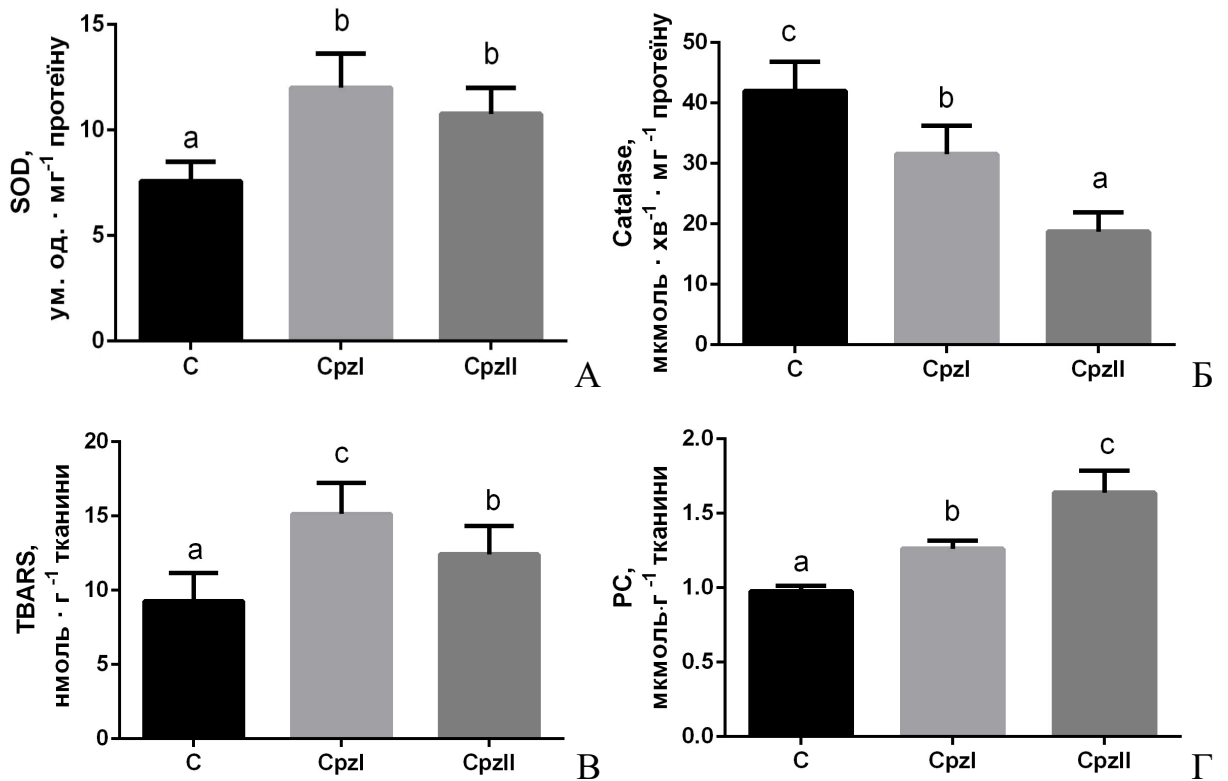


Рис. 3.1.4.1 Динаміка активності антиоксидантних ензимів (А — SOD; Б — каталаза) та маркерів окисного ушкодження (В — TBARS, Г — PC) у травній залозі *M. galloprovincialis* після 14-денної експозиції до хлорпромазину у двох концентраціях $12 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ (Cpz I) та $12 \text{ mcg} \cdot \text{l}^{-1}$ (Cpz II), $M \pm SD$, $n=8$.

Вплив хлорпромазину на глутатіонову систему молюсків викликав концентраційнозалежні зміни редокс-гомеостазу. Рівень GSH достовірно зростав у групах Срз I та Срз II порівняно з контролем (Рис. 3.1.4.2 А), що свідчить про активацію синтезу або зниження споживання GSH у процесах детоксикації вільних радикалів. Концентрація GSSG значуще зросла лише в групі Срз I (Рис. 3.1.4.2 Б), що вказує на активне використання GSH у нейтралізації перекисних сполук, ймовірно за участі глутатіонпероксидази (Manduzio et al., 2005).

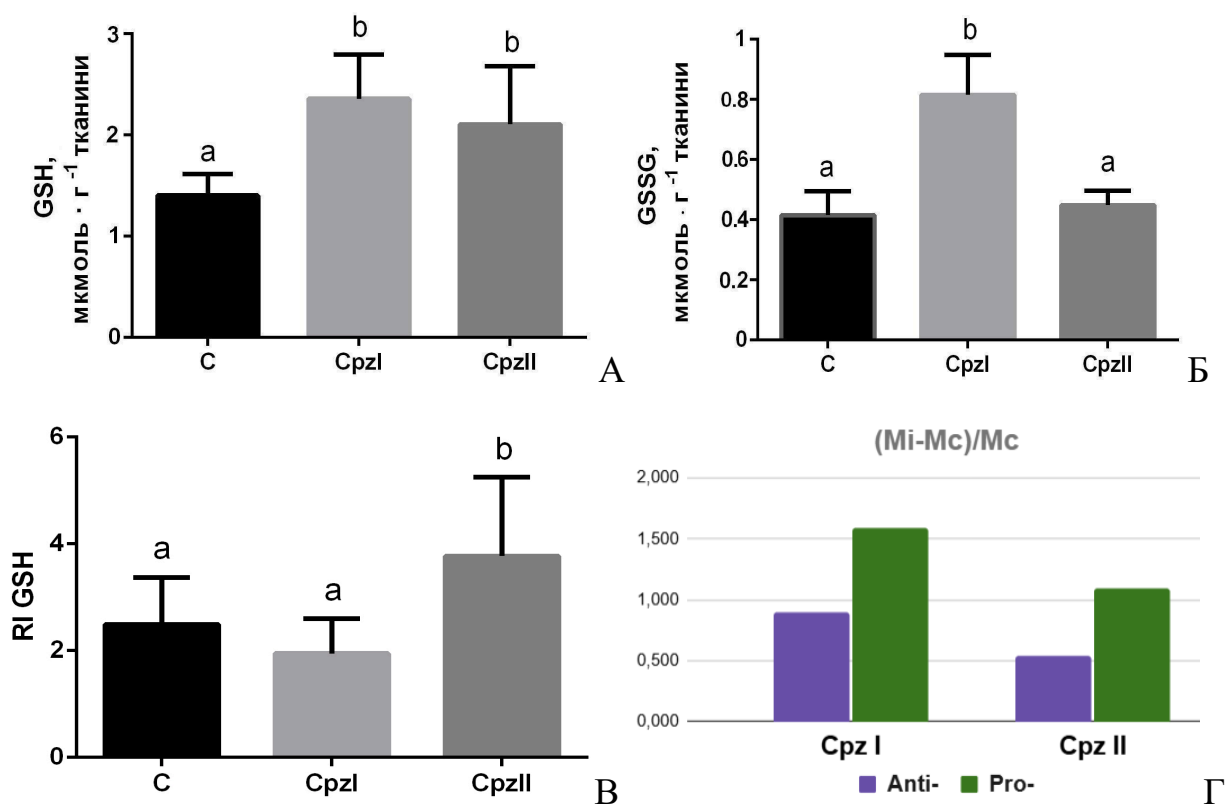


Рис. 3.1.4.2 Вміст глутатіону у травній залозі *M. galloprovincialis* після 14-денної експозиції до хлорпромазину у двох концентраціях $12 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ (Cpz I) та $12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (Cpz II): А — рівень відновленої форми глутатіону (GSH); Б — вміст окисненої форми (GSSG); В — редокс-індекс глутатіону (RI GSH); Г - антиоксидантно-прооксидантний баланс, $M \pm SD$, $n=8$.

Співвідношення GSH/GSSG, достовірно збільшувалося лише у групі Cpz II (Рис. 3.1.4.2 В), що свідчить про збереження або відновлення відновного потенціалу клітини при вищому токсичному навантаженні.

Аналіз антиоксидантно-прооксидантного балансу демонструє переважання прооксидантного ефекту у обох групах, зі зниженням індексу на 52,8% у Cpz I та на 50,8% у Cpz II порівняно з контролем (Рис. 3.1.4.2 Г). Відтак, найчутливішим маркером концентраційного впливу виявилась GSSG, зростання якої фіксувалось лише за нижчої концентрації Cpz, що свідчить про тимчасове накопичення перекису водню через неповне функціонування ензиматичного каскаду та часткову активацію глутатіонової системи для його елімінації (Martyniuk et al., 2022b; Xiao and Loscalzo, 2020). Подібні зміни у вмісті GSH, GSSG та ензиматичній активності раніше зафіксовані в *U. tumidus* після

14-денної експозиції до Cpz ($18 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$), що свідчить про відтворюваність редокс-відповіді двостулкових молюсків на фенотіазинові сполуки (Khoma et al., 2020b; Khoma et al., 2022a). Згідно літературних даних, хлорпромазин, як похідне фенотіазину, може проявляти антиоксидантні або прооксидантні властивості залежно від умов. Так, у *Carassius auratus* сублетальна експозиція викликала змінні прооксидантні ефекти (Li et al., 2008). У людини терапевтичні концентрації Cpz ($1\text{--}100 \text{ мкМ}$) призводили до зниження співвідношення GSH/GSSG, що свідчить про активацію прооксидантних шляхів (Ficarra et al., 2016).

Профілі елюції термостабільних протеїнів травної залози мідій засвідчили типовий характер їхнього фракціонування та ідентифіковано металотіонеїн-вмісну низькомолекулярну фракцію у всіх експериментальних групах (Рис. 3.1.4.3).

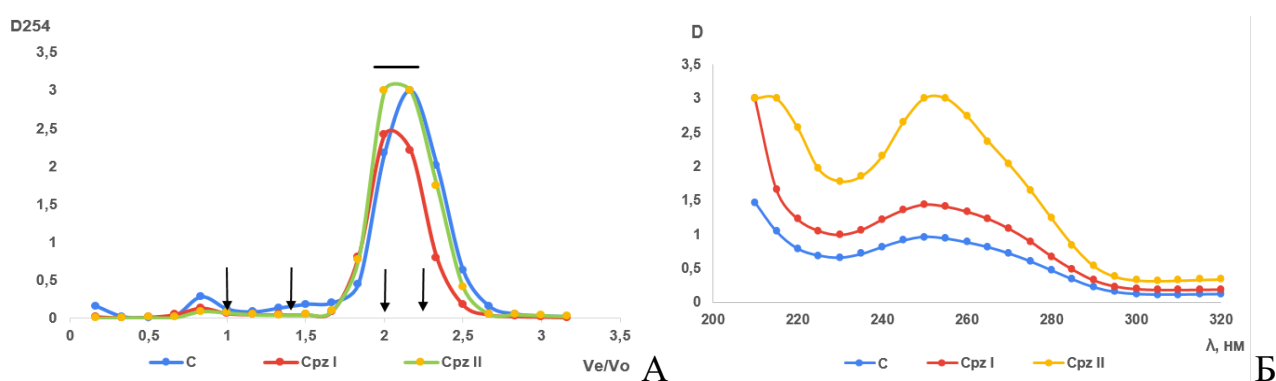


Рис. 3.1.4.3. Хроматографічні характеристики термостабільних протеїнів молюска *M. galloprovincialis* після 14-денної експозиції до хлорпромазину у двох концентраціях $12 \text{ нг}\cdot\text{л}^{-1}$ (Cpz I) та $12 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ (Cpz II): профіль елюції на сефадексі G-50 (А) та УФ-спектри низькомолекулярних фракцій (Б).

Примітка: стрілками (А) позначено вихід маркерних протеїнів альбумін ($66,0 \text{ кДа}$), хімотрипсин ($25,0 \text{ кДа}$), цитохром с ($12,3 \text{ кДа}$), інсулін ($5,8 \text{ кДа}$), які мають параметри елюції $1,0$; $1,3$; $2,2$; $2,5 \text{ Ve/Vo}$ відповідно; V_e – об'єм елюції; V_o – зовнішній об'єм гелю Зону виходу металотіонеїнів позначено горизонтальною лінією (Б).

Аналіз вмісту МТ показав, що рівень тіолів і концентрація цинку, зв'язаного з МТ, достовірно підвищувалися в обох групах, із максимальним

зростанням у групі Срз II порівняно з контролем (Рис. 3.1.4.4 А, Б). Крім збільшення загального вмісту МТ, відзначалося підвищення частки металізованої форми протеїну: у контролі становила 71,6%, а в Срз I та Срз II — 86,3% і 81,4% відповідно, окрім цього відзначене зниження частки вільних апо-форм (Рис. 3.1.4.4 В). Хоча рівень МТ-SH у травній залозі, був у 8–11 разів нижчим за рівень GSH, він суттєво доповнював загальний антиоксидантний потенціал. Здатність МТ зв'язувати гідроксильні радикали перевищує аналогічну здатність GSH у 300 разів (Sato and Kondoh, 2002), а стабільність цинкових кластерів залежить від редокс-стану тіолових груп (Krežel and Maret, 2016).

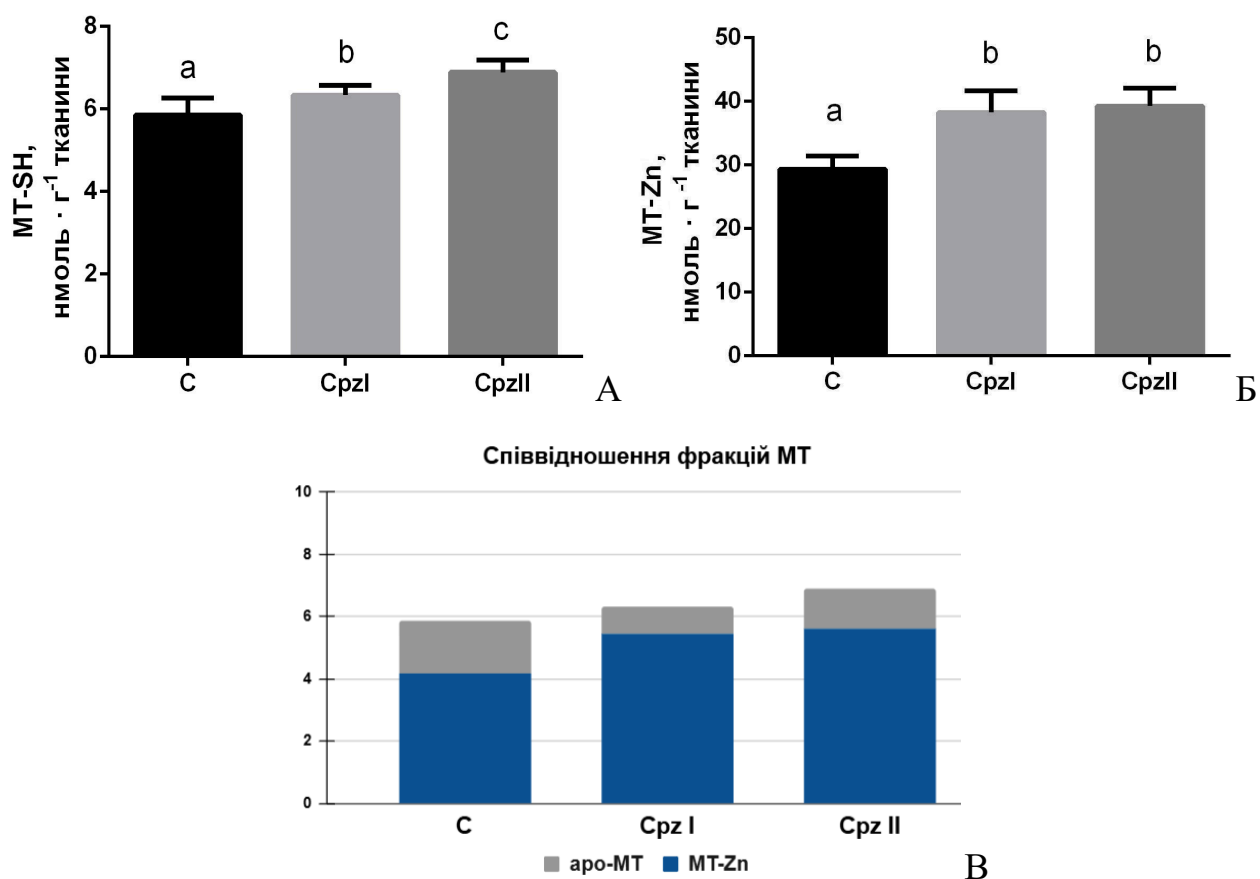


Рис. 3.1.4.4 Вміст металотіонеїнів у травній залозі *M. galloprovincialis* після 14-денної експозиції до хлорпромазину у двох концентраціях 12 нг·л⁻¹ (Срз I) та 12 мкг·л⁻¹ (Срз II): А — Загальний вміст металотіонеїнів (MT-SH); Б — Рівень металізованої форми (MT-Zn); В — співвідношення фракцій метал-зв'язаного МТ до апо-МТ, М±SD, n=8.

Деякі типи стресу можуть знижувати рівень металювання МТ, незважаючи на зростання загального вмісту МТ (Auclair et al., 2020; Khoma et al., 2020a; Khoma et al., 2021). Однак у цьому дослідженні одночасне підвищення загального рівня МТ і частки МТ-Zn без ознак порушення функціональності тіолатних кластерів свідчить про ефективну адаптаційну відповідь, ймовірно зумовлену відновними властивостями Crp (Martyniuk et al., 2022b; Ruttkay-Nedecký et al., 2013; Tamba and O’Neill, 1991). Crp також може впливати на метаболізм металів через пригнічення Ca^{2+} -залежних процесів (Choi et al., 2001; Hamaguchi et al., 2014; Xu et al., 2010). З огляду на відомий антагонізм між Ca^{2+} і Zn^{2+} у сигнальних шляхах (Bouron and Oberwinkler, 2014; Zýsk et al., 2018), підвищення металювання МТ цинком є очікуваним. Металотіонеїни відіграють провідну роль у підтриманні цинкового гомеостазу, а їх участь у психоневрологічних порушеннях підтверджена зниженням рівня МТ у пацієнтів із шизофренією (Yilmaz et al., 2023). Таким чином, здатність Crp, як антипсихотичного засобу, активувати металотіонеїнову систему та посилювати її здатність до зв’язування металів може мати важливе біологічне значення.

Висновок до підрозділу 3.1.4

Експозиція *M. galloprovincialis* до хлорпромазину ($12 \text{ нг} \cdot \text{л}^{-1}$ та $12 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$) індукує виражений прооксидантний дисбаланс зі зниженням інтегрального індексу (АПБ) на понад 50 %. Окисний стрес насамперед зумовлений дисбалансом ензиматичної ланки: компенсаторне зростання активності SOD супроводжується пригніченням CAT. Це порушує детоксикацію пероксиду водню та інтенсифікує окисне ушкодження ліпідів і протеїнів. За умов ензиматичної дисфункції компенсаторну функцію виконують низькомолекулярні тіоли: спостерігається активація глутатіонової системи зі зростанням пулу відновленого глутатіону в обох експозиціях та накопиченням окисненої форми за нижчої дози Crp. Паралельно мобілізується металотіонеїнова ланка — підвищується вміст МТ-SH та частка їх цинк-зв’язаної форми. Збереження високого ступеня металювання свідчить про цілісність тіолатних кластерів і специфічний вплив хлорпромазину на

внутрішньоклітинний гомеостаз металів, що забезпечує базову адаптивну клітинну відповідь на тлі загального прооксидантного зсуву.

Представлені у підрозділі 3.1.4 результати опубліковано у статтях Impellitteri et al., 2023a; Impellitteri et al., 2024b; Yunko et al., 2024a).

3.2 Прояви метаболічної детоксикації ксенобіотиків

Травна залоза молюсків, аналог печінки хребетних, складається з численних сліпо закінчених епітеліальних каналців, у яких два функціонально різні типи клітин забезпечують інтегрований травно-детоксикаційний процес. Базофільні клітини з розвиненим шорстким ендоплазматичним ретикуломом і численними секреторними гранулами синтезують та секретують травні ензими, тоді як травні клітини, що містять розгалужену лізосомально-вакуолярну систему здійснюють внутрішньоклітинне перетравлення, антиоксидантний захист і секвестрацію токсичних металів та органічних забруднювачів. Завдяки цим властивостям травна залоза є високочутливим «інструментом раннього попередження» про екологічний стрес у водних молюсків (Faggio et al., 2018)

Метаболічна детоксикація у травній залозі молюсків складається з трьох послідовних фаз. У першій фазі мікросомального окиснення ключову роль відіграють ізоформи цитохрому P450, флавінзалежні монооксигенази та гідролітичні ензими, які каталізують окисні, відновні й гідролітичні реакції, що сприяють утворенню полярних функціональних груп у структурі ксенобіотика та підвищують його розчинність у воді. Хоча продукти цих реакцій зазвичай є менш токсичними, у деяких випадках вони можуть бути більш реактивними, що призводить до пошкодження клітинних компонентів та активації антиоксидантних систем (Snyder, 2000; Xue et al., 2016).

Друга фаза біотрансформації є вирішальним етапом у захисті клітин від токсичної дії ксенобіотиків. На цій стадії активовані метаболіти, що утворилися у фазі I, піддаються приєднанню гідрофільних кофакторів, таких як глутатіон чи глюкуронова кислота, за участю низки ензимів. Кон'югація значно підвищує водорозчинність та знижує біореактивність сполук, сприяючи їх елімінації з

організму і запобігаючи накопиченню електрофільних і потенційно генотоксичних інтермедіатів (Grillo, 2012).

Кон'юговані метаболіти виводяться у третій фазі за допомогою спеціалізованих транспортних протеїнів, знижуючи ризик їх повторного надходження в метаболічні шляхи (Snyder, 2000). Таким чином, узгоджена робота ензиматичної системи біотрансформації та антиоксидантних механізмів є критично важливою для підтримання клітинного гомеостазу й запобігання окисному ушкодженню, тоді як дисфункція будь-якого з етапів цього процесу здатна спричинити накопичення токсичних метаболітів, надмірне утворення АФК і пошкодження біомолекул клітини.

3.2.1 Оцінка ефективності системи біотрансформації *U. tumidus*

Вплив досліджуваних експозицій на біотрансформаційні процеси в *U. tumidus* проявлявся через зміни активності ключових ензимів. Зокрема, рівень активності СYP450-залежної 7-етоксирезорурфін-О-деетилази, яка є індикатором функціонування ензимів першої фази біотрансформації, достовірно зростав під впливом кофеїну, тоді як хлорпромазин та комбінована дія призводили до її зниження (Рис. 3.2.1.1 А).

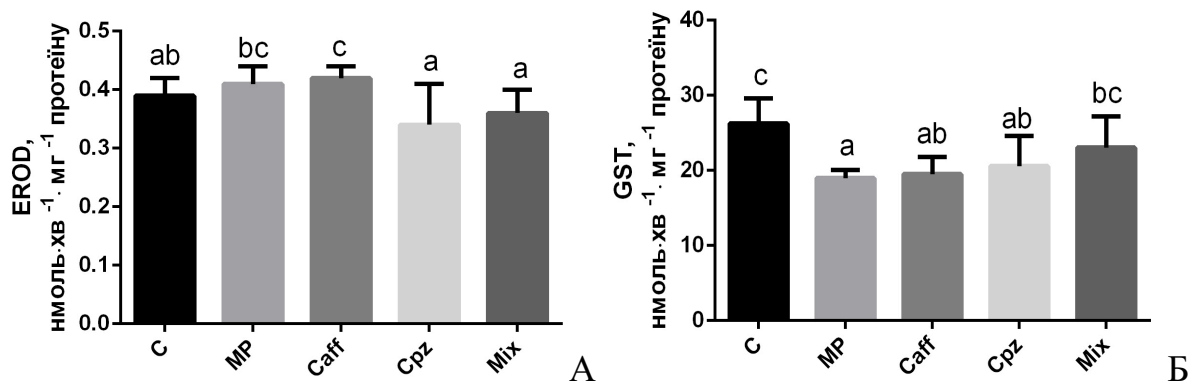


Рис. 3.2.1.1 Активність ензимів біотрансформації фази I (А — EROD) та фази II (В — GST) у травній залозі *U. tumidus* після 14-денної експозиції до мікропластику (MP), кофеїну (Caff), хлорпромазину (Cpz) та їх суміші (Mix), $M \pm SD$, $n=8$.

Аналогічна активація EROD під впливом кофеїну була продемонстрована для різних видів двостулкових молюсків: *Corbicula fluminea* при експозиції до

15 і 50 мкг·л⁻¹ протягом 21 доби (Aguirre-Martínez et al., 2015), а також у *Dreissena polymorpha* при спільній дії з мікропластиком (Matskiv et al., 2024).

Активність глутатіон-S-трансферази, що є одним із ензимів другої фази біотрансформації, пригнічувалася в усіх випадках окрім комбінованої дії, причому найбільше — під дією мікропластику, де рівень пригнічення досягав 27% (Рис. 3.2.1.1 Б). Подібні зміни відзначались при різних одноразових експозиціях молюсків, включаючи MP, Caff та Crz *in vivo* та *in vitro* (Impellitteri et al., 2023b; Khoma et al., 2022a; Türkan et al., 2021). Зниження активності GST у дослідженнях на молюсках, незалежно від природи ксенобіотики (MP, Caff, Crz), імовірно, пов'язане із залученням GST у глутатіонзалежні процеси захисту від окисного ушкодження, а не з особливостями хімічної структури токсиканта (Bhagat et al., 2016; Roth et al., 2011). Щодо комбінованого впливу чинників, спостерігалася тенденція до зменшення специфічної активації EROD, характерної для кофеїну. Це може пояснюватися конкурентною взаємодією між кофеїном і хлорпромазином за ензиматичні системи біотрансформації (Broderick et al., 2005; Yartsev and Peisah, 2021).

3.2.2 Особливості функціонування системи біотрансформації в *M. galloprovincialis*

У проведеному дослідженні було встановлено, що під дією хлорпромазину на *M. galloprovincialis* активність EROD у групі Crz I зростала на 31%, тоді як вища концентрація Crz не впливала на цей показник. Водночас активність глутатіон-S-трансферази у обох групах зростала — на 46% та 70% відповідно (Рис. 3.2.2.1 А, Б).

Підвищення активності EROD у мідій узгоджується з літературними даними, які засвідчують участь цього ензиму у трансформації Crz навіть у низьких екологічно значущих концентраціях (Yuan et al., 2013). Відомо, що Crz може інгібувати ензими мікосомальної трансформації в печінці людини *in vitro*, але клінічно значущий ефект щодо пригнічення ізоформ CYP450 *in vivo* є обмеженим (Gervasini et al., 2013).

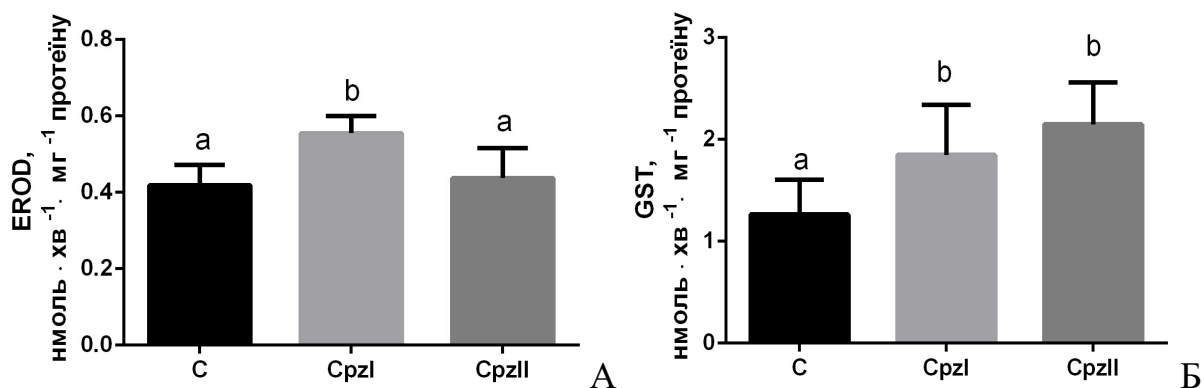


Рис. 3.2.2.1 Зміни активності ензимів детоксикації ксенобіотиків у травній залозі *M. galloprovincialis* після 14-денної експозиції до хлорпромазину у двох концентраціях 12 нг·л⁻¹ (Cpz I) та 12 мкг·л⁻¹ (Cpz II): А — EROD; Б — GST, M±SD, n=8.

Активація GST, імовірно, пов'язана з подальшою детоксикацією метаболітів Cpz, проте у різних видів спостерігаються суперечливі ефекти. Наприклад, в *U. tumidus* за експозиції 18 мкг·л⁻¹ активність GST також знижувалась (Khoma et al., 2022a), а у *Daphnia magna*, що зазнала впливу 10 нг·л⁻¹, 1 мкг·л⁻¹ та 250 мкг·л⁻¹ Cpz протягом 48 годин, активність GST суттєво не змінилася при жодному з впливів (Oliveira et al., 2015). У низці досліджень було показано, що фармацевтичні забруднювачі у стічних водах здатні індукувати ензими першої та/або другої фази біотрансформації у двостулкових молюсків (Vonnafé et al., 2015).

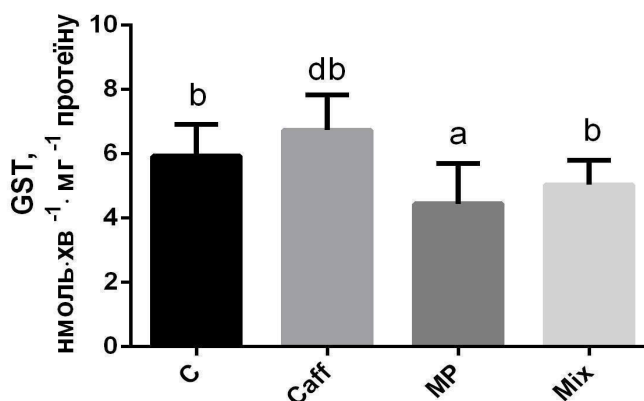


Рис. 3.2.2.2 Активність глутатіон-S-трансферази після 14-денної експозиції *M. galloprovincialis* до мікропластику (MP), кофеїну (Caff) та їх суміші (Mix), M±SD, n=8.

Експозиція *M. galloprovincialis* до мікропластику, кофеїну та їхньої суміші дала змогу оцінити функціональну реакцію системи глутатіон-залежної детоксикації, зокрема активність глутатіон-S-трансферази. Як видно з наведених результатів (Рис. 3.2.2.2), найбільш виражене пригнічення зафіксовано у групі мікропластику, де активність GST зменшилася на 27%. У групі комбінованого впливу зниження активності було менш значущим. Водночас вплив кофеїну на активність GST був мінімальним: хоча значних змін відносно контролю не зафіксовано, спостерігалася тенденція до індукування активності ензиму. Варто зазначити, що подібні ефекти підтверджуються літературними даними. Зокрема, короткочасний (96 годин) вплив мікропластику спричиняв зниження активності GST у зябрах *M. edulis* (Magara et al., 2018). Найбільш помітні відмінності між дією окремих чинників та їх комбінацією полягали у виразності змін GST, комбінований вплив пом'якшував пригнічення, яке спостерігалася при окремій дії мікропластику.

Висновок до підрозділу 3.2

Функціонування системи біотрансформації ксенобіотиків у досліджуваних видів моллюсків характеризується вираженою специфічністю залежно від природи токсиканта та виду організму. В *U. tumidus* перша фаза детоксикації (EROD) активується лише кофеїном, тоді як хлорпромазин та суміш пригнічують цей процес. Натомість у *M. galloprovincialis* низькі дози Crz індукують активність EROD, підтверджуючи участь цитохрому P450 у його метаболізмі. Реакція другої фази (GST) у обох видів найбільш вразлива до мікропластику, який спричиняє суттєве пригнічення ензиму. Характерною особливістю *M. galloprovincialis* є активація GST під дією хлорпромазину, що вказує на ефективне залучення глутатіон-залежної кон'югації. За комбінованого впливу у обох видів спостерігається нівелювання екстремальних змін активності ензимів, що свідчить про модифікацію детоксикаційних шляхів та часткову взаємокомпенсацію ефектів окремих чинників.

Представлені у підрозділі 3.2 результати опубліковано у статтях Impellitteri et al., 2023b; Impellitteri et al., 2024b; Yunko et al., 2025).

3.3 Стан клітинної життєздатності у двостулкових молюсків

У межах оцінки токсикологічних ефектів ксенобіотиків у водних організмів надзвичайно важливо враховувати маркери, які відображають не лише порушення метаболічного гомеостазу, а й розвиток незворотних ушкоджень на клітинному рівні. До таких відносять лізосомальну мембранну стабільність. Мембрана лізосоми є критичною структурою, яка відокремлює потужний набір гідролітичних ензимів (катепсини, кислі фосфатази та інші) від цитозолу, й саме її стабільність визначає функціональну цілісність органели та безпеку для клітини. Порушення лізосомальної мембранної стабільності під дією АФК, накопичення модифікованих макромолекул або важких металів призводить до вивільнення лізосомальних ензимів у цитозоль. Це може ініціювати каскади аутолізу, апоптозу або некрозу — механізми загибелі клітин, які супроводжують токсичний стрес (Turk et al., 2012). Надлишок АФК стимулює перекисне окиснення ліпідів мембрани, що знижує її стійкість і підвищує проникність, поглиблюючи цитотоксичні ефекти. Як наслідок, лізосоми можуть перетворюватися на осередки «вторинного стресу», підсилюючи прогресування пошкоджень і спричиняючи активацію клітинних сигнальних шляхів загибелі (Wang et al., 2018).

Для двостулкових молюсків цей процес має особливе екотоксикологічне значення, оскільки травна залоза є головним місцем акумуляції ксенобіотиків і метаболічних продуктів, а лізосомальна стабільність — раннім і чутливим індикатором токсичного навантаження (Faggio et al., 2018). Оцінка стійкості лізосомальної мембрани широко використовується в сучасному біомоніторингу для виявлення стресу задовго до появи структурних ушкоджень чи функціональних збоїв у тканинах.

Порушення цілісності лізосомальної мембрани, окрім безпосередньої цитотоксичності, відіграє центральну роль у запуску програмованої загибелі клітини — апоптозу. Вивільнення лізосомальних протеаз, таких як катепсини, у цитозоль може ініціювати каскад подій, що включає активацію ключових виконавчих ензимів апоптозу — каспаз, зокрема каспази-3 (Turk et al., 2012).

Активація каспази-3 є надійним біомаркером апоптозу в багатьох еукаріотичних клітинах, включаючи безхребетних, і свідчить про незворотність програмованої клітинної смерті. Механізм активації каспази-3 передбачає залучення ініціаторних каспаз (наприклад, каспази-8 або каспази-9), які розщеплюють і активують ефektorну форму ензиму. Надалі, активована каспаза-3 розщеплює численні протеїни-мішені, а також протеїни цитоскелету, що призводить до морфологічних і біохімічних змін, характерних для апоптотичної клітини (McIlwain et al., 2013).

3.3.1 Оцінка цитотоксичних ефектів в *U. tumidus*

Експозиції мікропластику, кофеїну, хлорпромазину та їхньої суміші спричинила посилення нестабільності лізосомальних мембран в *U. tumidus* (Рис. 3.3.1.1 А), що свідчить про активацію цитотоксичних механізмів на ранніх етапах клітинної відповіді. Визначення лізосомальної стабільності здійснювалося методом NRR, який є валідованим маркером життєздатності клітин і широко застосовується у сучасних токсикологічних дослідженнях (Pantea et al., 2023). Цей підхід ґрунтується на здатності інтактних лізосомальних мембран селективно акумулювати барвник нейтральний червоний, тоді як порушення цілісності мембрани призводить до виходу барвника у цитозоль та зниження його накопичення всередині лізосом (Babich and Borenfreund, 1990; Haj et al. 2019).

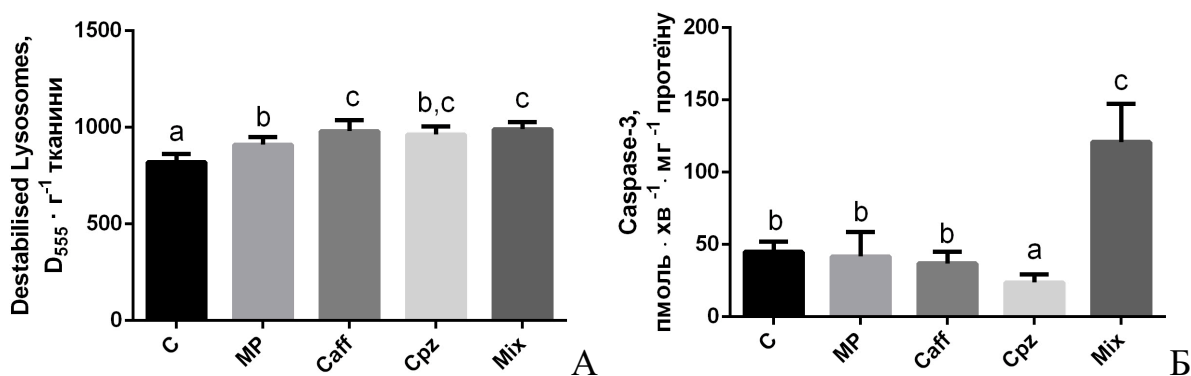


Рис. 3.3.1.1 Показники цитотоксичності у травній залозі *U. tumidus* після 14-денної експозиції до мікропластику (MP), кофеїну (Caff), хлорпромазину (Cpz) та їх суміші (Mix): А - дестабілізація лізосомальних мембран; Б - активність каспази-3, $M \pm SD$, $n=8$.

Результати нашого дослідження підтверджують, що навіть за впливу надзвичайно низьких концентрацій забруднювачів, особливо хлорпромазину, відбувається швидка й виражена дестабілізація лізосомальної мембрани.

Аналіз активності каспази-3 продемонстрував різноспрямовані ефекти залежно від характеру впливу. Експозиції мікропластику та кофеїну не призвели до суттєвих змін цього показника. Найбільш виражене зростання активності каспази-3 спостерігалось при комбінованій дії суміші забруднювачів, де значення показника перевищувало контроль майже у 2,7 раза (Рис. 3.3.1.1 Б). Варто зазначити, що лише Crz спричиняв пригнічення активності каспази-3, тоді як у попередніх дослідженнях на мідіях ця активність, як правило, залишалася незмінною або зростала (Impellitteri et al., 2024b; Khoma et al., 2022a). Це відповідає описаному у літературі ефекту Crz як індуктора апоптозу у вищих хребетних (Varga et al., 2017; Zhelev et al., 2004). Зокрема, показано, що клінічно релевантні дози Crz (до 20 мкМ або 0,65 мг·л⁻¹) індують апоптоз у лейкоцитних клітинах людини, не впливаючи на життєздатність нормальних лімфоцитів (Zhelev et al., 2004).

Важливо, що найбільш значущі зміни активності каспази спостерігалися саме за комбінованої дії забруднювачів, що свідчить про кумулятивний або синергічний ефект кількох стресорів. Такий проапоптотичний зсув може бути наслідком взаємного підсилення токсичної дії, що узгоджується з висновками Repnik and Turk (2010), а також із даними огляду Fong and Ford (2014), де підкреслюється багатогранність реакцій водних організмів на поєднання психоактивних речовин.

3.3.2 Оцінка стану життєздатності клітин у травній залозі *M. galloprovincialis*

У цьому дослідженні оцінка цитотоксичності у *M. galloprovincialis* здійснювалася на основі визначення активності каспази-3. Результати показали, що найсуттєвіший ефект спостерігався в групі впливу кофеїну, де активність каспази-3 знизилася вдвічі порівняно з контролем. В усіх інших експозиційних варіантах цей показник залишався на рівні контролю (Рис. 3.3.2.1).

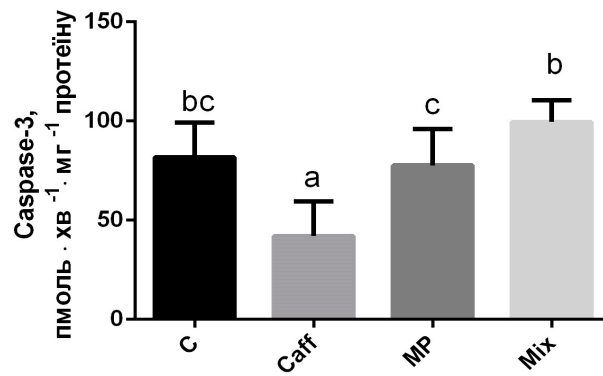


Рис. 3.3.2.1 Активність каспази-3 після 14-денної експозиції *M. galloprovincialis* до мікропластику (MP), кофеїну (Caff) та їх суміші (Mix), $M \pm SD$, $n=8$.

Зниження активності каспази-3 під впливом Caff відзначене вперше, хоча подібний ефект — зниження апоптотичної активності — спостерігався у *U. tumidus* при впливі ібупрофену (Martyniuk et al., 2022b). Різноманітність та функціональна специфіка каспаз у двостулкових моллюсків, порівняно з вищими хребетними, все ще недостатньо вивчені (Romero et al., 2015; Vogeler et al., 2021). Відомо, що підвищена експресія каспази-3 зазвичай асоціюється з дегенеративними клітинними процесами (Motta et al., 2013), у той час як пригнічення її активності може бути маркером протизапальних чи цитопротекторних змін (Smith et al., 2017). Варто відзначити, що ефект Caff, виявлений у цьому дослідженні, є протилежним до його відомого впливу на клітини ссавців: у людини кофеїн здатний стимулювати апоптоз за мітохондріально-залежним шляхом (Lu et al., 2008), пригнічувати ріст пухлинних клітин і активувати шлях каспази-9/-3 (Liu et al., 2017; Ku et al., 2011). Однак подібні ефекти у мідій не були зафіксовані, що підкреслює видові відмінності у механізмах цитотоксичної відповіді.

Аналіз показників цитотоксичності у *M. galloprovincialis* у експозиціях двох концентрацій хлорпромазину дозволив виявити суттєві зміни життєздатності клітин. Найбільш чутливими до впливу Crz виявилися лізосомальні показники, спостерігалось прогресуюче зростання числа дестабілізованих лізосом у групах Crz I та Crz II порівняно з контролем, що свідчить про значну втрату клітинної життєздатності (Рис. 3.3.2.2 А).

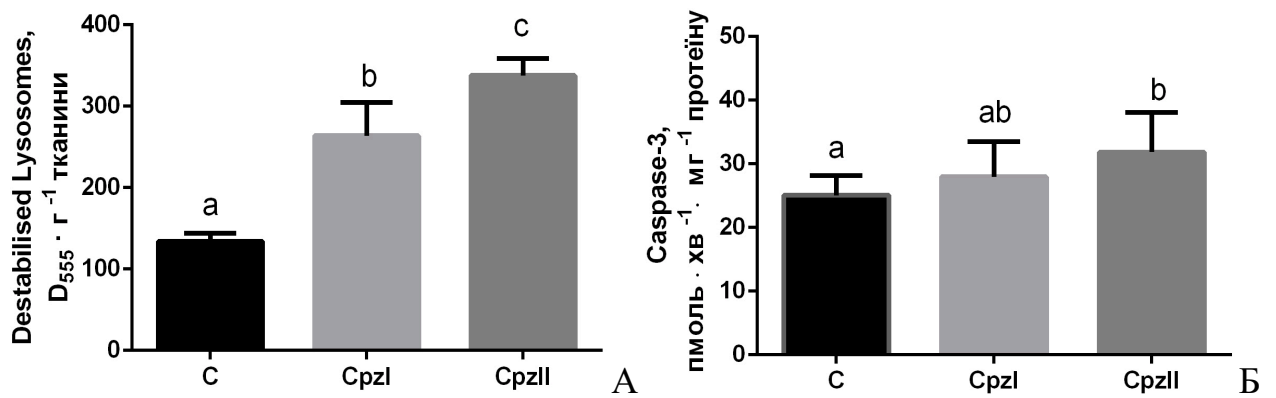


Рис. 3.3.2.2 Цитотоксичні ефекти хлорпромазину двох концентрацій 12 нг·л⁻¹ (Cpz I) та 12 мкг·л⁻¹ (Cpz II) у травній залозі *M. galloprovincialis* після 14-денної експозиції: А — дестабілізація лізосомальних мембран; Б — активність каспази-3, M±SD, n=8.

Активність цитозольної каспази-3, залишалася на рівні контролю при меншій концентрації Cpz, але достовірно зростала (на 27%) у групі Cpz II (Рис. 3.3.2.2 Б). Такий ефект вказує на активацію програмованої клітинної загибелі за умов більш вираженого токсичного навантаження і може свідчити про ініціацію молекулярних подій апоптотичного шляху, асоційованих із надлишком Cpz у тканинах. Водночас накопичення токсиканта супроводжувалося посиленням протеолізу у лізосомах і руйнуванням їх мембран — це підтверджує участь лізосомальної функції у реалізації механізмів клітинної загибелі (Artal-Sanz et al., 2006; Martínez-Gomez et al., 2015).

Подібні результати були отримані і в інших дослідженнях: зниження стабільності лізосомальної мембрани на 50% продемонстровано у гемолімфі *Ruditapes philippinarum* під дією екологічно релевантних концентрацій кофеїну, ібупрофену, карбамазепіну та новобіоцину (Aguirre-Martínez et al., 2013).

Таким чином, наші результати свідчать, що навіть при активації систем детоксикації і стресових відповідей (зокрема у групі Cpz I), накопичення Cpz у тканинах може призводити до деструктивних змін — активації апоптотичного каскаду та лізосомальної нестабільності.

Висновок до підрозділу 3.3

Встановлено, що універсальним проявом цитотоксичності для обох видів молюсків є дестабілізація лізосомальних мембран. Лізосомальні мембрани обох видів виявилися найбільш чутливою мішенню, демонструючи втрату стабільності навіть за низьких концентрацій ксенобіотиків, особливо хлорпромазину. Водночас реакція апоптотичного каскаду має виражену видоспецифічність: у *U. tumidus* пригнічення активності каспази-3 провокується дією хлорпромазину, тоді як у *M. galloprovincialis* аналогічний ефект викликає експозиція до кофеїну. Характерною особливістю комбінованого впливу чинників у обох видів є активація каспази-3. Такий проапоптотичний зсув за умов мультикомпонентного стресу сприяє ефективному елімінуванню пошкоджених клітин.

Представлені у підрозділі 3.3. результати опубліковано у статтях Impellitteri et al., 2023b; Impellitteri et al., 2024b; Yunko et al., 2024b; Yunko et al., 2025).

РОЗДІЛ IV. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

4.1 Особливості реакцій *U. tumidus* та *M. galloprovincialis* на вплив хімічних чинників

4.1.1 Біохімічні стратегії адаптації *U. tumidus* за умов окремої та комбінованої дії мікропластику та психоактивних препаратів

Перша серія експерименту була спрямована на з'ясування біохімічних механізмів реакції прісноводних молюсків *U. tumidus* на ізольований та комбінований вплив мікропластику, кофеїну та хлорпромазину. Аналіз результатів попередніх досліджень (Khoma et al., 2020b; Khoma et al., 2022a; Martyniuk et al., 2023; Martyniuk et al., 2024) дає ґрунтовні підстави прогнозувати, що експозиція з багатоконпонентною сумішшю спричинить специфічну модифікацію біохімічних відповідей *U. tumidus*, які раніше фіксувалися за окремої дії кожного з токсикантів.

Для інтегральної оцінки міжгрупових відмінностей та визначення ключових біомаркерів-дискримінаторів застосовано канонічний дискримінантний аналіз (Рис. 4.1.1.1). Побудована модель є статистично значущою (лямбда Вілкса = 0,000; $p < 0,001$) і забезпечує 100% точність класифікації вибірок. Перші дві канонічні функції сумарно охоплюють 89,5% загальної міжгрупової дисперсії.

Перша канонічна вісь (55,4% дисперсії) виявила найтісніший зв'язок із рівнем протеїнових карбонілів (PC, 0,961) та активністю ензимів антиоксидантного захисту (Mn-SOD, -0,456; CAT, -0,447). Саме ця координата забезпечує чітку просторову ізоляцію групи комбінованого впливу (Міх, центроїд -11,666) від усіх інших варіантів досліду (Табл. 4.1.1.1). Таке відокремлення є прямим доказом того, що спільна дія суміші формує унікальний біохімічний профіль, який не є простою сумою ефектів її компонентів.

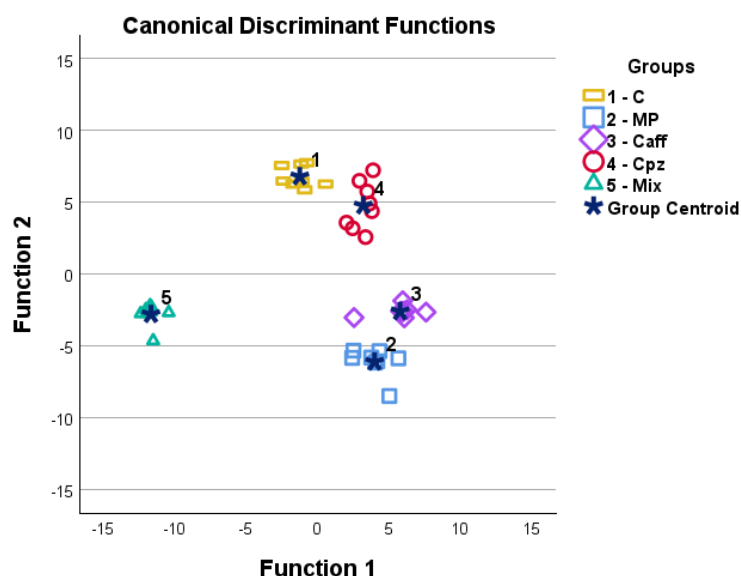


Рис. 4.1.1.1 Розподіл експериментальних груп *U. tumidus* у просторі канонічних дискримінантних функцій. Примітки: 1 — Контроль (C); 2 — Мікропластик (MP); 3 — Кофеїн (Caff); 4 — Хлорпромазин (Cpz); 5 — Суміш (Mix). Зірочками позначено центроїди груп. Модель базується на покроковому відборі змінних (точність класифікації — 100%).

Друга вісь (34,1% дисперсії), що детермінується показниками енергетичного метаболізму та редокс-статусу (NADH, 0,585; RI GSH, 0,277), дає змогу розмежувати ефекти мікропластику й кофеїну від контрольних значень та специфічної дії хлорпромазину. Це підтверджує припущення про неадитивну взаємодію компонентів суміші, де індивідуальні реакції нівелюються на користь формування цілісної кумулятивної відповіді організму.

Таблиця 4.1.1.1

Значення канонічних дискримінантних функцій у центроїдах експериментальних груп *U. tumidus* за дії мікропластику, кофеїну, хлорпромазину та їх суміші

Група	Функція			
	1	2	3	4
C	-1,255	6,793	-3,353	,549
MP	3,977	-6,129	-,100	1,416
Caff	5,760	-2,616	-1,526	-1,569
Cpz	3,184	4,763	4,247	-,035
Mix	-11,666	-2,811	,732	-,361

Щоб деталізувати молекулярні механізми, які лежать в основі виявленої диференціації, було застосовано метод головних компонентів (PCA) з обертанням факторів за методом Varimax (Рис. 4.1.1.2). Придатність масиву даних для аналізу підтверджено значенням міри адекватності Кайзера-Мейера-Олкіна (КМО = 0,627) та високою статистичною значущістю критерію Бартлетта ($p < 0,001$). У результаті аналізу виділено два головні компоненти, які сукупно пояснюють 43,8% загальної дисперсії показників.

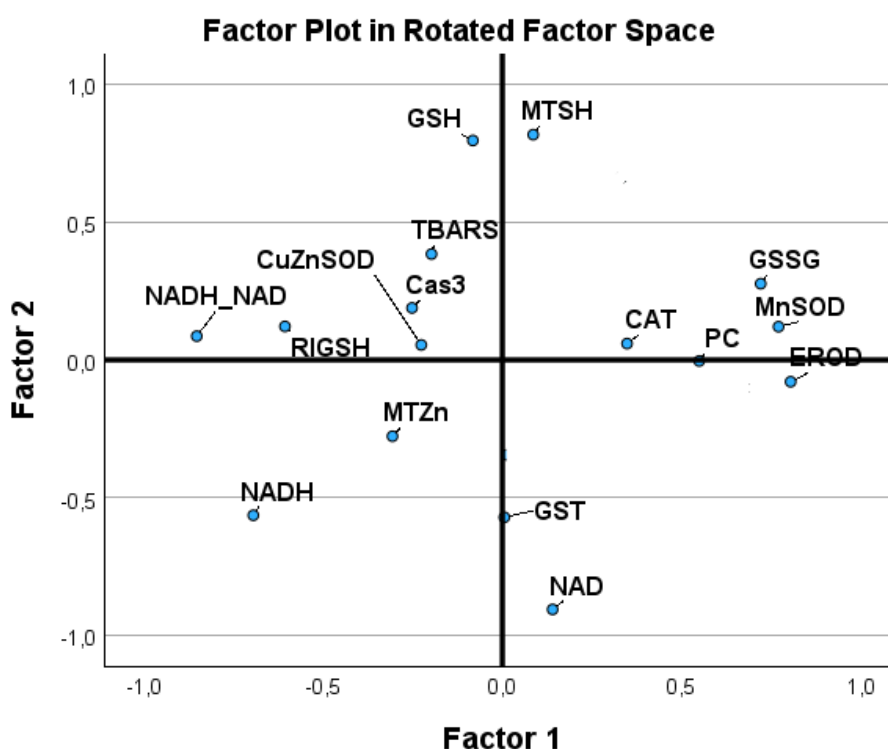


Рис. 4.1.1.2 Результати багатовимірного аналізу головних компонентів (PCA) показників травної залози двостулкового молюска *U. tumidus* при дії на організм мікропластику, кофеїну, хлорпромазину та їх суміші.

Перший компонент (24,3% дисперсії) характеризує розвиток окисного стресу та інтенсифікацію процесів біотрансформації (Табл. 4.1.1.2). Найбільші позитивні навантаження в межах цього компонента мають активність EROD (0,804), Mn-SOD (0,771), концентрація GSSG (0,721). Водночас встановлено сильний негативний зв'язок із показниками відновлювального потенціалу клітини: співвідношенням $NADH/NAD^+$ (-0,853) та концентрацією NADH (-0,695). Така структура компонента відображає закономірне виснаження пулу

відновлених нікотинамідних коензимів внаслідок активації захисних систем I фази детоксикації та накопичення продуктів вільнорадикального пошкодження.

Другий компонент (19,6% дисперсії) відображає стан тілової ланки антиоксидантного захисту та енергозалежних регуляторних механізмів. Основними маркерами тут виступають концентрація металотіонеїнів (MT-SH, 0,817) і відновленого глутатіону (GSH, 0,796).

Таблиця 4.1.1.2

Матриця факторних навантажень (після Varimax-обертання) біохімічних показників травної залози *U. tumidus* за дії мікропластику, кофеїну, хлорпромазину та їх суміші

Показники	Фактор 1	Фактор 2
NADH/NAD ⁺	-,853	,086
EROD	,804	-,079
Mn-SOD	,771	,120
GSSG	,721	,276
NADH	-,695	-,564
RI GSH	-,607	,121
PC	,549	-,004
CAT	,348	,059
Zn-MT	-,307	-,277
Cas-3	-,252	,188
Cu, Zn-SOD	-,226	,054
NAD ⁺	,140	-,906
MT-SH	,086	,817
GSH	-,082	,796
GST	,005	-,571
TBARS	-,198	,384

Слід зазначити, що такі показники як Cas-3 та CAT не виявили статистично значущих навантажень (< 0,4) на виділені компоненти. Це вказує

на їхню відносну автономність у загальній системі метаболічної відповіді молюсків на досліджувані чинники. Водночас вміст ТБК-активних продуктів виявив помірну кореляцію з другим фактором (0,384), що свідчить про його зв'язок із перебудовою тілової системи захисту.

Логічним продовженням аналізу молекулярних механізмів токсичності стала інтегральна оцінка метаболічного стану *U. tumidus*, здійснена за методом IBR (Devin et al., 2014). Цей підхід дозволив встановити чітку залежність сумарного токсичного навантаження від типу чинника (Рис. 4.1.1.3 А). Отриманий ієрархічний ряд за ступенем зростання індексу IBR — Cpz (1,8) < Caff (2,4) < C (2,8) < MP (3,3) < Mix (4,4) — підтверджує гіпотезу про інтенсифікацію стресового навантаження за умов комбінованого впливу (Рис. 4.1.1.3 Б) (Khoma et al., 2022a; Martyniuk et al., 2024).

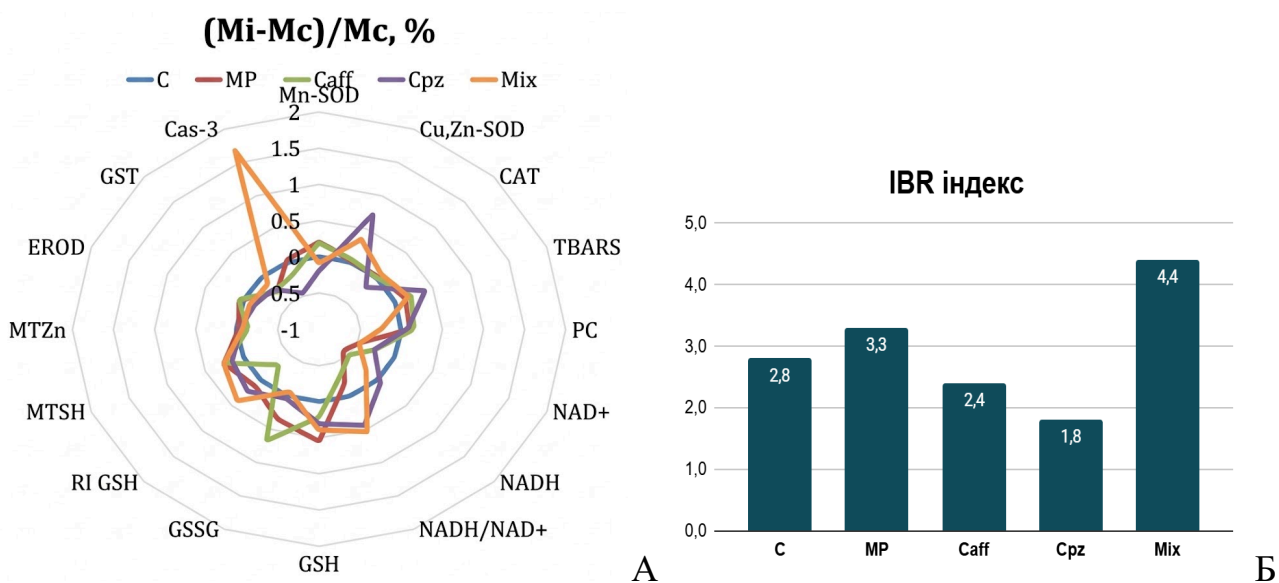


Рис. 4.1.1.3 Інтегральний показник біомаркерної відповіді (індекс IBR) у травній залозі молюсків *U. tumidus* за умов окремої та комбінованої дії мікропластику, кофеїну та хлорпромазину: А – радіальна діаграма стандартизованих значень біомаркерів (складові індексу); Б – значення індексу IBR.

Примітка: IBR індекс розраховували за методом Devin et al. (2014). Середні значення кожного біомаркера (X) стандартизували за формулою $Y = (X - m) / D$, де m та SD — загальне середнє значення та стандартне відхилення для

всіх умов експерименту відповідно. Далі обчислювали показник $S = Y + |\text{Min}|$, де Min — мінімальне значення Y для конкретного біомаркера серед усіх варіантів впливу. Отримані величини S , що вказують на градієнт відповіді біомаркерів використовували для побудови радіальної діаграми. Фінальне значення індексу IBR визначали як суму площ усіх її секторів.

Попри специфіку кожного чинника, зафіксовано наявність широкого спектру спільних ознак ранньої неспецифічної відповіді (Giraud-Billoud et al., 2024). Ключовим проявом у всіх експериментальних групах стало окисне пошкодження ліпідів, що є найбільш розповсюдженою реакцією гідробіонтів на токсичний вплив (Hook et al., 2014; Regoli et al., 2011). Важливо, що інтенсивність окисного пошкодження ліпідів була пов'язана не з активністю класичних антиоксидантних ензимів (Cu,Zn-SOD, CAT), а з станом редокс-активних тіолів — GSH та MT-SH.

Особливе значення для розуміння стратегії виживання молюсків має стан пулу нікотинамідних коензимів. Зниження концентрацій NAD^+ та NADH (за винятком групи Crz) свідчить про інгібування шляхів анаеробного метаболізму та виснаження механізмів клітинної стійкості до стресу (Müller et al., 2012; Telek et al., 2023). Окисні пошкодження, є закономірним наслідком виснаження пулу відновлювальних еквівалентів клітини (Xiao and Loscalzo, 2020). При цьому характер редокс-дисбалансу залежав від типу експозиції: зростання співвідношення NADH/NAD^+ та підвищення редокс-індексу глутатіону (RI GSH) у групах Crz та Mix вказують на запуск адаптивного метаболічного пере програмування. Такий «анаеробний зсув» є типовим для факультативних анаеробів у стані гіпоксії, спровокованому невідповідними зовнішніми подразниками (Sokolova et al., 2023; Storey, 2015). Аналогічне зростання співвідношення NADH/NAD^+ раніше фіксувалося у *U. tumidus* за умов ідентичної 14-добової експозиції з мікропластиком ($1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$, розмір часток $0,1\text{--}0,5 \text{ мм}$), ібупрофеном ($0,8 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$) та їхньою комбінацією (Martyniuk et al., 2022b), а також під дією МР ($1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$, розмір 2 мкм), антибіотика саліноміцину та їхньої суміші (Martyniuk et al., 2024). Анаеробний зсув був зареєстрований у

прісноводного краба (*Sinopotamon henanense*) після 10 днів впливу CdCl_2 (Yang et al., 2015) та *Drosophila melanogaster* після 10 годин голодування (Zhu and Rand, 2012). Разом з тим, встановлення чіткої кореляції між вираженістю відновного зсуву в тканинах молюсків та інтенсивністю токсичного навантаження потребує подальших досліджень.

Найбільш суттєвий окисно-відновний зсув був відзначений для металотіонеїну. Порівняння концентрацій загального (MT-SH) та металізованого (Zn-MT) металотіонеїну показало збільшення частки апо-MT відносно контрольних значень. Таке зростання вказує на їхню мобілізацію для виконання функції редокс-буферів (Mosna et al., 2023). Незважаючи на майже 20-разову різницю в концентраціях між зв'язаними з металотіонеїнами тіолами ($0,15\text{--}0,19$ мкмоль·г⁻¹ тканини, що включає 21 цис-залишок на молекулу) та пулом GSH у травній залозі молюсків, ці високореактивні групи є важливими регуляторами редокс-статусу (Kreżel and Maret, 2017; Mosna et al., 2023). При цьому саме акумуляція GSH створює умови для підтримки апотіонеїну у відновленому стані, забезпечуючи його функціональність як редокс-буфера (Xiao and Loscalzo, 2020). Важлива роль GSH у процесах метаболічної адаптації двостулкових молюсків до впливу мікропластику та фармацевтичних препаратів була продемонстрована у попередніх дослідженнях (Martyniuk et al., 2024).

Поряд із молекулярними механізмами захисту, критично важливою є оцінка збереження цілісності клітинних структур за умов токсичного навантаження. Оцінка стабільності лізосомальних мембран, яка є визнаним критерієм життєздатності клітин (Pantea et al., 2023), підтвердила їхню дестабілізацію за усіх варіантів експозиції, що також було продемонстровано за ідентичного впливу мікропластику та його суміші з кофеїном у травній залозі *M. galloprovincialis* (Impellitteri et al., 2023b). Така реакція, зафіксована навіть за дії наднизьких концентрацій хлорпромазину, зумовлена тим, що саме лізосоми виступають первинною мішенню для токсичного впливу забруднювачів. Водночас розвиток клітинного стресу супроводжувався порушенням гомеостазу есенціальних металів. Зокрема, системний ефект усіх застосованих впливів

чітко простежувався через зміну співвідношення Zn/Cu. Діагностична цінність цього показника обґрунтована у запатентованому «Способі біоіндикації загальної токсичності водних екосистем» (Патент України № 158278). Як свідчать наші обрахунки, за нормальних фізіологічних умов вміст цинку в організмі двостулкових молюсків має у 5–6 разів перевищувати вміст купруму. Відповідно, зниження цього індексу є прямим свідченням розвитку патологічних станів та запальних процесів під дією ксенобіотиків. Універсальність такого механізму підтверджується даними літератури (Osredkar and Sustar, 2011), які доводять, що зниження співвідношення Zn/Cu є загальнобіологічним маркером імунного та окисного стресу, безпосередньо пов'язаного з виснаженням металотіонеїнової системи. З огляду на ці закономірності, а також на здатність фенотіазинів пригнічувати зв'язування кальцію із Ca-залежними протеїнами (Varga et al., 2017) на тлі взаємопов'язаних шляхів транспорту Ca та Zn у двостулкових молюсків (Vercauteren and Blust, 1999).

Отже, результати свідчать про вразливість прісноводних молюсків до ксенобіотиків навіть за їхніх слідових (нМ–пМ) концентрацій. Індикатором та основним механізмом такої вразливості виступає дестабілізація окисно-відновного гомеостазу.

Специфічні прояви впливу

Відомості щодо особливостей специфічного впливу досліджуваних ксенобіотиків на двостулкових молюсків наразі є обмеженими та суперечливими. У межах проведеного експерименту **вплив мікропластику** виявився найслабшим з-поміж усіх досліджуваних чинників, причому без прояву специфічних біохімічних відповідей. Менша вираженість токсичності МР порівняно з фармацевтичними препаратами узгоджується з попередніми дослідженнями для *D. polymorpha* та *U. tumidus* за дії частинок МР розміром 2 мкм, 30–35 мкм та 0,1–0,5 мм (Martyniuk et al., 2023; Matskiv et al., 2024), де також не фіксувалося змін утворення TBARS, активності EROD та каспази-3. Враховуючи використання екологічно релевантної концентрації поліетилену

(Baroja et al., 2021), логічно припустити, що експозиція за верхньою межею екологічно значущих концентрацій викликає у молюсків лише ранню адаптивну реакцію на стрес без ознак специфічного токсичного ураження. У підсумку, отримані результати підтверджують багатогранний характер біохімічної дії МР, основу якої становлять окисний стрес та порушення енергетичного метаболізму, що виступає типовою неспецифічною відповіддю на забруднення водного середовища (Canesi et al., 2015; Wang et al., 2021).

Токсична **дія кофеїну** виявилася значно вираженішою порівняно з іншими чинниками. Лише кофеїн індукував процеси деметалювання металотіонеїнів, що призводило до максимального накопичення їхньої апоформи. Разом із зростанням рівня GSSG та зниженням індексу RI GSH, така динаміка вказує на інтенсивне залучення тіолових пулів до перебігу окисно-відновних реакцій. Відповідно, за умов експозиції з Caff фіксувався найбільш виражений прооксидантний зсув. Зіставлення цих результатів із даними щодо реакції *D. polymorpha* за ідентичних умов навантаження (20 мкг·л⁻¹ Caff протягом 14 діб) дозволило виявити видо- та популяційно-специфічні особливості метаболічної відповіді (Matskiv et al., 2024). Загалом, літературні дані підтверджують, що філогенетично та фізіологічно відмінні види гідробіонтів здатні демонструвати варіабельні біологічні реакції на дію екологічно релевантних концентрацій кофеїну (Baracchini et al., 2023; Diogo et al., 2023). Специфічним маркером токсичної дії Caff виявилася активація EROD. Ключова роль ензимів I фази біотрансформації у метаболізмі кофеїну та здатність останнього стимулювати їхню активність добре відомі з досліджень на вищих хребетних (Turesky et al., 2003). Відомо, що біотрансформація Caff здійснюється переважно за участю ізоензиму CYP1A2 (Broderick et al., 2005; Yartsev and Peisah, 2021). Більше того, Caff традиційно використовується як маркерний субстрат для оцінки каталітичної активності ізоформ CYP450 у печінці ссавців (людини та щурів), хоча шляхи його деградації різняться: через 3-N-деметилування у людини та С-8-гідроксилування у щурів (Kot and Daniel, 2008). Виявлена у нашому

дослідженні кофеїн-індукована активація CYP450-асоційованих ензимів у двостулкових молюсків повністю узгоджується з результатами попередніх робіт. Зокрема, аналогічне підвищення активності EROD фіксувалося у *Corbicula fluminea* за умов 21-добової експозиції з 15 та 50 мкг·л⁻¹ Caff (Aguirre-Martínez et al., 2015), а також у *D. polymorpha* на тлі 14-денного сумісного впливу 20 мкг·л⁻¹ Caff та MP (Matskiv et al., 2024). Такі результати підтверджують високий ступінь еволюційної консервативності реакцій біотрансформації кофеїну, демонструючи їхню глибоку структурно-функціональну аналогію з відповідними процесами у вищих хребетних.

Незважаючи на те, що індекс IBR для групи Crz виявився найнижчим з-поміж усіх досліджуваних варіантів, а його відхилення від контрольних значень — мінімальним, саме цей чинник індукував найбільш специфічні біохімічні реакції. Зокрема, за умов дії **хлорпромазину** фіксувалося пригнічення активності Mn-SOD та каталази на тлі одночасної активації Cu,Zn-SOD. Як повідомлялося раніше, Crz здатний стимулювати активність Cu,Zn-SOD через механізм інгібування каналів, що активуються вивільненням кальцію (Choi et al., 2001; Umemoto et al., 2004). Поряд із цим, спостерігалось зниження вмісту цинку порівняно з контролем. З огляду на здатність фенотіазинів пригнічувати зв'язування кальцію із Ca-залежними протеїнами (Varga et al., 2017) та враховуючи тісний взаємозв'язок транспортних систем Ca та Zn у двостулкових молюсків (Vercauteren and Blust, 1999), логічно припустити, що втручання в іонний обмін виступає ще однією специфічною мішенню токсичної дії Crz. Ознаки розвитку окисного стресу також реєструвалися у риб за дії хлорпромазину в діапазоні концентрацій від мкг·л⁻¹ до мг·л⁻¹ (Atama et al., 2022; Li et al., 2008). У нашому дослідженні експозиція з Crz додатково провокувала розвиток відновного стресу, що підтверджується зростанням співвідношень NADH/NAD⁺ та GSH/GSSG. Це узгоджується з літературними даними щодо здатності похідних фенотіазину модулювати шляхи окисно-відновної сигналізації у клітинах вищих хребетних (Egbujor et al., 2024).

У межах дослідження виявлено дві специфічні реакції на дію Crz, які відрізняються від раніше описаних у літературі. По-перше, виключно експозиція з Crz викликала пригнічення активності каспази-3, тоді як в інших дослідженнях на (*U. tumidus*, 18 мкг·л⁻¹) цей показник залишався незмінним або зростав (Khoma et al., 2022a). Така реакція є нетиповою, оскільки для вищих хребетних добре відомим є протилежний ефект — індукція апоптозу під впливом фенотіазинів (Varga et al., 2017; Zhelev et al., 2004). Варто зазначити, що у людей цей проапоптотичний вплив був доведений для клінічно значущих доз (до 20 мкМ, або 0,65 мг·л⁻¹) на моделі лейкемічних клітин без шкоди для життєздатності нормальних лімфоцитів (Zhelev et al., 2004).

Другим нетиповим проявом виявилось інгібування EROD, хоча відомо про зростання активності цього ензиму у *U. tumidus* за наномолярних концентрацій хлорпромазину (Khoma et al., 2022a). Відомо, що у мікросомах печінки людини з-поміж дев'яти найпоширеніших атипичних антипсихотиків саме Crz (у терапевтичному діапазоні 0,1–1 мкМ) був єдиним препаратом, здатним інгібувати активність CYP1A2, а також знижувати інтенсивність утворення 1'-гідроксибуфуралолу за участю CYP2D6 (Gervasini et al., 2013). Загалом, високий токсичний потенціал Crz підтверджується також на моделях плазми риб за концентрації 36 нг·л⁻¹ (Miller et al., 2019). У личинок *M. galloprovincialis* цей препарат пригнічував метаморфоз на 50% (IC₅₀) за концентрації 56 мкг·л⁻¹ (Yang et al., 2011). Для порівняння, у коловертки *Brachionus calyciflorus*, яка вважається високочутливою до фармпрепаратів порівняно з іншими безхребетними, несприятливі фізіологічні ефекти реєструвалися за значно вищих концентрацій — у межах 0,125–0,5 мг·л⁻¹ протягом семи діб (Feng et al., 2022). Це порівняння підтверджує особливо високу чутливість двостулкових молюсків до токсичної дії Crz порівняно з іншими модельними об'єктами (Gylytė et al., 2023).

Модифікація специфічних ефектів та посилення загального стресового навантаження за **умов комбінованого впливу** підтверджується найвищим значенням індексу IBR та чітким відокремленням групи Міх за результатами

дискримінантного аналізу. Подібний ефект пояснюється взаємодією між частинками мікропластику та гідрофобними (Caff) або катіонними амфифільними (Crz) речовинами у воді та/або взаємодією між реакціями на ці окремі сполуки в організмі. Однак сорбція Caff на MP при екологічно значущому складі суміші була дуже низькою (Liu et al., 2015; Seidensticker et al., 2018). Попри це, у поточному дослідженні комбінований вплив призвів до нівелювання кількох реакцій, притаманних ізольованій дії чинників. Подібні спотворення реакцій на окремі речовини у складі сумішей із фармацевтичними препаратами, засобами гігієни (Martyniuk et al., 2022 a,b), саліноміцином (Martyniuk et al., 2023, 2024), триклозаном (Syberg et al., 2017) або бензо[а]піреном (Gonzalez-Soto et al., 2019) були досліджені раніше. Зокрема, у поточному експерименті суміш дещо послабила прооксидантні ефекти окремих чинників. Так, активність Mn-SOD у групі Міх відповідала контрольним значенням, а рівень PC знизився, що не збігається з відповідями організму на окрему дію кожного зі чинників. Окремої уваги заслуговує той факт, що за комбінованої дії активність GST не знижувалася, хоча її пригнічення було характерним для окремого впливу кожного з чинників, включаючи MP, Caff та Crz як *in vivo*, так і *in vitro* (Khoma et al., 2022a; Türkan et al., 2021). Отримані дані дають підстави стверджувати, що залучення GST до GSH-залежних процесів більшою мірою пов'язане з регуляцією окисного пошкодження, ніж безпосередньо з хімічною природою ксенобіотиків, що узгоджується з результатами досліджень на різних експериментальних моделях (Roth et al., 2011; Bhagat et al., 2016). Зниження характерної для кофеїну активації EROD у складі суміші може пояснюватися конкуренцією між Caff та Crz за цей ензим біотрансформації (Broderick et al., 2005; Yartsev and Peisah, 2021). Найбільш суттєва відмінність між ізольованою та комбінованою дією зафіксована для активності каспази-3, що може відображати кумулятивний ефект множинних стресорів (Repnik and Turk, 2010). Отже, отримані дані узгоджуються з висновками Fong and Ford (2014) про те, що ефекти сумішей психоактивних

речовин є багатогранними та залежать як від складу комбінації, так і від специфіки організму-мішені.

4.1.2 Біохімічні стратегії резистентності *M. galloprovincialis* та особливості редокс-відповіді на ізольований і комбінований вплив мікропластику та кофеїну

Друга серія експерименту була спрямована на з'ясування біохімічних механізмів реакції морських молюсків *M. galloprovincialis* на окремих та комбінований вплив мікропластику та кофеїну. Оскільки поєднання цих чинників формує складну мережу метаболічних відповідей, для інтегральної оцінки стану організмів та виявлення прихованої структури взаємозв'язків між біомаркерами, весь масив отриманих даних було піддано багатовимірному статистичному аналізу.

У результаті проведення канонічного дискримінантного аналізу було встановлено, що біохімічні профілі чотирьох досліджуваних груп молюсків формують окремі кластери, які статистично достовірно відрізняються один від одного. Побудована класифікаційна модель забезпечила високу роздільну здатність: 95,8% випадків були розпізнані правильно під час процедури перехресної валідації, що підтверджує високу інформативність обраного комплексу біомаркерів. Структура відмінностей між групами визначається двома канонічними дискримінантними функціями.

Перша канонічна функція пояснює 61,5% загальної дисперсії, є основним вектором диференціації. Вона полярно розмежовує вплив кофеїну та його суміші з мікропластиком, розміщуючи ці групи на протилежних полюсах осі. Найбільший внесок у цю функцію мають рівень окисненого глутатіону (GSSG 1,386) та активність Mn-SOD (0,969). Натомість зміщення у від'ємну область (група Міх) зумовлене впливом каспази-3 (-1,046) та глутатіон-S-трансферази (-0,795). Це вказує на те, що додавання мікропластику до кофеїну кардинально змінює біохімічний профіль: з активації антиоксидантних ензимів на процеси апоптозу та детоксикації.

Друга канонічна функція, що акумулює 35,1% дисперсії, відображає специфічну відповідь на дію мікропластику. Вона чітко відокремлює групу MP від контрольної групи. Ключовими маркерами цієї функції виступають GSH (1,095), PC (1,006) та Zn-MT (0,871). Водночас маркер перекисного окиснення ліпідів TBARS має значний від'ємний внесок (-1,438). Такий розподіл підтверджує, що специфікою впливу мікропластику є мобілізація тіолових сполук на тлі накопичення окиснених протеїнів, що суттєво відрізняє цей стан від контролю.

Графічна візуалізація (Рис. 4.1.2.1) у просторі канонічних функцій демонструє, що група сумісної дії (Mix) займає ізольоване положення і не накладається на кластери окремих впливів. Такий результат доводить, що комбінований вплив не зводиться до арифметичної суми ефектів компонентів суміші, а формує унікальний профіль метаболічної відповіді, відмінний від тих, що спостерігаються за ізольованою дією кофеїну чи мікропластику.

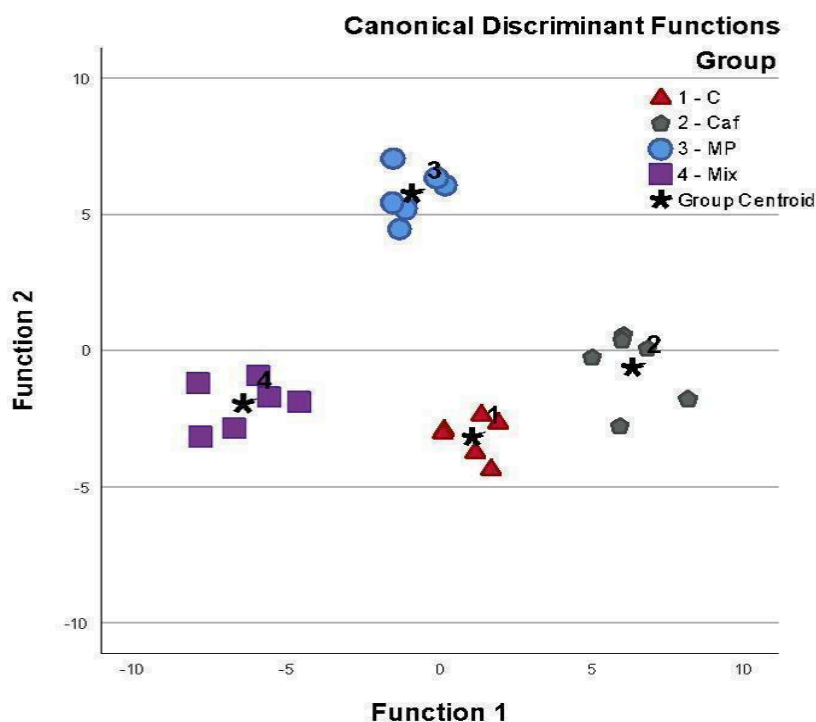


Рис. 4.1.2.1 Кластеризація груп *M. galoprovincialis* на основі біохімічних маркерів за умов роздільної та сумісної дії мікропластику і кофеїну. 1 — Контроль (C); 2 — Кофеїн (Caff); 3 — Мікропластик (MP); 4 — Суміш (Mix). Зірочками позначено центроїди груп.

Оскільки виявлена специфічність груп вказує на зміну домінуючих механізмів підтримання гомеостазу, наступним етапом аналізу стало виокремлення латентних чинників, що визначають ці стани. З цією метою до масиву експериментальних даних застосовували багатовимірний факторний аналіз. Як метод вилучення факторів застосовано метод головних осей (PCA) із подальшим ортогональним обертанням осей за алгоритмом Varimax (Рис. 4.1.2.2). Попередня статистична оцінка засвідчила, що масив даних є прийнятним для виокремлення факторів: значення міри вибіркової адекватності Кайзера-Мейєра-Олкіна становило 0,614, що перевищує мінімальний пороговий рівень, а тест сферичності Бартлетта засвідчив статистичну достовірність кореляцій ($\chi^2 = 111,703$; $p < 0,001$). За результатами моделювання було виокремлено дві незалежні компоненти, які сумарно пояснюють 47,65% повної дисперсії ознак і відображають ключові функціональні стани досліджуваних організмів.

Перша компонента (Фактор 1), яка акумулює 27,14% загальної дисперсії, інтерпретована як «система ензиматичного захисту та окисного пошкодження». До складу цього фактора з високими позитивними навантаженнями увійшли основні антиоксидантні ензими: Cu, Zn-SOD (0,767), Mn-SOD (0,717) та CAT (0,690). Характерною рисою даної латентної змінної є її тісна асоціація з маркерами деструктивних процесів та метаболічного напруження: GSSG (0,662), PC (0,591) та GST (0,573). Така конфігурація свідчить про те, що мобілізація ензиматичного апарату відбувається як компенсаторна реакція на вже реалізований окисний стрес.

Друга компонента (Фактор 2), що описує 20,52% дисперсії, відображає альтернативний механізм резистентності та визначений як «тіоловий буферний потенціал». Його структуру формують показники системи металотіонеїнів (MT-Zn — 0,665; MT-SH — 0,615 та GSH 0,384). Принциповою відмінністю цього фактора є обернений кореляційний зв'язок із маркерами окисного ураження — GSSG (-0,580) та TBARS (-0,464). Такий розподіл навантажень свідчить про те, що другий фактор відображає резервний потенціал організму.

Високий рівень тіолових сполук у цьому випадку діє як буфер, що знешкоджує токсиканти ще до того, як вони встигнуть зруйнувати клітинні мембрани. У підсумку, факторна модель розмежовує два фізіологічні сценарії реагування молюсків: стан успішної резистентності, забезпечений тіолами (Фактор 2), та стан мобілізації захисних сил на тлі вже наявного стресу (Фактор 1).

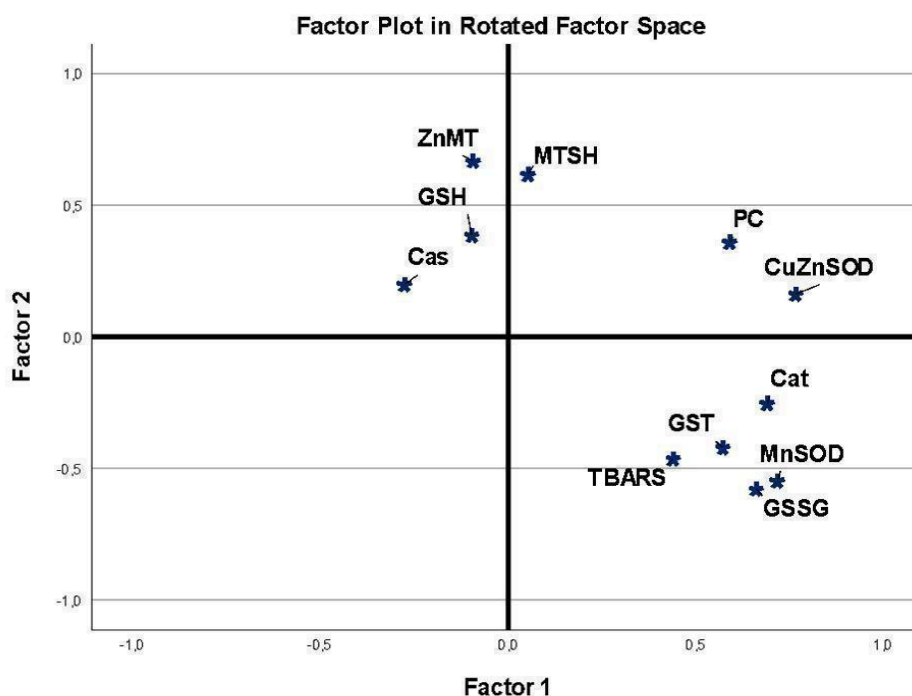


Рис. 4.1.2.2 Візуалізація взаємозв'язків між біохімічними маркерами *M. galoprovincialis* у двовимірному факторному просторі за умов окремої та комбінованої дії мікропластику, кофеїну.

Розвиток окисного стресу вважається одним із найбільш підтверджених механізмів негативного впливу антропогенних забруднювачів на гідробіонтів, що доведено як у польових дослідженнях, так і в умовах модельної експозиції до фармацевтичних препаратів та мікропластику (Aliko et al., 2019; Benedetti et al., 2022; Stoliar and Lushchak, 2012).

У поточному дослідженні не було виявлено чутливості відповіді системи окисного стресу мідій до окремої дії кофеїну. Натомість вплив мікропластику та його суміші з кофеїном викликав виражені біохімічні зрушення. Отримані результати вказують на збалансоване зниження активності антиоксидантних ензимів та рівнів утворення перекисного окиснення ліпідів під дією МР та, за

певними винятками Міх. Таку динаміку можна пояснити виснаженням захисних механізмів та енергетичних резервів організму на тлі зростаючих енергетичних потреб клітин під час субхронічної експозиції (Shang et al., 2021). Проте аналіз літературних даних щодо реакцій *Mytilus spp.* та інших морських безхребетних на дію МР свідчить, що найбільш поширеним проявом токсичності є саме пригнічення активності антиоксидантних ензимів та зниження інтенсивності перекисного окиснення ліпідів (Trestrail et al., 2020). Наприклад, тривала експозиція *Mytilus spp.* до МР з наступною депурацією викликала активацію SOD та CAT в травній залозі лише за низьких ($8 \text{ нг} \cdot \text{л}^{-1}$) та середніх ($10 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$) концентрацій, тоді як доза $100 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$ призводила до пригнічення їхньої активності (Revel et al., 2019). Водночас у подібному дослідженні на тихоокеанській устриці *Crassostrea gigas* значущих біологічних ефектів виявлено не було (Revel et al., 2020). У перлової устриці *Pinctada margaritifera* двомісячна експозиція до МР ($0,25\text{--}25 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$) індукувала концентраційнозалежне пригнічення антиоксидантного захисту (Gardon et al., 2020). Аналогічна тенденція спостерігалася і для *Mytilus edulis*: за короткочасного впливу (96 год) зафіксовано зниження активності CAT та GST у зябрах, а також SOD у травній залозі (Magara et al., 2018). При цьому за чотириденної експозиції активність каталази могла як зростати, так і знижуватися залежно від специфічних умов досліду (Magara et al., 2018; Magara et al., 2019).

Відсутність ознак окисної деструкції у молюсків груп МР та Міх, попри зниження активності SOD, CAT та GST, може пояснюватися ефективним функціонуванням неензиматичної ланки захисту, зокрема глутатіону та металотіонеїнів. Значне зростання індексу RI GSH у цих групах свідчить про високий редокс-потенціал, що забезпечує ефективну елімінацію вільних радикалів. Слід зазначити, що у сучасних дослідженнях (Trestrail et al., 2020) основними вивченими показниками окисного стресу є активність антиоксидантних ензимів та продукти перекисного окиснення ліпідів, тоді як роль редокс-буферів, особливо МТ, часто залишається поза увагою. Отримані

нами значення GSH узгоджуються з результатами Regoli and Principato (1995) та Cappello et al. (2021) для *M. galloprovincialis* у польових та лабораторних умовах. Високий вміст цистеїну (21 залишок у молекулі) зумовлює роль MT як цінного запасу редокс-активних тіолів. Забезпечуючи 100–150 нмоль·л⁻¹ тканини тіолів, вони суттєво доповнюють антиоксидантний потенціал GSH (~1 мкмоль·г⁻¹). Висока здатність MT молюсків до поглинання радикалів була підтверджена у численних дослідженнях (Gagné et al., 2007; Gnatyshyna et al., 2020; Khoma et al., 2020a,b; Khoma et al., 2022; Martyniuk et al., 2022b; Mourgaud et al., 2002; Santovito et al., 2021; Zorita et al., 2005), причому для *M. galloprovincialis* вона є вищою, ніж у риб чи ссавців (Buico et al., 2008). Зростання вмісту MT також фіксували за дії хлорпірифосу, що пов'язують із потребою у нейтралізації генерованих радикалів (Perić et al., 2017). У поточному дослідженні відповідність рівнів MT-SH та MT-Zn вказує на стабільне функціонування металотіонеїнів без порушення зв'язування металів у тіолатних кластерах. Важливо, що зниження рівня MT-Zn не було зафіксовано, який за літературними даними вважається потенційною мішенню для дії кофеїну (Ratajczak et al., 2021; Rossowska and Nakamoto, 1992).

Загалом, у нашому дослідженні не було виявлено чутливості системи окисного стресу мідій до ізольованої дії кофеїну. Проте, на тлі стабільності редокс-стану, лише за впливу Caff було зафіксовано зниження активності каспази-3. Варто зауважити, що апоптотична активність у водних безхребетних під впливом кофеїну раніше не вивчалася. Аналогічне пригнічення каспази-3 спостерігалось у молюска *U. tumidus* за дії ібупрофену протягом 14 днів (Martyniuk et al., 2022b). Однак біохімічний аналіз не виявив активованого апоптозу в групі Міх. Попри те, що наявність каспаз у двостулкових молюсків є доведеним фактом, розуміння їхньої різноманітності та функцій на сьогодні залишається обмеженим (Romero et al., 2015; Vogeler et al., 2021). Підвищення активності каспази-3 насамперед асоціюється з дегенеративними процесами (Motta et al., 2013), тоді як зниження її рівня може свідчити про розвиток протизапальних змін (Smith et al., 2017). Виявлений у цьому дослідженні ефект

Caff є протилежним до його відомого впливу на вищих хребетних. Зокрема, доведено, що кофеїн активує апоптоз у людських остеобластах через мітохондріально-залежний шлях, знижуючи життєздатність клітин залежно від дози (Lu et al., 2008). Також встановлено, що Caff пригнічує ріст клітин раку шлунка та індукує апоптоз шляхом активації каспаз-9/-3 (Liu et al., 2017), проявляючи аналогічну протиракову дію на моделях гліоми *in vitro* та *in vivo* (Ku et al., 2011).

Попри дискусійність ролі МР як вектора перенесення Caff (Seidensticker et al., 2018), результати не підтверджують значної сорбції речовини (Sleight et al., 2016), хоча взаємодія їхніх ефектів за 14-денної експозиції була очевидною. Незважаючи на здатність молюсків до елімінації частинок у формі псевдофекалій (de Sá et al., 2018), за тривалого впливу спостерігається їх значне накопичення в організмі як у природних (Sfriso et al., 2020), так і в експериментальних (Martyniuk et al., 2022a,b) умовах.

Побудована дискримінантна модель відображає формування специфічних профілів відповіді для кожної групи, зокрема для групи Міх. Поєднання Caff та МР модифікує характер реакцій на кожен чинник окремо. Найбільш виразно це виявилось у послабленні реакцій каспази-3 та МТ-SH (група Caff) та МТ-SH, GSH, GST і TBARS (група МР). Модулююча роль Caff у сумішах описана для нейротоксичності пестицидів у мишей (Kachroo et al., 2010) та захисного ефекту щодо миш'яку та ртуті у прісноводного молюска *Lamellidens corrianus* (Dhondiram and Popatrao, 2014). Аналогічно, МР здатний модулювати токсичність бензо[а]пірену для *M. galloprovincialis* (González-Soto et al., 2019), а також ібупрофену (Martyniuk et al., 2022a,b), триклозану (Syberg et al., 2017) та саліноміцину (Martyniuk et al., 2023). Це підтверджує, що комбінований вплив суттєво змінює біологічні ефекти окремих компонентів.

Таким чином, отримані нами результати узгоджуються з даними інших авторів і розширюють розуміння специфіки метаболічних відповідей молюсків залежно від виду, концентрації забруднювачів та розміру частинок мікропластику.

4.1.3 Концентраційнозалежні закономірності метаболічної відповіді *M. galloprovincialis* на вплив хлорпромазину

Третя серія експерименту була спрямована на з'ясування біохімічних механізмів морських молюсків *M. galloprovincialis* на вплив різних концентрацій хлорпромазину. Використання двох екологічно релевантних концентрацій (12 нг·л⁻¹ та 12 мкг·л⁻¹) обґрунтоване необхідністю оцінки адаптаційних реакцій організму за різних сценаріїв хронічного забруднення акваторій. Застосування концентрації 12 нг·л⁻¹ забезпечує коректне порівняння з результатами першої серії експерименту на прісноводних молюсках за умов слідових кількостей препарату. Водночас вибір у 1000 разів вищої дози (12 мкг·л⁻¹) дає змогу дослідити концентраційнозалежну динаміку біохімічних змін в умовах локального підвищення концентрації забруднювача.

Верифікація концентраційнозалежного характеру впливу нейролептика була здійснена за допомогою канонічного дискримінантного аналізу (Рис. 4.1.3.1).

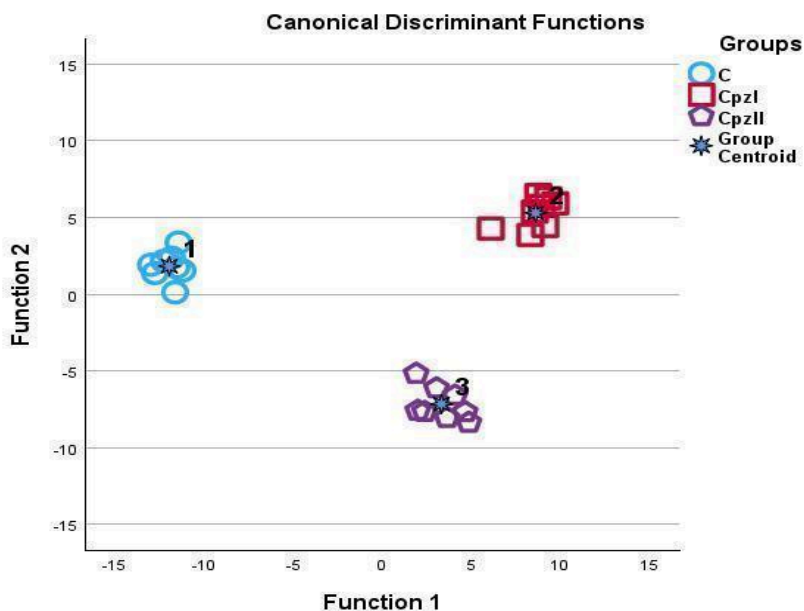


Рис. 4.1.3.1. Дискримінантний аналіз біохімічних профілів *M. galloprovincialis* за умов впливу хлорпромазину. 1 — Контроль (C); 2 — Хлорпромазин (12 нг·л⁻¹) (Cpz I); 3 — Хлорпромазин (12 мкг·л⁻¹) (Cpz II). Зірочками позначено центроїди груп.

Аналіз положення центроїдів груп (С: -1,255; Срз I: 3,977; Срз II: 5,760) свідчить про прогресуюче відхилення біохімічного статусу молюсків від фізіологічної норми зі збільшенням концентрації препарату. Чітка ізоляція групи Срз II в просторі першої дискримінантної функції детермінована активацією каспази-3 та критичною лізосомальною нестабільністю. Це свідчить про досягнення порогу декомпенсації, за яким інактивація каталази та виснаження детоксикаційних ресурсів призводять до незворотного переходу від метаболічного стресу до системної цитотоксичності та ініціації апоптотичного каскаду (Ficarra et al., 2016; Repnik and Turk, 2010).

Для системної оцінки структури метаболічних порушень у морського молюска *M. galloprovincialis* за умови впливу різних концентрацій хлорпромазину було застосовано метод аналізу головних компонентів (РСА) з використанням Varimax-обертання факторної матриці (Рис. 4.1.3.2) Виділена двофакторна модель сукупно описує 74,6 % загальної дисперсії показників, що дозволяє диференціювати механізми прямої цитотоксичної дії препарату та енергозатратної відповіді систем детоксикації (Табл. 4.1.3.1).

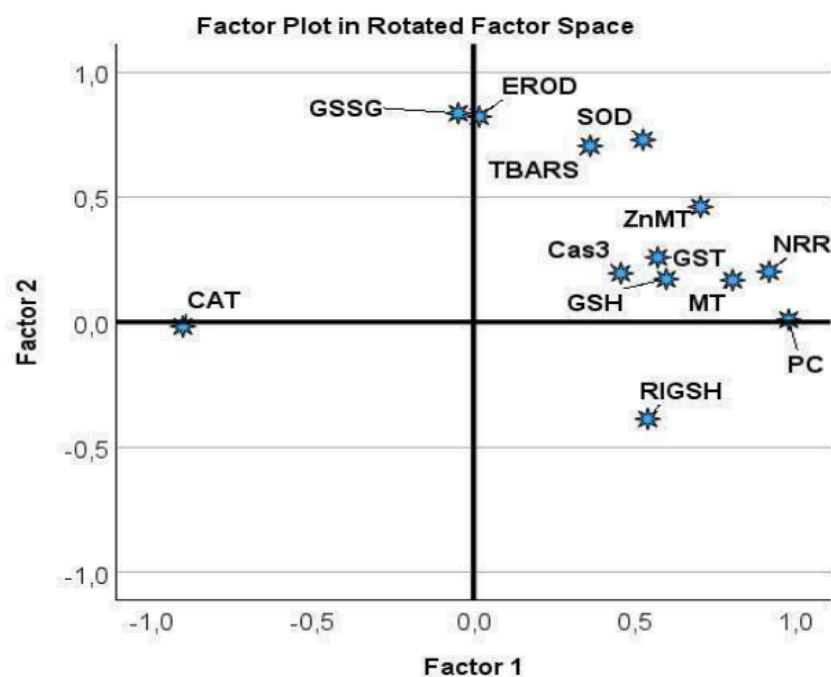


Рис. 4.1.3.2. Проекція біохімічних показників травної залози *M. galloprovincialis* на площину перших двох головних компонентів за умов впливу хлорпромазину.

Розподіл біохімічних показників травної залози *M. galloprovincialis* між двома першими факторами факторного аналізу за дії хлорпромазину

Показники	Фактор 1	Фактор 2
SOD	,528	,728
CAT	-,904	-,018
GST	,573	,258
GSH	,600	,172
GSSG	-,048	,834
RI GSH	,542	-,387
TBARS	,363	,704
PC	,981	,009
MT	,806	,167
MT-Zn	,706	,460
Cas-3	,458	,195
NRR	,920	,201
EROD	,018	,821

Перший головний компонент (43,2 % дисперсії) інтегрує маркери деструктивних змін макромолекул та органел на тлі пригнічення ензиматичної ланки захисту. Найвищі позитивні навантаження в межах цього фактора мають рівень протеїнових карбонілів (PC, 0,981), показник дестабілізації лізосомальних мембран (NRR, 0,920) та загальний вміст металотіонеїнів (MT, 0,806), тоді як для активності каталази встановлено сильне негативне навантаження (CAT, -0,904). Така структура фактора математично підтверджує, що ключовою подією в розвитку токсичності є інактивація каталази, яка призводить до неконтрольованого накопичення пероксиду водню та його трансформації у високореактивний гідроксильний радикал (Alam et al., 2022;

Ransy et al., 2020). Це, у свою чергу, детермінує окисну модифікацію протеїнів та руйнування лізосомальних мембран (Ficarra et al., 2016), що супроводжується компенсаторною мобілізацією металотіонеїнів як потужного неензиматичного редокс-буфера (Sato and Kondoh, 2002).

Другий головний компонент (31,4 % дисперсії) відображає функціональну активацію систем біотрансформації ксенобіотиків та зумовлений цим прооксидантний зсув у клітинах травної залози. Високі позитивні навантаження активності EROD (0,821) свідчать про активне залучення мікросомальних монооксигеназ системи цитохрому P450 до метаболічної конверсії хлорпромазину, що є закономірним процесом для сполук з високим показником ліпофільності ($\log K_{ow} = 5,35$) (Tanoue et al., 2020).

Оскільки функціонування даної ензиматичної системи асоційоване з посиленою генерацією супероксидного радикалу як побічного продукту монооксигеназної реакції, спостерігається компенсаторна стимуляція супероксиддисмутази (SOD, 0,728). Паралельне накопичення окисненого глутатіону (GSSG, 0,834) в межах цього фактора вказує на інтенсифікацію глутатіонпероксидазного шляху нейтралізації пероксиду водню (Manduzio et al., 2005), що відображає високу реактивність тіолової ланки у відповідь на посилення вільнорадикальних процесів (Xiao and Loscalzo, 2020).

Характер розвитку окисного стресу суттєво залежить від інтенсивності токсикологічного навантаження (Lushchak, 2011; Moreira et al., 2016). Результати дослідження свідчать, що, попри компенсаторне підвищення активності окремих ланок антиоксидантного захисту (SOD, GSH) та маркерів окисного пошкодження (TBARS, PC, GSSG), загальний вектор дисбалансу мав виражений прооксидантний напрямок. Найбільш вразливою мішенню до дії фармацевтичного препарату хлорпромазину виявилася каталаза. Пригнічення її активності за обох досліджуваних експозицій є ключовою подією прооксидантного зсуву, оскільки це сприяє надмірному накопиченню пероксиду водню та високореактивного гідроксильного радикала — проміжних продуктів активності SOD, що в підсумку призводить до масштабніших окисних

пошкоджень макромолекул (Alam et al., 2022; Ransy et al., 2020). Виявлена закономірність цілком узгоджується з даними літератури щодо порушення антиоксидантної ємності у двостулкових молюсків за дії інших ксенобіотиків. Зокрема, показано зниження експресії гена каталази у *M. galloprovincialis* за 15-добової експозиції сумішшю нестероїдних протизапальних засобів (ібупрофену та диклофенаку) і селективного інгібітора зворотного захоплення серотоніну (флуоксетину) як із додаванням міді, так і без нього. Аналогічне пригнічення каталазної активності як найбільш вираженої ознаки окисного стресу було зафіксовано у ракоподібних *Daphnia magna* за впливу $1 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$ Crz (Oliveira et al., 2015).

Серед досліджуваних маркерів окисного стресу вміст GSSG продемонстрував найбільш вибірково концентраційнозалежну динаміку. Синхронне зростання вмісту GSH та GSSG у групі Crz I логічно пояснюється активацією глутатіонпероксидазного шляху утилізації H_2O_2 , що супроводжується інтенсивним окисненням GSH (Manduzio et al., 2005). Натомість за умов впливу вищої концентрації Crz інтенсивність використання GSH знижується, порівняно з нижчою концентрацією Crz, що призводить до формування нового редокс-балансу, здатного модулювати загальний клітинний метаболізм (Xiao and Loscalzo, 2020; Martyniuk et al., 2022b). Отриманий профіль змін подібний до реакцій, раніше описаних для прісноводного молюска *U. tumidus* за впливу $18 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$ Crz протягом 14 діб (Khoma et al., 2020b; Khoma et al., 2022a). Зокрема, була підтверджена однотипність реакцій каталази, накопичення TBARS, динаміки GSH, а також загального балансу антиоксидантних і прооксидантних процесів.

Похідні фенотіазину, до яких належить і Crz, історично розглядалися як потужні антиоксиданти. Антиоксидантна дія цих сполук базується на їхніх електронодонорних властивостях: окиснюючись, вони утворюють катіон-радикал при взаємодії з іншими вільними радикалами, наприклад із тіоловим радикалом GSH (Tamba and O'Neill, 1991). Проте результати досліджень на хребетних тваринах вказують на подвійну природу цих сполук,

демонструючи як антиоксидантні, так і прооксидантні ефекти. Так, у риб *Carassius auratus* гостра токсичність Crz (LC50 за 24, 48 та 96 год становила 1,11; 0,43 та 0,32 мг·л⁻¹ відповідно) супроводжувалася розвитком окисного стресу, маркери якого варіювали залежно від тривалості експозиції (Li et al., 2008). Деякі прооксидантні ефекти Crz також підтверджені *in vitro* на еритроцитах людини за умов двогодинної експозиції в концентраціях, що відповідають терапевтичним дозам *in vivo* (1–100 мкМ) (Ficarra et al., 2016). Водночас у мозку щурів хронічне введення Crz (5 та 10 мг·кг⁻¹) стимулювало активність SOD, не впливало на активність каталази та інгібувало процеси перекисного окиснення ліпідів (Roy et al., 1984).

Експозиція Crz індукувала підвищення рівня MT. Хоча у травній залозі мідій рівень MT-SH поступався пулу тіолів GSH (приблизно у 8 разів у контролі та в 11 разів за дії Crz), цієї кількості виявилось достатньо для підтримки антиоксидантних функцій. Зміни буферної ємності MT щодо цинку, імовірно, зумовлені прямим втручанням Crz у метаболізм металів. Оскільки препарат інгібує Ca-залежні процеси, а шляхи поглинання та внутрішньоклітинної сигналізації Ca і Zn тісно взаємопов'язані, реакція MT є закономірною. Вплив Crz інтенсифікував акумуляцію Zn у складі MT та підвищив швидкість їхнього насичення металом порівняно з контролем, що повністю відтворює ефекти, раніше описані для прісноводного молюска *U. tumidus* (Khoma et al., 2020a, 2022b).

Функціональний стан MT за умов фармацевтичного навантаження виступає чутливим маркером клітинної вразливості. Зокрема, посилене зв'язування цинку MT знижує рівень лабільного цинку (внутрішньоклітинного медіатора апоптозу), що здатне модулювати апоптотичну активність та лізосомальні функції. Відомо, що в еритроцитах людини Crz індукує каспазу-3 вже на ранніх етапах експозиції. У нашому дослідженні активація каспази-3 спостерігалася виключно в групі Crz II, синхронно з відсутністю реакції EROD. Такий взаємозв'язок чітко вказує на вичерпання біотрансформаційного

потенціалу метаболізувати Crz і подальшу ініціацію процесів клітинної загибелі.

Серед усіх досліджених маркерів найбільш критичних змін зазнали лізосоми: стабільність їхніх мембран різко та концентраційно залежно знижувалася. Це свідчить про те, що, попри первинну активацію механізмів детоксикації та стресової відповіді (особливо в групі Crz I), подальше некомпенсоване накопичення препарату в тканинах спровокувало масштабне пошкодження мембранних структур.

Попри стійкість Crz до біодеградації бактеріями докільця, хроматографічні та мас-спектрометричні дослідження підтверджують утворення продуктів його біотрансформації (Trautwein and Kümmerer, 2012). У ссавців метаболізм препарату здійснюється мікросомальними ензимами печінки (цитохром P450) через деметилування та гідроксилювання, що супроводжується появою токсичних реактивних метаболітів (Coccia and Westerfeld, 1967).

Підвищення активності EROD та GST у мідій (особливо в групі Crz I) свідчить про активацію системи біотрансформації. Індукція EROD підтверджує його участь у метаболізмі ксенобіотика вже за пікомолярних концентрацій, тоді як зростання GST, імовірно, забезпечує подальшу трансформацію похідних Crz. Водночас літературні дані щодо ролі GST у метаболізмі препарату залишаються суперечливими. З одного боку, доведено факт інгібування GST хлорпромазином внаслідок прямої взаємодії між препаратом і ензимом (Türkan et al., 2021). З іншого боку, зниження активності GST спостерігалось *in vivo* у прісноводних молюсків *U. tumidus* за впливу значно вищої дози Crz (18 мкг·л⁻¹) протягом 14 діб (Khoma et al., 2022a). Незважаючи на ці розбіжності, отримані нами результати чітко демонструють залучення процесів біотрансформації до часткового перетворення Crz на метаболіти.

Отже, отримані результати підтверджують, що порушення антиоксидантно-прооксидантного балансу є невід'ємною рисою токсичності Crz. Згідно з сучасними класифікаціями, вплив навіть низьких пікомолярних та

наномолярних концентрацій препарату індукує розвиток «сильного окиснювального стресу» (Lushchak and Storey, 2021) або «окиснювального дистресу» (Sies, 2017). Цей стан супроводжується накопиченням модифікованих макромолекул, дисфункцією антиоксидантних ензимів і, як наслідок, призводить до незворотних клітинних ушкоджень.

4.1.4 Порівняльна оцінка адаптивної здатності морського та прісноводного видів молюсків

Порівняння реакцій двох видів двостулкових молюсків свідчить про різну здатність їх систем антистресорного захисту реагувати на вплив одного і того ж несприятливого чинника. Адаптивний потенціал цих гідробіонтів детермінований насамперед специфікою їхнього середовища існування. Прісні поверхневі води характеризуються значно динамічнішим циклом оновлення порівняно з океанічними акваторіями. Об'єм води, що надходить до моря через річковий стік, становить лише 0,00009% від загальних світових запасів, а середній час її перебування в руслах обмежується двома тижнями. У періоди інтенсивних опадів річкові води активно поповнюють прилеглі водоносні горизонти, тоді як під час посухи зворотні потоки з ґрунтових вод забезпечують підтримку базового стоку. Попри таку вразливість і динамічність прісноводних систем, вектор сучасних наукових досліджень зосереджений переважно на забрудненні морського середовища (Wijesinghe et al., 2026), тоді як джерела та наслідки антропогенного навантаження на прісні водойми залишаються недостатньо висвітленими (Birk et al., 2020).

Фундаментальні відмінності між прісноводними та морськими екосистемами полягають у їхніх фізико-хімічних параметрах, рівні біорізноманіття та характері техногенного тиску. Ключовим диференційним фактором є мінералізація: низька концентрація солей у прісних водах робить їхні біоценози більш вразливими до забруднення внаслідок урбанізації та аграрної діяльності. Еволюційна адаптація до прісної води вимагає від молюсків функціонування в режимі активної гіперосморегуляції. На відміну від морських видів, які є переважно осмоконформерами, прісноводні молюски

витрачають значну частку метаболічної енергії на підтримання іонного градієнта та виведення надлишку води (Currie and Evans, 2020). Необхідність підтримання осмотичного гомеостазу створює додаткові енергетичні витрати, які суттєво обмежують їхній резервний потенціал, необхідний для нейтралізації токсикантів (Sokolova, 2023). Натомість морські екосистеми гостріше реагують на глобальні кліматичні зміни та підкислення океану. Прісноводні середовища зазвичай мають нижчі показники рН і температури, проте вищий вміст розчиненого кисню. Важливо підкреслити, що вузька спеціалізація прісноводних молюсків до таких умов не є ознакою їхньої «еволюційної слабкості», а є результатом високоефективної адаптації до специфічних екологічних ніш (Wijesinghe et al., 2026).

Центральною моделлю для оцінки здоров'я та адаптивності молюсків є біоенергетичний показник «можливості для росту» (Scope for Growth, SFG). Він інтегрує ключові фізіологічні параметри — швидкість очищення води, інтенсивність дихання та екскреції, ефективність абсорбції та співвідношення кисню та азоту — у єдиний енергетичний еквівалент (Liu et al., 2025). SFG відображає обсяг енергії, доступний для соматичного росту та репродукції, що є прямим індикатором адаптивного потенціалу. Встановлено, що підкислення океану, накопичення мікроелементів (Cu, Zn, Cd) та вплив токсичних водоростей виступають як фактори селективного тиску, що змушують молюсків до перебудови метаболізму. При цьому перевищення порогів толерантності, особливо за умов гіпоксії чи різких змін солоності, призводить до енергетичного дефіциту та деградації популяцій (Liu et al., 2025).

Порівняльна характеристика резистентності демонструє, що прісноводні молюски (зокрема ряд *Unionida*) належать до найбільш вразливих таксономічних груп, виявляючи низьку стійкість до пестицидів, гербіцидів та трансформації біотопів. Морські види (наприклад, *Mytilus sp.*) зазвичай демонструють вищу толерантність, хоча стрес також спричиняє у них зниження темпів живлення та погіршення загального фізіологічного стану. Значна

розбіжність спостерігається і у здатності до детоксикації важких металів (Amiard et al., 2006).

Механізми адаптивної відповіді морських видів переважно базуються на потужній активації антиоксидантного захисту, зокрема супероксиддисмутази та каталази, а також ензимів біотрансформації I та II фаз (Regoli and Giuliani, 2014). Прісноводні ж види за впливу стійких токсинів швидко вичерпують свої адаптаційні ліміти, що призводить до незворотної втрати маси та високої летальності. Отже, попри спільну роль ефективних біоіндикаторів, морські види характеризуються вищою адаптивною пластичністю та складнішою системою біохімічної компенсації, тоді як прісноводні молюски залишаються критично чутливими до стрімких змін довкілля.

4.2 Спільні риси у відповідях *U. tumidus* та *M. galloprovincialis* на вплив психоактивних препаратів та мікропластику

Порівняльний аналіз біохімічних профілів прісноводного молюска *U. tumidus* та морського *M. galloprovincialis* дозволив виявити низку фундаментальних закономірностей метаболічної відповіді, які є спільними для обох видів, незважаючи на їхні фізіологічні відмінності та різне середовище існування (Табл. 4.2.1). Отримані дані свідчать про існування універсальних молекулярних мішеней токсичної дії мікропластику та психоактивних сполук, а також про активацію еволюційно консервативних механізмів адаптації двостулкових молюсків до токсичного навантаження.

Ключовою спільною ознакою розвитку стресу в обох модельних об'єктах є дестабілізація редокс-гомеостазу, що проявляється через виражений прооксидантний зсув. Універсальним індикатором окисної деструкції макромолекул для обох видів виявилось накопичення протеїнових карбонілів та продуктів пероксидного окиснення ліпідів. Зростання цих показників, зафіксоване у більшості експериментальних груп, підтверджує, що інтенсифікація вільнорадикальних процесів є первинною та неспецифічною реакцією на присутність у воді мікропластику та фармацевтичних препаратів. При цьому характерною особливістю обох видів є пріоритетна мобілізація

неензиматичної ланки захисту. Синхронне зростання рівнів GSH та MT-SH вказує на те, що саме тіоловий пул виступає основним редокс-буфером, який забезпечує підтримку життєздатності клітин в умовах виснаження резерву ензимів.

Таблиця 4.2.1

Схема реакцій досліджуваних показників на ізольовану та комбіновану дію мікропластику та психоактивних препаратів у субхронічній експозиції (↑ збільшується, ↓ зменшується, = відповідає контролю, — показник не визначався)

Дослідні організми	<i>U. tumidus</i>				<i>M. galloprovincialis</i>				
	MP (1 мг·л ⁻¹)	Caff (20 мкг·л ⁻¹)	Cpz (12 нг·л ⁻¹)	Mix (MP+Caff +Cpz)	MP (1 мг·л ⁻¹)	Caff (20 мкг·л ⁻¹)	Mix (MP+Caff)	Cpz I (12 нг·л ⁻¹)	Cpz II (12 мкг·л ⁻¹)
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SOD total	↑	=	=	=	↓	=	↓	↑	↑
Mn-SOD	↑	↑	↓	=	↓	=	↓	—	—
Cu,Zn-SOD	=	=	↑	=	=	=	↓	—	—
CAT	=	=	↓	=	↓	=	↓	↓	↓
PC	↑	↑	↑	↓	=	=	=	↑	↑
TBARS	↑	↑	↑	↑	↓	=	=	↑	↑
GSH	↑	↑	↑	↑	↑	=	=	↑	↑
GSSG	↑	↑	=	=	↓	=	↓	↑	=
RI GSH	=	↓	↑	↑	↑	=	↑	=	↑
MT-SH	↑	↑	↑	↑	↑	=	=	↑	↑
Zn-MT (MT-Zn)	=	↓	=	=	↑	=	=	↑	↑
apo-MT	↑	↑	↑	↑	↓	↑	=	↓	↓

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Zn total	=	↑	↓	↑	—	—	—	—	—
Cu total	↑	↑	=	↑	—	—	—	—	—
Zn/Cu	↓	↓	↓	↓	—	—	—	—	—
NAD⁺	↓	↓	↓	↓	—	—	—	—	—
NADH	↓	↓	=	↓	—	—	—	—	—
NADH/ NAD⁺	↓	↓	↑	↑	—	—	—	—	—
EROD	=	↑	↓	↓	—	—	—	↑	=
GST	↓	↓	↓	=	↓	=	↓	↑	↑
NRR	↑	↑	↑	↑	↑*	↑*	↑*	↑	↑
Cas-3	=	=	↓	↑	=	↓	=	=	↑

Примітка: * — результати отримані у співпраці та опубліковані в Impellitteri et al. (2023b). Дестабілізацію лізосомальних мембран визначено методами NRR та ТВ (фарбування трипановим синім) у гемолімфі та травній залозі.

Водночас було встановлено подібність у характері пригнічення антиоксидантного захисту. Найбільш вразливою ланкою для обох видів виявилось пригнічення активності каталази та глутатіон-S-трансферази. Така односпрямована динаміка свідчить про пригнічення систем біотрансформації II фази та механізмів утилізації пероксиду водню, що детермінує перехід від стану метаболічного стресу до системної цитотоксичності. Спільним вектором деструктивних змін стало також порушення стабільності лізосомальних мембран (NRR). Дестабілізація лізосомальних мембран виступає універсальним маркером цитотоксичності, вказуючи на те, що саме ці органели є ключовою ланкою в розвитку патологічних змін під дією досліджуваних ксенобіотиків.

Особливої уваги заслуговує подібність реакцій на комбінований вплив ксенобіотиків. У нашій роботі було створено найпростішу модель поєднання мікробруднювачів водного середовища – одночасну дію двох або трьох

ксенобіотиків. При аналізі таких поєднань концептуально виділяють три основні типи ефектів: домінування одного стресора, коли лише один із чинників спричиняє детермінований екологічний вплив (ефект стресора А переважає вплив стресора В або навпаки); адитивні ефекти, за яких компоненти діють незалежно, а їхній спільний вплив відповідає сумі окремих ефектів; взаємодія (синергізм або антагонізм), за якої один стресор модулює (посилює або послаблює) вплив іншого.

Слід зауважити, що в сучасній науковій літературі спостерігається суттєвий дефіцит порівняльних даних щодо частоти виникнення зазначених типів ефектів у різних просторових типах екосистем, зокрема при зіставленні морських та прісноводних середовищ (Birk et al., 2020). Отримані результати свідчать, що в обох серіях дослідів група з комбінованим впливом (Mix) демонструвала специфічну модифікацію біохімічних відповідей. Характер виявлених змін не зводився до простої сумації ефектів окремих компонентів, що вказує на складні, нелінійні механізми взаємодії ксенобіотиків в організмі досліджуваних видів молюсків.

Відтак, схожість біохімічних профілів за показниками окисного стресу та цитотоксичності вказує на універсальність молекулярних мішеней дії досліджуваних чинників. Це підтверджує ефективність використання даного комплексу біомаркерів для об'єктивної оцінки екологічного стану як прісноводних, так і морських екосистем

ВИСНОВКИ

У результаті вивчення окремого та комбінованого субхронічного впливу мікропластику, кофеїну та хлорпромазину в екологічно реальних концентраціях на двостулкових молюсків *U. tumidus* та *M. galloprovincialis* встановлено спільні риси та видові особливості реакції їх систем редокс-контролю, детоксикації та збереження клітинної життєздатності у травній залозі та виокремлено потенційні біомаркери оцінки адаптивного потенціалу організмів.

1. Встановлено, що за умов впливу досліджуваних чинників система антиоксидантного захисту *U. tumidus* є більш вразливою та демонструє більший діапазон відхилень від контролю порівняно з такою *M. galloprovincialis*. Зокрема у перлівниці відзначено зростання утворення окисних похідних ліпідів та протеїнів за окремого впливу чинників до ~1,4 разів, тоді як у мідії за впливу мікропластику та кофеїну реакція окисного стресу відсутня або збалансована. Найпотужнішим чинником окисного стресу для обох видів є хлорпромазин, що формує виражений прооксидантний вектор через специфічне інгібування каталази (~1,2 разів у перлівниці та ~1,3-2,2 рази у мідії залежно від концентрації Crz відповідно). За поєднаної дії чинників відзначено послаблення (у перлівниці) або нівелювання (у мідії) реакції окисного стресу.

2. Доведено, що у обох видів чутливою ланкою відповіді на вплив несприятливих чинників є низькомолекулярні тіоли, залучені у метаболізм цинку. У обох видів за експериментального впливу зростає концентрація металотіонеїну, при чому проявляються протилежні стратегії його участі у депонуванні цинку: у перлівниці зростає вміст деметальованої форми, а у мідії - метальованої форми. Вміст глутатіону та його редокс-індекс зростає у обох видів за впливу хлорпромазину та комбінованого впливу. Кофеїн викликає прооксидантні зміни системи глутатіону у обох видів, особливо у мідії. У перлівниці спостерігається неспецифічне до впливу чинника зменшення співвідношення Zn/Cu у тканині та виснаження пулів NAD^+ та NADH , при чому за впливу мікропластику та кофеїну баланс NADH/NAD^+ зменшується, а за впливу хлорпромазину та суміші - зростає до ~1,6 разів.

3. Встановлено, що система біотрансформації ксенобіотиків функціонує значно ефективніше у *M. galloprovincialis*, ніж у *U. tumidus*. У відповідь на дію хлорпромазину у мідій відбувається одночасна індукція ензимів першої (EROD) та другої (GST) фаз. Натомість у *U. tumidus* лише кофеїн індукує EROD, а всі інші чинники пригнічують ензими біотрансформації.

4. Показано, що універсальним проявом цитотоксичності для обох видів є пошкодження лізосомальних мембран. Реакція апоптотичного каскаду є видоспецифічною за впливу окремих чинників: у *U. tumidus* пригнічення каспази-3 провокується дією хлорпромазину, а у *M. galloprovincialis* - кофеїну. Дія сумішей у обох видів активує каспазу-3, що сприяє вилученню ушкоджених клітин та узгоджується із зменшенням вмісту окисних модифікацій протеїнів у тканині.

5. За сукупністю ознак та за допомогою дискримінантного аналізу доведено, що присутність мікропластику у модельних дво- та трьохкомпонентних сумішах несприятливих чинників викликає у обох видів молюсків неадитивну реакцію систем окисного стресу та детоксикації ксенобіотиків (антагонізм) із вираженим редуційним зміщенням, пригніченням ензимів біотрансформації та активацією апоптозу.

6. Виокремлено комплекс біомаркерів для відображення ранньої метаболічної відповіді молюсків на токсичний вплив. Універсальними неспецифічним індикатором стресу визначено дестабілізацію лізосомальних мембран та мобілізацію низькомолекулярних тіолів глутатіону та металотіонеїнів. Специфічними стосовно виду організму маркерами впливу несприятливих чинників визначено посилення перекисного окиснення ліпідів у перлівниці та пригнічення каталази у мідії. Відзначено подібність реакцій двостулкових молюсків до відповідей аналогічних маркерів вищих тварин (активація EROD за впливу кофеїну та чутливість гомеостазу цинку), що створює перспективу їх використання у тестуванні фармацевтичних препаратів.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Столяр О., Мартинюк В., Юнко К., Мацьків Т., Тулайдан Г., Барановський В., Романюк Л. Спосіб біоіндикації загальної токсичності водних екосистем: 158278 UA, МРК А61К 35/618 (2015.01), G01N 33/52 (2006.01), G01N 33/18 (2006.01) № u202403091; заявл. 12.06.2024; опубл. 15.01.2025, Бюл. № 3. <https://sis.nipo.gov.ua/uk/search/detail/1836725/>
2. Adenaya, A., Spriahailo, D., Berger, M., Noster, J., Milke, F., Schulz, C., Reinthaler, T., Poehlein, A., Wurl, O., Ribas-Ribas, M., Hamprecht, A., & Brinkhoff, T. (2024). Occurrence of antibiotic-resistant bacteria in the sea surface microlayer of coastal waters in the southern North Sea. *Ecotoxicology and environmental safety*, 287, 117259. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2024.117259>
3. 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>
4. Aguirre-Martínez, G. V., Buratti, S., Fabbr, E., DelValls, A. T., & Martín-Díaz, M. L. (2013). Using lysosomal membrane stability of haemocytes in *Ruditapes philippinarum* as a biomarker of cellular stress to assess contamination by caffeine, ibuprofen, carbamazepine and novobiocin. *Journal of environmental sciences (China)*, 25(7), 1408–1418. [https://doi.org/10.1016/s1001-0742\(12\)60207-1](https://doi.org/10.1016/s1001-0742(12)60207-1)
5. Aguirre-Martínez, G. V., DelValls, A. T., & Laura Martín-Díaz, M. (2015). Yes, caffeine, ibuprofen, carbamazepine, novobiocin and tamoxifen have an effect on *Corbicula fluminea* (Müller, 1774). *Ecotoxicology and environmental safety*, 120, 142–154. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.05.036>
6. 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>
7. Alam, M. R., Ehiguese, F. O., Vitale, D., & Martín-Díaz, M. L. (2022). Oxidative stress response to hydrogen peroxide exposure of *Mytilus*

galloprovincialis and *Ruditapes philippinarum*: reduced embryogenesis success and altered biochemical response of sentinel marine bivalve species. *Environ. Chem. Ecotoxicol.*, 4, 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.eneco.2022.01.002>

8. Aleya, L., & Uddin, M. S. (2020). Environmental pollutants and the risk of neurological disorders. *Environmental science and pollution research international*, 27(36), 44657–44658. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11272-3>

9. 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. *Science of The Total Environment*, 621, 654–662. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.298>

10. Aliko, V., Beqiraj, E. G., Qirjo, M., Cani, M., Rama, A., Bego, K., Reka, A., & Faggio, C. (2022). Plastic invasion tolling: First evaluation of microplastics in water and two crab species from the nature reserve lagoony complex of Kune-Vain, Albania. *The Science of the total environment*, 849, 157799. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157799>

11. Aliko, V., Mehmeti, E., Qirjo, M., & Faggio, C. (2019). Drink and sleep like a fish: goldfish as a behavior model to study pharmaceutical effects in freshwater ecosystems. *Journal of Biological Research - Bollettino Della Società Italiana Di Biologia*, 92 (1). <https://doi.org/10.4081/jbr.2019.7939>.

12. Amaral, L., Viveiros, M., & Molnar, J. (2004). Antimicrobial activity of phenothiazines. *In vivo (Athens, Greece)*, 18(6), 725–731.

13. Amelia, T., Khalik, W., Ong, M., Shao, Y., Pan, H., & Bhubalan, K. (2021). Marine microplastics as vectors of major ocean pollutants and its hazards to the marine ecosystem and humans. *Prog. Earth Planet Sci.* 8, 1–26. <https://doi.org/10.1186/s40645-020-00405-4>.

14. 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>

15. Archana, G., Dhodapkar, R., & Kumar, A. (2017). Ecotoxicological risk

assessment and seasonal variation of some pharmaceuticals and personal care products in the sewage treatment plant and surface water bodies (lakes). *Environmental Monitoring and Assessment*, 189, 446. <https://doi.org/10.1007/s10661-017-6148-3>

16. Artal-Sanz, M., Samara, C., Syntichaki, P., & Tavernarakis, N. (2006). Lysosomal biogenesis and function is critical for necrotic cell death in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of cell biology*, 173(2), 231–239. <https://doi.org/10.1083/jcb.200511103>

17. 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>

18. Atama, C. I., Nnaji, E. C., Christian Ezeoyili, I., Udeani, F. O., Onovo, C. J., Ike Ossai, N., Oscar Aguzie, I., & Nwani, C. D. (2022). Neuromodulatory and oxidative stress evaluations in African catfish *Clarias gariepinus* exposed to antipsychotic drug chlorpromazine. *Drug and chemical toxicology*, 45(3), 1318–1324. <https://doi.org/10.1080/01480545.2020.1822391>

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

20. Auclair, J., Turcotte, P., Gagnon, C., Peyrot, C., Wilkinson, K.J., & Gagné, F. (2020). Toxicological effects of inorganic nanoparticle mixtures in freshwater mussels. *Environments*, 7, 109. <https://doi.org/10.3390/environments7120109>

21. aus der Beek, T., Weber, F. A., Bergmann, A., Hickmann, S., Ebert, I., Hein, A., & Küster, A. (2016). Pharmaceuticals in the environment--Global occurrences and perspectives. *Environmental toxicology and chemistry*, 35(4), 823–835. <https://doi.org/10.1002/etc.3339>

22. Babich, H., & Borenfreund, E., 1990. Applications of the neutral red cytotoxicity assay to *in vitro* toxicology. *Altern. Lab. Anim.* 18, 129–144. <https://doi.org/10.1177/026119299001800116.1>
23. Banaee, M., Falco, F., Oryan, A., Gholamhosseini, A., Padehban, J., & Soltanian, S. (2026). Ecotoxicology of microplastics in water ecosystems and aquatic organisms: A review of synergistic and antagonistic effects of microplastics on other xenobiotics. *Marine pollution bulletin*, 224, 119115. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2025.119115>
24. Baracchini, C., Messenger, L., Stocker, P., & Leignel, V. (2023). The impacts of the multispecies approach to caffeine on marine invertebrates. *Toxics*, 12(1), 29. <https://doi.org/10.3390/toxics12010029>
25. Baresel, C., Palm Cousins, A., Hörsing, M., Ek, M., Ejhed, H., Allard, A.-S., ... Söhr, S. (2015). Pharmaceutical residues and other emerging substances in the effluent of sewage treatment plants. *IVL Swedish Environmental Research Institute. Report B*, 2226. http://vav.griffel.net/filer/C_IVL2015-B2226.pdf
26. Baroja, E., Christoforou, E., Lindström, J., & Spatharis, S. (2021). Effects of microplastics on bivalves: Are experimental settings reflecting conditions in the field?. *Marine pollution bulletin*, 171, 112696. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112696>
27. Barua, A., Williams, C. D., & Ross, J. L. (2021). A literature review of biological and bio-rational control strategies for slugs: current research and future prospects. *Insects*, 12(6), 541. <https://doi.org/10.3390/insects12060541>
28. Bayen, S., Estrada, E. S., Juhel, G., Kit, L. W., & Kelly, B. C. (2016). Pharmaceutically active compounds and endocrine disrupting chemicals in water, sediments and mollusks in mangrove ecosystems from Singapore. *Marine Pollution Bulletin*, 109, 716–722. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.06.105>
29. Beltrame, K. K., Cazetta, A. L., de Souza, P. S. C., Spessato, L., Silva, T. L., & Almeida, V. C. (2018). Adsorption of caffeine on mesoporous activated carbon fibers prepared from pineapple plant leaves. *Ecotoxicology and environmental safety*, 147, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.08.034>

30. 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>.
31. Beyer, J., Petersen, K., Song, Y., Ruus, A., Grung, M., Bakke, T., & Tollefsen, K. E. (2014). Environmental risk assessment of combined effects in aquatic ecotoxicology: a discussion paper. *Marine environmental research*, 96, 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.10.008>
32. Bhagat, J., Ingole, B.S., & Singh, N. (2016). Glutathione S-transferase, catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and lipid peroxidation as biomarkers of oxidative stress in snails: A review. *Invertebr. Surviv. J.* 13, 336–349. <https://doi.org/10.25431/1824-307X/isj.v13i1.336-349>.
33. Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *The World Allergy Organization journal*, 5(1), 9–19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
34. Birk, S., Chapman, D., Carvalho, L., Spears, B. M., Andersen, H. E., Argillier, C., ... Hering, D. (2020). Impacts of multiple stressors on freshwater biota across spatial scales and ecosystems. *Nature ecology & evolution*, 4(8), 1060–1068. <https://doi.org/10.1038/s41559-020-1216-4>
35. Boehmler, W., Petko, J., Woll, M., Frey, C., Thisse, B., Thisse, C., Canfield, V. A., & Levenson, R. (2009). Identification of zebrafish A2 adenosine receptors and expression in developing embryos. *Gene expression patterns : GEP*, 9(3), 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.gep.2008.11.006>
36. Bonnafé, E., Sroda, S., Budzinski, H., Valière, A., Pedelluc, J., Marty, P., & Geret, F. (2015). Responses of cytochrome P450, GST, and MXR in the mollusk *Corbicula fluminea* to the exposure to hospital wastewater effluents. *Environmental science and pollution research international*, 22(14), 11033–11046. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4309-x>
37. Bottoni, P., Caroli, S., & Caracciolo, A. B. (2010). Pharmaceuticals as

priority water contaminants. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 92(3), 549–565. <https://doi.org/10.1080/02772241003614320>

38. Bouron, A., & Oberwinkler, J. (2014). Contribution of calcium-conducting channels to the transport of zinc ions. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 466(3), 381–387. <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1295-z>

39. Boxall, A. B., Rudd, M. A., Brooks, B. W., Caldwell, D. J., ... Van Der Kraak, G. (2012). Pharmaceuticals and personal care products in the environment: what are the big questions?. *Environmental health perspectives*, 120(9), 1221–1229. <https://doi.org/10.1289/ehp.1104477>

40. Brennecke, D., Duarte, B., Paiva, F., Caçador, I., & Canning-Clode, J. (2016). Microplastics as vector for heavy metal contamination from the marine environment. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 178, 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2015.12.003>

41. Broderick, P. J., Benjamin, A. B., & Dennis, L. W. (2005). Caffeine and psychiatric medication interactions: a review. *The Journal of the Oklahoma State Medical Association*, 98(8), 380–384.

42. Broeg, K., & Lehtonen, K. K. (2006). Indices for the assessment of environmental pollution of the Baltic Sea coasts: integrated assessment of a multi-biomarker approach. *Marine pollution bulletin*, 53(8-9), 508–522. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.02.004>

43. Buerge, I.J., Poiger, T., Müller, M.D. & Buser, H.-R. (2003) Caffeine, an anthropogenic marker for wastewater contamination of surface waters. *Environmental Science and Technology*, 37, 691-700. <https://doi.org/10.1021/es020125z>

44. 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>

45. Burgos-Aceves, M. A., Abo-Al-Ela, H. G., & Faggio, C. (2021). Impact

of phthalates and bisphenols plasticizers on haemocyte immune function of aquatic invertebrates: A review on physiological, biochemical, and genomic aspects. *Journal of hazardous materials*, 419, 126426.

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126426>

46. Caffeine. (2011).

<https://www.camh.ca/en/health-info/mental-illness-andaddiction-index/caffeine>

47. Canesi, L., Ciacci, C., Bergami, E., Monopoli, M. P., Dawson, K. A., Papa, S., Canonico, B., & Corsi, I. (2015). Evidence for immunomodulation and apoptotic processes induced by cationic polystyrene nanoparticles in the hemocytes of the marine bivalve *Mytilus*. *Marine environmental research*, 111, 34–40.

<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.06.008>

48. Cappello, T., De Marco, G., Oliveri Conti, G., Giannetto, A., Ferrante, M., Mauceri, A., & Maisano, M. (2021). Time-dependent metabolic disorders induced by short-term exposure to polystyrene microplastics in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 209, 111780.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111780>

49. Carbery, M., O'Connor, W., & Palanisami, T. (2018). Trophic transfer of microplastics and mixed contaminants in the marine food web and implications for human health. *Environment international*, 115, 400–409.

<https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.03.007>

50. CARE Study Group. (2008). Maternal caffeine intake during pregnancy and risk of fetal growth restriction: A large prospective observational study. *The BMJ*, 337, a2332.

<https://doi.org/10.1136/bmj.a2332>

51. Cervený, D., Cisar, P., Brodin, T., McCallum, E. S., & Fick, J. (2022). Environmentally relevant concentration of caffeine-effect on activity and circadian rhythm in wild perch. *Environmental science and pollution research international*, 29(36), 54264–54272.

<https://doi.org/10.1007/s11356-022-19583-3>

52. Chahouri, A., Yacoubi, B., Moukrim, A., & Banaoui, A. (2023). Bivalve molluscs as bioindicators of multiple stressors in the marine environment: recent advances. *Cont. Shelf Res.* 264, 105056.

<https://doi.org/10.1016/j.csr.2023.105056>

53. Chen, B., Yu, P., Chan, W. N., Xie, F., Zhang, Y., Liang, L., Leung, K. T., Lo, K. W., Yu, J., Tse, G. M. K., Kang, W., & To, K. F. (2024). Cellular zinc metabolism and zinc signaling: from biological functions to diseases and therapeutic targets. *Signal transduction and targeted therapy*, 9(1), 6. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01679-y>
54. Chen, J. Y., Brunauer, L. S., Chu, F. C., Helsel, C. M., Gedde, M. M., & Huestis, W. H. (2003). Selective amphipathic nature of chlorpromazine binding to plasma membrane bilayers. *Biochimica et biophysica acta*, 1616(1), 95–105. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(03\)00229-3](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(03)00229-3)
55. Choi, S. Y., Kim, Y. H., Lee, Y. K., & Kim, K. T. (2001). Chlorpromazine inhibits store-operated calcium entry and subsequent noradrenaline secretion in PC12 cells. *British journal of pharmacology*, 132(2), 411–418. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703840>
56. Coccia, P. F., & Westerfeld, W. W. (1967). The metabolism of chlorpromazine by liver microsomal enzyme systems. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 157(2), 446–458.
57. Comeau, F., Surette, C., Brun, G. L., & Losier, R. (2008). The occurrence of acidic drugs and caffeine in sewage effluents and receiving waters from three coastal watersheds in Atlantic Canada. *The Science of the total environment*, 396(2-3), 132–146. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.02.031>
58. 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>
59. Cruz, D., Almeida, Â., Calisto, V., Esteves, V. I., Schneider, R. J., Wrona, F. J., Soares, A. M., Figueira, E., & 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>
60. Currie, S., & Evans, D.H. (Eds.). (2020). *The Physiology of Fishes* (5th ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781003036401>

61. Dai, J., Zhang, S., Lin, H., Qiao, J. Q., Lian, H. Z., & Xu, C. X. (2025). Targeted and non-targeted metabolic analysis of chlorpromazine in grass carp as well as the *in-silico* and metabolomics toxicity assessment. *Journal of hazardous materials*, 487, 137195. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2025.137195>
62. Darkin, S., McQuillan, J., & Ralph, R. K. (1984). Chlorpromazine: a potential anticancer agent?. *Biochemical and biophysical research communications*, 125(1), 184–191. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(84\)80352-6](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(84)80352-6)
63. Delgado, N., Orozco, J., Zambrano, S., Casas-Zapata, J. C., & Marino, D. (2023). Veterinary pharmaceutical as emerging contaminants in wastewater and surface water: An overview. *Journal of hazardous materials*, 460, 132431. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.132431>
64. de Oliveira, L. L., Antunes, S. C., Gonçalves, F., Rocha, O., & Nunes, B. (2016). Acute and chronic ecotoxicological effects of four pharmaceuticals drugs on cladoceran *Daphnia magna*. *Drug and chemical toxicology*, 39(1), 13–21. <https://doi.org/10.3109/01480545.2015.1029048>
65. de Sá, L. C., Oliveira, M., Ribeiro, F., Rocha, T. L., & Futter, M. N. (2018). Studies of the effects of microplastics on aquatic organisms: What do we know and where should we focus our efforts in the future?. *The Science of the total environment*, 645, 1029–1039. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.207>
66. Devin, S., Burgeot, T., Giambérini, L., Minguez, L., & Pain-Devin, S. (2014). The integrated biomarker response revisited: optimization to avoid misuse. *Environmental science and pollution research international*, 21(4), 2448–2454. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2169-9>
67. Dhondiram, G.S., & Popatrao, Z.S. (2014). Caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) as a modulator of Arsenic bioaccumulation in the experimental Pelecypod model, *Lamellidens corrianus*. *Int. J. Env. Health Eng.* 3, 10. <https://www.ijehe.org/text.asp?2014/3/1/10/132682>.
68. Ding, Y., Zou, X., Chen, H., Yuan, F., Liao, Q., Feng, Z., Fan, Q., Wang, Y., Fu, G., & Yu, W. (2022). Distribution pattern and influencing factors for the microplastics in continental shelf, slope, and deep-sea surface sediments from the

South China Sea. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 309, 119824.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119824>

69. Diogo, B. S., Antunes, S. C., Pinto, I., Amorim, J., Teixeira, C., Teles, L. O., Golovko, O., Žlábek, V., Carvalho, A. P., & Rodrigues, S. (2023). Insights into environmental caffeine contamination in ecotoxicological biomarkers and potential health effects of *Danio rerio*. *Heliyon*, 9(9), e19875.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e19875>

70. DrugBank <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00477>

71. Drugfuture.

https://www.drugfuture.com/chemdata/chlorpromazine.html#google_vignette

72. Du, S. N. N., McCallum, E. S., Vaseghi-Shanjani, M., Choi, J. A., Warriner, T. R., Balshine, S., & Scott, G. R. (2018). Metabolic costs of exposure to wastewater effluent lead to compensatory adjustments in respiratory physiology in bluegill sunfish. *Environmental science & technology*, 52(2), 801–811.
<https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03745>

73. Du, Y., Bales, K. R., Dodel, R. C., Hamilton-Byrd, E., Horn, J. W., Czilli, D. L., Simmons, L. K., Ni, B., & Paul, S. M. (1997). Activation of a caspase 3-related cysteine protease is required for glutamate-mediated apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(21), 11657–11662.
<https://doi.org/10.1073/pnas.94.21.11657>

74. Dudley, K., Liu, X., & De Haan, S. (2017). Chlorpromazine dose for people with schizophrenia. *The Cochrane database of systematic reviews*, 4(4), CD007778. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007778.pub2>

75. Ebele, A. J., Abdallah, A. M., & Harrad, S. (2017). Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. *Emerging Contaminants*, 3, 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2016.12.004>

76. 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>

77. Edwards, Q. A., Sultana, T., Kulikov, S. M., Garner-O'Neale, L. D., Yargeau, V., & Metcalfe, C. D. (2018). Contaminants of emerging concern in wastewaters in Barbados, West Indies. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, *101*(1), 1–6. <https://doi.org/10.1007/s00128-018-2346-0>
78. Egbujor, M. C., Tucci, P., Buttari, B., Nwobodo, D. C., Marini, P., & Saso, L. (2024). Phenothiazines: Nrf2 activation and antioxidant effects. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, *38*(3), e23661. <https://doi.org/10.1002/jbt.23661>
79. Einöther, S. J., & Giesbrecht, T. (2013). Caffeine as an attention enhancer: reviewing existing assumptions. *Psychopharmacology*, *225*(2), 251–274. <https://doi.org/10.1007/s00213-012-2917-4>
80. 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>
81. Elizalde-Velázquez, A., Subbiah, S., Anderson, T. A., Green, M. J., Zhao, X., & Cañas-Carrell, J. E. (2020). Sorption of three common nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) to microplastics. *The Science of the total environment*, *715*, 136974. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136974>
82. Ellgaard, L., Sevier, C. S., & Bulleid, N. J. (2018). How are proteins reduced in the endoplasmic reticulum?. *Trends in biochemical sciences*, *43*(1), 32–43. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.10.006>
83. Escudero, J., Muñoz, J. L., Morera-Herreras, T., Hernandez, R., Medrano, J., Domingo-Echaburu, S., Barceló, D., Orive, G., & Lertxundi, U. (2021). Antipsychotics as environmental pollutants: An underrated threat?. *The Science of the total environment*, *769*, 144634. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144634>
84. Fabbri, E., & Franzellitti, S. (2016). Human pharmaceuticals in the marine environment: Focus on exposure and biological effects in animal species. *Environmental toxicology and chemistry*, *35*(4), 799–812.

<https://doi.org/10.1002/etc.3131>

85. Fabbri, E., Valbonesi, P., & Moon, T. W. (2023). Pharmaceuticals in the marine environment: Occurrence, fate, and biological effects. In V. M. León & J. Bellas (Eds.), *Contaminants of emerging concern in the marine environment* (pp. 11–71). <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90297-7.00008-1>

86. Faggio, C., Tsarpali, V., & Dailianis, S. (2018). Mussel digestive gland as a model tissue for assessing xenobiotics: An overview. *The Science of the total environment*, 636, 220–229. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.264>

87. Falfushynska, H. I., Delahaut, L., Stolyar, O. B., Geffard, A., & Biagianti-Risbourg, S. (2009). Multi-biomarkers approach in different organs of *Anodonta cygnea* from the Dnister Basin (Ukraine). *Archives of environmental contamination and toxicology*, 57(1), 86–95. <https://doi.org/10.1007/s00244-008-9234-2>

88. Fang, S., Hua, C., Yang, J., Liu, F., Wang, L., Wu, D., & Ren, L. (2025). Combined pollution of soil by heavy metals, microplastics, and pesticides: Mechanisms and anthropogenic drivers. *Journal of hazardous materials*, 485, 136812. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.136812>

89. Fatta-Kassinos, D., Meric, S., & Nikolaou, A. (2011). Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: current state of knowledge and future research. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 399(1), 251–275. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4300-9>

90. Feng, S., Zhang, Y., Gao, F., Li, M., Zhu, L., Wen, H., Xi, Y., & Xiang, X. (2022). Inhibitory effects of antipsychotic chlorpromazine on the survival, reproduction and population growth other than neurotransmitters of zooplankton in light of global warming. *International journal of environmental research and public health*, 19(23), 16167. <https://doi.org/10.3390/ijerph192316167>

91. Fernández, C., González-Doncel, M., Pro, J., Carbonell, G., & Tarazona, J. V. (2010). Occurrence of pharmaceutically active compounds in surface waters of the Henares-Jarama-Tajo River system (Madrid, Spain) and a potential risk characterization. *The Science of the total environment*, 408(3), 543–551.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.10.009>

92. Ferreira, A. P., & da Cunha, C. L. (2005). Anthropogenic pollution in aquatic environment: development of a caffeine indicator. *International journal of environmental health research*, 15(4), 303–311.

<https://doi.org/10.1080/09603120500155898>

93. Ficarra, S., Russo, A., Barreca, D., Giunta, E., Galtieri, A., & Tellone, E. (2016). Short-term effects of chlorpromazine on oxidative stress in erythrocyte functionality: activation of metabolism and membrane perturbation. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016, 2394130.

<https://doi.org/10.1155/2016/2394130>

94. Fisone, G., Borgkvist, A., & Usiello, A. (2004). Caffeine as a psychomotor stimulant: Mechanism of action. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61, 857–872. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3269-3>

95. Flament, J., Scius, N., Zdanowicz, N., Regnier, M., De Cannière, L., & Thonon, H. (2021). Influence of post-COVID-19 deconfinement on psychiatric visits to the emergency department. *The American journal of emergency medicine*, 48, 238–242. <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2021.05.014>

96. Fong, P. P., & Ford, A. T. (2014). The biological effects of antidepressants on the molluscs and crustaceans: a review. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 151, 4–13.

<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.12.003>

97. Frédéric, O., & Yves, P. (2014). Pharmaceuticals in hospital wastewater: their ecotoxicity and contribution to the environmental hazard of the effluent. *Chemosphere*, 115, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.01.016>

98. Fredholm, B. B., Chen, J.-F., Cunha, R. A., Svenningsson, P., & Vaugeois, J.-M. (2005). Adenosine and brain function. *International Review of Neurobiology*, 63, 191–270. [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(05\)63007-3](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(05)63007-3)

99. French, V. A., Codi King, S., Kumar, A., Northcott, G., McGuinness, K., & Parry, D. (2015). Characterisation of microcontaminants in Darwin Harbour, a tropical estuary of northern Australia undergoing rapid development. *The Science*

- of the total environment, 536, 639–647.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.07.114>
100. 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)
101. Fu, Z., & Wang, J. (2019). Current practices and future perspectives of microplastic pollution in freshwater ecosystems in China. *Science of The Total Environment*, 691, 697–712. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.167>
102. 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.
103. Gardon, T., Morvan, L., Huvet, A., Quillien, V., Soyez, C., Le Moullac, G., & Le Luyer, J. (2020). Microplastics induce dose-specific transcriptomic disruptions in energy metabolism and immunity of the pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 266(Pt 3), 115180.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115180>
104. Gervasini, G., Caballero, M. J., Carrillo, J. A., & Benitez, J. (2013). Comparative cytochrome p450 in vitro inhibition by atypical antipsychotic drugs. *ISRN pharmacology*, 2013, 792456. <https://doi.org/10.1155/2013/792456>
105. Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science advances*, 3(7), e1700782.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782>
106. Giraud-Billoud, M., Moreira, D. C., Minari, M., Andreyeva, A., ... Hermes-Lima, M. (2024). REVIEW: Evidence supporting the 'preparation for oxidative stress' (POS) strategy in animals in their natural environment. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, 293, 111626. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2024.111626>
107. Glazier D. S. (2005). Beyond the '3/4-power law': variation in the intra- and interspecific scaling of metabolic rate in animals. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 80(4), 611–662.

<https://doi.org/10.1017/S1464793105006834>

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

109. González-Pleiter, M., Velázquez, D., Edo, C., Carretero, O., Gago, J., Barón-Sola, Á., Hernández, L. E., Yousef, I., Quesada, A., Leganés, F., Rosal, R., & Fernández-Piñas, F. (2020). Fibers spreading worldwide: Microplastics and other anthropogenic litter in an Arctic freshwater lake. *The Science of the total environment*, 722, 137904. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137904>

110. Gonzalez-Rey, M., Mattos, J. J., Piazza, C. E., Bainy, A. C., & Bebianno, M. J. (2014). Effects of active pharmaceutical ingredients mixtures in mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 153, 12–26. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.02.006>

111. González-Soto, N., Hatfield, J., Katsumiti, A., Duroudier, N., Lacave, J. M., Bilbao, E., Orbea, A., Navarro, E., & Cajaraville, M. P. (2019). Impacts of dietary exposure to different sized polystyrene microplastics alone and with sorbed benzo[a]pyrene on biomarkers and whole organism responses in mussels *Mytilus galloprovincialis*. *The Science of the total environment*, 684, 548–566. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.161>

112. Gracia-Lor, E., Sancho, J. V., & Hernández, F. (2011). Multi-class determination of around 50 pharmaceuticals, including 26 antibiotics, in environmental and wastewater samples by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography. A*, 1218(16), 2264–2275. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.02.026>

113. Gradinariu, L., Cretu, M., Dediu, L., & Vizireanu, C. (2025). Oxidative stress biomarkers as indicators of pharmaceutical toxicity in fish: A Review. Preprints. <https://doi.org/10.20944/preprints202501.0943.v1>

114. 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)

115. Grillo, M. P. (2012). Bioactivation by Phase-II-Enzyme-Catalyzed Conjugation of Xenobiotics. In *Encyclopedia of Drug Metabolism and Interactions*. <https://doi.org/10.1002/9780470921920.edm074>

116. Gwenzi, W., Simbanegavi, T. T., & Rzymiski, P. (2023). Household disposal of pharmaceuticals in low-income settings: Practices, Health Hazards, and Research Needs. *Water*, 15(3), 476. <https://doi.org/10.3390/w15030476>

117. Gylytė, B., Martinyuk, V., Cimperman, R., Karitonas, R., Stoliar, O., & Manusadžianas, L. (2023). Long-term toxicity of chlorpromazine, diclofenac and two lanthanides on three generations of *Ceriodaphnia dubia*. *PeerJ*, 11, e16472. <https://doi.org/10.7717/peerj.16472>

118. Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139.

119. Hamaguchi, R., Haginaka, J., Tanimoto, T., & Kuroda, Y. (2014). Maintenance of luminal pH and protease activity in lysosomes/late endosomes by vacuolar ATPase in chlorpromazine-treated RAW264 cells accumulating phospholipids. *Cell biology and toxicology*, 30(1), 67–77. <https://doi.org/10.1007/s10565-014-9269-2>

120. Hartmann, N. B., Rist, S., Bodin, J., Jensen, L. H., Schmidt, S. N., Mayer, P., Meibom, A., & Baun, A. (2017). Microplastics as vectors for environmental contaminants: Exploring sorption, desorption, and transfer to biota. *Integrated environmental assessment and management*, 13(3), 488–493. <https://doi.org/10.1002/ieam.1904>

121. Heberer, T., Reddersen, K., & Mechlinski, A. (2002). From municipal sewage to drinking water: fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment in urban areas. *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research*, 46(3), 81–88.

122. Hernández Martínez, S. A., Melchor-Martínez, E. M.,

González-González, R. B., Sosa-Hernández, J. E., Araújo, R. G., Rodríguez-Hernández, J. A., Barceló, D., Parra-Saldívar, R., & Iqbal, H. M. N. (2023). Environmental concerns and bioaccumulation of psychiatric drugs in water bodies - Conventional versus biocatalytic systems of mitigation. *Environmental research*, 229, 115892. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.115892>

123. Hitchcock, J. N., & Mitrovic, S. M. (2019). Microplastic pollution in estuaries across a gradient of human impact. *Environmental pollution* (Barking, Essex : 1987), 247, 457–466. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.01.069>

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

125. Impellitteri, F., Briglia, M., Porcino, C., Stoliar, O., Yunko, K., Germanà, A., Piccione, G., Faggio, C., & Guerrera, M. C. (2024a). The odd couple: Caffeine and microplastics. Morphological and physiological changes in *Mytilus galloprovincialis*. *Microscopy research and technique*, 87(5), 1092–1110. <https://doi.org/10.1002/jemt.24483>

126. Impellitteri, F., Yunko, K., Calabrese, G., Porretti, M., Martyniuk, V., Gnatyshyna, L., Nava, V., Potortì, A. G., Piccione, G., Di Bella, G., Stoliar, O., & Faggio, C. (2024b). Chlorpromazine's impact on *Mytilus galloprovincialis*: a multi-faceted investigation. *Chemosphere*, 350, 141079. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.141079>

127. Impellitteri, F., Yunko, K., Martyniuk, V., Khoma, V., Piccione, G., Stoliar, O., & Faggio, C. (2023a). Cellular and oxidative stress responses of *Mytilus galloprovincialis* to chlorpromazine: implications of an antipsychotic drug exposure study. *Frontiers in physiology*, 14, 1267953. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1267953>

128. Impellitteri, F., Yunko, K., Martyniuk, V., Matskiv, T., Lechachenko, S., Khoma, V., Mudra, A., Piccione, G., Stoliar, O., & Faggio, C. (2023b). Physiological and biochemical responses to caffeine and microplastics in *Mytilus*

galloprovincialis. *The Science of the total environment*, 890, 164075.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164075>

129. Ismail, N. A. H., Wee, S. Y., Kamarulzaman, N. H., & Aris, A. Z. (2019). Quantification of multi-classes of endocrine-disrupting compounds in estuarine water. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 249, 1019–1028.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.089>

130. Jabeen, K., Li, B., Chen, Q., Su, L., Wu, C., Hollert, H., & Shi, H. (2018). Effects of virgin microplastics on goldfish (*Carassius auratus*). *Chemosphere*, 213, 323–332. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.031>

131. Jaszczyszyn, A., Gąsiorowski, K., Świątek, P., Malinka, W., Cieślik-Boczula, K., Petrus, J., & Czarnik-Matusiewicz, B. (2012). Chemical structure of phenothiazines and their biological activity. *Pharmacological reports : PR*, 64(1), 16–23. [https://doi.org/10.1016/s1734-1140\(12\)70726-0](https://doi.org/10.1016/s1734-1140(12)70726-0)

132. Jiménez, J. J., Muñoz, B. E., Sánchez, M. I., Pardo, R., & Vega, M. S. (2016). Fate of the drug chlorpromazine in river water according to laboratory assays. Identification and evolution over time of degradation products. Sorption to sediment. *Chemosphere*, 162, 285–292.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.07.107>

133. Jovanović B. (2017). Ingestion of microplastics by fish and its potential consequences from a physical perspective. *Integrated environmental assessment and management*, 13(3), 510–515. <https://doi.org/10.1002/ieam.1913>

134. Kachroo, A., Irizarry, M. C., & Schwarzschild, M. A. (2010). Caffeine protects against combined paraquat and maneb-induced dopaminergic neuron degeneration. *Experimental neurology*, 223(2), 657–661.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.02.007>

135. 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>

136. 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

137. Kazakova, J., Villar-Navarro, M., Ramos-Payán, M., Aranda-Merino, N., Román-Hidalgo, C., Bello-López, M. Á., & Fernández-Torres, R. (2021). Monitoring of pharmaceuticals in aquatic biota (*Procambarus clarkii*) of the Doñana National Park (Spain). *Journal of environmental management*, 297, 113314. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113314>

138. 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>

139. Khoma, V., Gnatyshyna, L., Martinyuk, V., Mackiv, T., Yunko, K., Formanchuk, R., Baranovskii, V., Gladyuk, M., Manusadžianas, L., Stoliar, O. (2020a). Combined exposures to low Roundup concentration induce thiolome response in bivalve mollusk. *Scientific Issues of TNPU. Series: Biology*, 80 (3–4). <https://doi.org/10.25128/2078-2357.20.3-4.9>.

140. Khoma, V., Martinyuk, V., Matskiv, T., Gnatyshyna, L., Baranovsky, V., Gladiuk, M., Gylytė, B., Manusadžianas, L., & Stoliar, O. (2022a). 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>

141. Khoma, V., Martinyuk, V., Matskiv, T., Yunko, K., Gnatyshyna, L., & Stoliar, O. (2022b). Does roundup affect zinc functions in a bivalve mollusk in *ex vivo* exposure?. *Ecotoxicology (London, England)*, 31(2), 335–340. <https://doi.org/10.1007/s10646-021-02512-4>

142. Khoma, V.V., Gnatyshyna, L.L., Martinyuk, V.V., Mackiv, T.R., Mishchuk, N.Y., Stoliar, O.B., (2020b). Metallothioneins contribution to the response of bivalve mollusk to xenobiotics. *Ukrainian Biochem. J.*, 92, 87–96.

<https://doi.org/10.15407/ubj92.05.087>.

143. Klavins, M., Klavins, L., Stabnikova, O., Stabnikov, V., Marynin, A., Ansone-Bertina, L., Mezulis, M., & Vaseashta, A. (2022). Interaction between microplastics and pharmaceuticals depending on the composition of aquatic environment. *Microplastics*, 1(3), 520-535.

<https://doi.org/10.3390/microplastics1030037>

144. Kleywegt, S., Payne, M., Ng, F., & Fletcher, T. (2019). Environmental loadings of Active Pharmaceutical Ingredients from manufacturing facilities in Canada. *The Science of the total environment*, 646, 257–264.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.240>

145. Klotz, A. V., Stegeman, J. J., & Walsh, C. (1984). An alternative 7-ethoxyresorufin O-deethylase activity assay: a continuous visible spectrophotometric method for measurement of cytochrome P-450 monooxygenase activity. *Analytical biochemistry*, 140(1), 138-145.

146. Komori, K., Suzuki, Y., Minamiyama, M., & Harada, A. (2013). Occurrence of selected pharmaceuticals in river water in Japan and assessment of their environmental risk. *Environmental monitoring and assessment*, 185(6), 4529–4536. <https://doi.org/10.1007/s10661-012-2886-4>

147. Korekar, G., Kumar, A., & Ugale, C. (2020). Occurrence, fate, persistence and remediation of caffeine: a review. *Environmental science and pollution research international*, 27(28), 34715–34733.

<https://doi.org/10.1007/s11356-019-06998-8>

148. Korth, C., May, B. C., Cohen, F. E., & Prusiner, S. B. (2001). Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(17), 9836–9841. <https://doi.org/10.1073/pnas.161274798>

149. Kosma, C. I., Lambropoulou, D. A., & Albanis, T. A. (2014). Investigation of PPCPs in wastewater treatment plants in Greece: occurrence, removal and environmental risk assessment. *The Science of the total environment*, 466-467, 421–438. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.07.044>

150. Kot, M., & Daniel, W. A. (2008). Caffeine as a marker substrate for testing cytochrome P450 activity in human and rat. *Pharmacological reports : PR*, *60*(6), 789–797.
151. 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>
152. 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>
153. Ku, B. M., Lee, Y. K., Jeong, J. Y., Ryu, J., Choi, J., Kim, J. S., Cho, Y. W., Roh, G. S., Kim, H. J., Cho, G. J., Choi, W. S., & Kang, S. S. (2011). Caffeine inhibits cell proliferation and regulates PKA/GSK3 β pathways in U87MG human glioma cells. *Molecules and cells*, *31*(3), 275–279. <https://doi.org/10.1007/s10059-011-0027-5>
154. Kurissery, S., Kanavillil, N., Verenitch, S., & Mazumder, A. (2012). Caffeine as an anthropogenic marker of domestic waste: A study from Lake Simcoe watershed. *Ecological Indicators*, *23*, 501–508. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2012.05.001>
155. Lam, M. W., Young, C. J., Brain, R. A., Johnson, D. J., Hanson, M. A., Wilson, C. J., Richards, S. M., Solomon, K. R., & Mabury, S. A. (2004). Aquatic persistence of eight pharmaceuticals in a microcosm study. *Environmental toxicology and chemistry*, *23*(6), 1431–1440. <https://doi.org/10.1897/03-421>
156. Lawrence, J. R., Swerhone, G. D., Wassenaar, L. I., & Neu, T. R. (2005). Effects of selected pharmaceuticals on riverine biofilm communities. *Canadian journal of microbiology*, *51*(8), 655–669. <https://doi.org/10.1139/w05-047>
157. Lebreton, L., & Andrady, A. (2019). Future scenarios of global plastic waste generation and disposal. *Humanities and Social Sciences Communications, Palgrave Macmillan*, *5*(1), 1-11. <https://doi.org/10.1057/s41599-018-0212-7>
158. Lebreton, L. C. M., van der Zwet, J., Damsteeg, J. W., Slat, B., Andrady, A., & Reisser, J. (2017). River plastic emissions to the world's oceans. *Nature*

communications, 8, 15611. <https://doi.org/10.1038/ncomms15611>

159. Lee, W. Y., Lee, W. T., Cheng, C. H., Chen, K. C., Chou, C. M., Chung, C. H., Sun, M. S., Cheng, H. W., Ho, M. N., & Lin, C. W. (2015). Repositioning antipsychotic chlorpromazine for treating colorectal cancer by inhibiting sirtuin 1. *Oncotarget*, 6(29), 27580–27595. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4768>

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

161. Li, S., He, B., Wang, J., Liu, J., & Hu, X. (2020). Risks of caffeine residues in the environment: Necessity for a targeted ecopharmacovigilance program. *Chemosphere*, 243, 125343. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125343>

162. Li, T., Zhou, Q., Zhang, N., & Luo, Y. (2008). Toxic effects of chlorpromazine on *Carassius auratus* and its oxidative stress. *Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes*, 43(8), 638–643. <https://doi.org/10.1080/03601230802352674>

163. Li, Z., Lu, G., Yang, X., & Wang, C. (2012). Single and combined effects of selected pharmaceuticals at sublethal concentrations on multiple biomarkers in *Carassius auratus*. *Ecotoxicology (London, England)*, 21(2), 353–361. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0796-9>

164. Liang, N., & Kitts, D. D. (2014). Antioxidant property of coffee components: assessment of methods that define mechanisms of action. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 19(11), 19180–19208. <https://doi.org/10.3390/molecules191119180>

165. Liu, H., Zhou, Y., & Tang, L. (2017). Caffeine induces sustained apoptosis of human gastric cancer cells by activating the caspase-9/caspase-3 signalling pathway. *Molecular medicine reports*, 16(3), 2445–2454. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6894>

166. Liu, J., Lu, G., Xie, Z., Zhang, Z., Li, S., & Yan, Z. (2015). Occurrence, bioaccumulation and risk assessment of lipophilic pharmaceutically active

compounds in the downstream rivers of sewage treatment plants. *The Science of the total environment*, 511, 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.12.033>

167. Liu, P., Wu, X., Liu, H., Wang, H., Lu, K., & Gao, S. (2020). Desorption of pharmaceuticals from pristine and aged polystyrene microplastics under simulated gastrointestinal conditions. *Journal of hazardous materials*, 392, 122346. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122346>

168. Liu, Y., Lv, J., Guo, C., Jin, X., Zuo, D., & Xu, J. (2025). Environmental behavior, risks, and management of antidepressants in the aquatic environment. *Environmental science. Processes & impacts*, 27(5), 1196–1228. <https://doi.org/10.1039/d4em00793j>

169. Liu, Y., Shang, S., Gul, M., Hu, M., & Wang, Y. (2025). Energetic adaptations of bivalves under environmental stress: a comprehensive review on bioenergetics and aquaculture sustainability. *Reviews in Aquaculture*, 17 (4), e70052. <https://doi.org/10.1111/raq.70052>

170. Lizárraga, D., Danihel, A. & Pernet, B. (2017). Low concentrations of large inedible particles reduce feeding rates of echinoderm larvae. *Mar. Biol.* 164. <https://doi.org/10.1007/s00227-017-3134-9>

171. López-García, E., Postigo, C., & López de Alda, M. (2019). Psychoactive substances in mussels: Analysis and occurrence assessment. *Marine pollution bulletin*, 146, 985–992. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.07.042>

172. Lowry, O. H., Passonneau, J. V., Schulz, D. W., & Rock, M. K. (1961). The measurement of pyridine nucleotides by enzymatic cycling. *Journal of Biological Chemistry*, 236(10), 2746-2755.

173. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275.

174. Lozano, Y. M., Lehnert, T., Linck, L. T., Lehmann, A., & Rillig, M. C. (2021). Microplastic shape, polymer type, and concentration affect soil properties and plant biomass. *Frontiers in plant science*, 12, 616645. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.616645>

175. Lu, P. Z., Lai, C. Y., & Chan, W. H. (2008). Caffeine induces cell death via activation of apoptotic signal and inactivation of survival signal in human osteoblasts. *International journal of molecular sciences*, 9(5), 698–718. <https://doi.org/10.3390/ijms9050698>
176. Luo, H., Liu, C., He, D., Xu, J., Sun, J., Li, J., & Pan, X. (2022). Environmental behaviors of microplastics in aquatic systems: A systematic review on degradation, adsorption, toxicity and biofilm under aging conditions. *Journal of hazardous materials*, 423(Pt A), 126915. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126915>
177. Luo, Y., Guo, W., Ngo, H. H., Nghiem, L. D., Hai, F. I., Zhang, J., Liang, S., & Wang, X. C. (2014). A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *The Science of the total environment*, 473-474, 619–641. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.065>
178. Lushchak, O., Velykodna, M., Bolman, S., Strilbytska, O., Berezovskyi, V., & Storey, K. B. (2023). Prevalence of stress, anxiety, and symptoms of post-traumatic stress disorder among Ukrainians after the first year of Russian invasion: a nationwide cross-sectional study. *The Lancet regional health. Europe*, 36, 100773. <https://doi.org/10.1016/j.lanep.2023.100773>
179. Lushchak, V. I., & Storey, K. B. (2021). Oxidative stress concept updated: Definitions, classifications, and regulatory pathways implicated. *EXCLI journal*, 20, 956–967. <https://doi.org/10.17179/excli2021-3596>
180. Lushchak V. I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 101(1), 13–30. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>
181. Lushchak V. I. (2012). Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *Journal of amino acids*, 2012, 736837. <https://doi.org/10.1155/2012/736837>
182. Lwanga, E.H., Beriot, N., Corradini, F., Silva, V., Yang, X., Baartman, J., Rezaei, M., van Schaik, L., Riksen, M., & Geissen, V. (2022). Review of

microplastic sources, transport pathways and correlations with other soil stressors: a journey from agricultural sites into the environment. *Chem. Biol. Technol. Agric.*, 9, 20. <https://doi.org/10.1186/s40538-021-00278-9>

183. Magara, G., Elia, A. C., Syberg, K., & Khan, F. R. (2018). Single contaminant and combined exposures of polyethylene microplastics and fluoranthene: accumulation and oxidative stress response in the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Journal of toxicology and environmental health. Part A*, 81(16), 761–773. <https://doi.org/10.1080/15287394.2018.1488639>

184. Magara, G., Khan, F. R., Pinti, M., Syberg, K., Inzirillo, A., & Elia, A. C. (2019). Effects of combined exposures of fluoranthene and polyethylene or polyhydroxybutyrate microplastics on oxidative stress biomarkers in the blue mussel (*Mytilus edulis*). *Journal of toxicology and environmental health. Part A*, 82(10), 616–625. <https://doi.org/10.1080/15287394.2019.1633451>

185. Mallik, A., Xavier, K. A. M., Naidu, B. C., & Nayak, B. B. (2021). Ecotoxicological and physiological risks of microplastics on fish and their possible mitigation measures. *The Science of the total environment*, 779, 146433. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146433>

186. Manduzio, H., Rocher, B., Durand, F., Galap, C., & Leboulenger, F. (2005). The point about oxidative stress in molluscs. *Inf. Syst. J*, 2, 91-104.

187. Map. <https://gameo.org/index.php?title=File:Map-of-Ukraine-political-enwiki.jpg>

188. Map. <https://images.app.goo.gl/dD2DcCE5DEPzDJEE6>

189. Marczenko, Z., & Balcerzak, M. (2000). Separation, preconcentration and spectrophotometry in inorganic analysis. *Elsevier*; 26.

190. Marin, M. F., Lord, C., Andrews, J., Juster, R. P., Sindi, S., Arsenault-Lapierre, G., Fiocco, A. J., & Lupien, S. J. (2011). Chronic stress, cognitive functioning and mental health. *Neurobiology of learning and memory*, 96(4), 583–595. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2011.02.016>

191. Martínez-Gomez, C., Bignell, J., & Lowe, D. (2015). Lysosomal membrane stability in mussels. *ICES Tech. Mar. Environ. Sci.*, 56, 41.

<https://doi.org/10.25607/OBP-240>

192. Martyniuk, V., Gylytė, B., Matskiv, T., Khoma, V., Tulaidan, H., Gnatyshyna, L., Orlova-Hudim, K., Manusadžianas, 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>

193. Martyniuk, V., Khoma, V., Matskiv, T., Baranovsky, V., Orlova-Hudim, K., Gylytė, B., Symchak, R., Matciuk, O., Gnatyshyna, L., Manusadžianas, L., & 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>

194. 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>

195. Martyniuk, V., Matskiv, T., Yunko, K., Khoma, V., Gnatyshyna, L., Faggio, C., & Stoliar, O. (2024). Reductive stress and cytotoxicity in the swollen river mussel (*Unio tumidus*) exposed to microplastics and salinomycin. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, *350*, 123724. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.123724>

196. Maruya, K. A., Dodder, N. G., Weisberg, S. B., Gregorio, D., Bishop, J. S., Klosterhaus, S., Alvarez, D. A., Furlong, E. T., Bricker, S., Kimbrough, K. L., & Lauenstein, G. G. (2014). The Mussel Watch California pilot study on contaminants of emerging concern (CECs): Synthesis and next steps. *Marine Pollution Bulletin*, *81*, 355–363. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.04.023>

197. Mato, Y., Isobe, T., Takada, H., Kanehiro, H., Ohtake, C., & Kaminuma, T. (2001). Plastic resin pellets as a transport medium for toxic chemicals in the marine environment. *Environmental science & technology*, *35*(2), 318–324.

<https://doi.org/10.1021/es0010498>

198. Matozzo, V., Pagano, M., Spinelli, A., Caicci, F., & Faggio, C. (2016). *Pinna nobilis*: A big bivalve with big haemocytes?. *Fish & shellfish immunology*, 55, 529–534. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.06.039>

199. 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. Toxicology & pharmacology : CBP*, 276, 109803. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2023.109803>

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

201. McIlwain, D. R., Berger, T., & Mak, T. W. (2013). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(4), a008656. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008656>

202. Miller, T. H., Ng, K. T., Bury, S. T., Bury, S. E., Bury, N. R., & Barron, L. P. (2019). Biomonitoring of pesticides, pharmaceuticals and illicit drugs in a freshwater invertebrate to estimate toxic or effect pressure. *Environment international*, 129, 595–606. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.04.038>

203. Mohana, A. A., Rahman, M., Sarker, S. K., Haque, N., Gao, L., & Pramanik, B. K. (2022). Nano/microplastics: Fragmentation, interaction with co-existing pollutants and their removal from wastewater using membrane processes. *Chemosphere*, 309(Pt 1), 136682. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136682>

204. 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>

205. Moreira, D. C., Venancio, L. P. R., Sabino, M. A. C. T., & Hermes-Lima, M. (2016). How widespread is preparation for oxidative stress in the animal kingdom?. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, 200, 64–78. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.01.023>
206. Moreira, D. G., Aires, A., de Lourdes Pereira, M., & Oliveira, M. (2022). Levels and effects of antidepressant drugs to aquatic organisms. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*, 256, 109322. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109322>
207. Moriwaki, H., Komori, N., & Akiyama, Y. (2022). Interaction between nanoplastics and pectin, a water-soluble polysaccharide, in the presence of Fe(III) ion. *SSRN Electronic Journal.*, 10 (3), 108054. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.108054>
208. Mosna, K., Jurczak, K., & Krężel, A. (2023). Differentiated Zn(II) binding affinities in animal, plant, and bacterial metallothioneins define their zinc buffering capacity at physiological pZn. *Metallomics : integrated biometal science*, 15(10), mfad061. <https://doi.org/10.1093/mtomcs/mfad061>
209. Motta, C. M., Frezza, V., & Simoniello, P. (2013). Caspase 3 in molluscan tissues: localization and possible function. *Journal of experimental zoology. Part A, Ecological genetics and physiology*, 319(10), 548–559. <https://doi.org/10.1002/jez.1817>
210. Mourgaud, Y., Martinez, E., Geffard, A., Andral, B., Stanisiere, J. Y., & Amiard, J. C. (2002). Metallothionein concentration in the mussel *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of response to metal contamination: validation in the field. *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals*, 7(6), 479–490. <https://doi.org/10.1080/1354750021000034528>
211. Müller, M., Mentel, M., van Hellemond, J. J., Henze, K., Woehle, C., Gould, S. B., Yu, R. Y., van der Giezen, M., Tielens, A. G., & Martin, W. F. (2012). Biochemistry and evolution of anaerobic energy metabolism in eukaryotes. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 76(2), 444–495.

<https://doi.org/10.1128/MMBR.05024-11>

212. Napper, I. E., & Thompson, R. C. (2016). Release of synthetic microplastic plastic fibres from domestic washing machines: Effects of fabric type and washing conditions. *Marine pollution bulletin*, 112(1-2), 39–45.

<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.09.025>

213. National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 2726, Chlorpromazine.

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chlorpromazine>.

214. Nałecz-Jawecki, G., & Persoone, G. (2006). Toxicity of selected pharmaceuticals to the anostracan crustacean *Thamnocephalus platyurus*: comparison of sublethal and lethal effect levels with the 1h Rapidtoxkit and the 24h Thamnotoxkit microbiotests. *Environmental science and pollution research international*, 13(1), 22–27. <https://doi.org/10.1065/espr2006.01.005>

215. Nehlig A. (2018). Interindividual differences in caffeine metabolism and factors driving caffeine consumption. *Pharmacological reviews*, 70(2), 384–411.

<https://doi.org/10.1124/pr.117.014407>

216. Neri, D., Ruberto, T., Mwaffo, V., Bartolini, T., & Porfiri, M. (2019). Social environment modulates anxiogenic effects of caffeine in zebrafish. *Behavioural pharmacology*, 30(1), 45–58.

<https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000415>

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

218. Nunes, B., Santos, J., Dionísio, R., & Dias de Alkimin, G. (2022). Investigation of potential behavioral and physiological effects of caffeine on *D. magna*. *Environmental science and pollution research international*, 29(28), 43237–43250. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-18695-0>

<https://doi.org/10.1007/s11356-022-18695-0>

219. OECD Caffeine - OECD Existing Chemicals Database (2002)

<https://hpvchemicals.oecd.org/UI/handler.axd?id=cedcd78d-4ddd-4a9c-b0f0-3b53f8fd5495>

220. Oehlmann, J., & Schulte-Oehlmann, U. (2003). Chapter 17 mollusks as bioindicators. *Trace Metals and other Contaminants in the Environment*, 7, 577–635. [https://doi.org/10.1016/S0927-5215\(03\)80147-9](https://doi.org/10.1016/S0927-5215(03)80147-9)
221. 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)
222. 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*, 252, 562–572. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.05.091>
223. Oliveira, L. L., Antunes, S. C., Gonçalves, F., Rocha, O., & Nunes, B. (2015). Evaluation of ecotoxicological effects of drugs on *Daphnia magna* using different enzymatic biomarkers. *Ecotoxicology and environmental safety*, 119, 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.04.028>
224. Osredkar, J. & Sustar, N. (2011) Copper and Zinc, Biological Role and Significance of Copper/Zinc Imbalance. *Journal of Clinical Toxicology*, S3, 001. <https://doi.org/10.4172/2161-0495.S3-001>
225. Pagano, M., Stara, A., Aliko, V., & Faggio, C. (2020). Impact of neonicotinoids to aquatic invertebrates - *in vitro* studies on *Mytilus galloprovincialis*: a review. *J. Mar. Sci. Eng.* 8, 801. <https://doi.org/10.3390/jmse8100801>.
226. Paíga, P., & Delerue-Matos, C. (2017). Anthropogenic contamination of Portuguese coastal waters during the bathing season: Assessment using caffeine as a chemical marker. *Marine pollution bulletin*, 120(1-2), 355–363. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.05.030>
227. Paital, B., Panda, S. K., Hati, A. K., Mohanty, B., Mohapatra, M. K., Kanungo, S., & Chainy, G. B. (2016). Longevity of animals under reactive oxygen species stress and disease susceptibility due to global warming. *World journal of biological chemistry*, 7(1), 110–127. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v7.i1.110>

228. Pannetier, P., Morin, B., Le Bihanic, F., Dubreil, L., Clérandeau, C., Chouvellon, F., Van Arkel, K., Danion, M., & Cachot, J. (2020). Environmental samples of microplastics induce significant toxic effects in fish larvae. *Environment international*, *134*, 105047. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105047>
229. Pantea, E. D., Coatu, V., Damir, N. A., Oros, A., Lazar, L., & Rosoiu, N. (2023). Lysosomal membrane stability of Mussel (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819) as a biomarker of cellular stress for environmental contamination. *Toxics*, *11*(8), 649. <https://doi.org/10.3390/toxics11080649>
230. Pardridge W. M. (2022). A historical review of brain drug delivery. *Pharmaceutics*, *14*(6), 1283. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14061283>
231. Patel, M., Kumar, R., Kishor, K., Mlsna, T., Pittman, C. U., Jr, & Mohan, D. (2019). Pharmaceuticals of Emerging Concern in Aquatic Systems: Chemistry, Occurrence, Effects, and Removal Methods. *Chemical reviews*, *119*(6), 3510–3673. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00299>
232. Patiño, M. A., Rodríguez-Illamola, A., Conde-Sieira, M., Soengas, J. L., & Míguez, J. M. (2011). Daily rhythmic expression patterns of clock1a, bmal1, and per1 genes in retina and hypothalamus of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Chronobiology international*, *28*(5), 381–389. <https://doi.org/10.3109/07420528.2011.566398>
233. Peña, A., Rodríguez-Liévana, J. A., & Delgado-Moreno, L. (2023). Interactions of microplastics with pesticides in soils and their ecotoxicological implications. *Agronomy*, *13*(3), 701. <https://doi.org/10.3390/agronomy13030701>
234. Perić, L., Nerlović, V., Žurga, P., Žilić, L., & Ramšak, A. (2017). Variations of biomarkers response in mussels *Mytilus galloprovincialis* to low, moderate and high concentrations of organic chemicals and metals. *Chemosphere*, *174*, 554–562. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.138>
235. Peteffi, G. P., Fleck, J. D., Kael, I. M., Rosa, D. C., Antunes, M. V., & Linden, R. (2018). Ecotoxicological risk assessment due to the presence of bisphenol A and caffeine in surface waters in the Sinos River Basin—Rio Grande

do Sul—Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 79, 712–712.
<https://doi.org/10.1590/1519-6984.189752>

236. 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>

237. Pires, A., Almeida, Â., Calisto, V., Schneider, R. J., Esteves, V. I., Wrona, F. J., Soares, A. M. V. M., Figueira, E., & Freitas, R. (2016). Long-term exposure of polychaetes to caffeine: Biochemical alterations induced in *Diopatra neapolitana* and *Arenicola marina*. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 214, 456–463. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.04.031>

238. Plaze, M., Attali, D., Petit, A. C., Blatzer, M., Simon-Loriere, E., Vinckier, F., Cachia, A., Chrétien, F., & Gaillard, R. (2020). Repositionnement de la chlorpromazine dans le traitement du COVID-19 : étude reCoVery [Repurposing of chlorpromazine in COVID-19 treatment: the reCoVery study]. *L'Encephale*, 46(3S), S35–S39. <https://doi.org/10.1016/j.encep.2020.04.010>

239. Porretti, M., Arrigo, F., Di Bella, G., & Faggio, C. (2022). Impact of pharmaceutical products on zebrafish: An effective tool to assess aquatic pollution. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*, 261, 109439. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109439>

240. Praveena, S. M., Shaifuddin, S. N. M., Sukiman, S., Nasir, F. A. M., Hanafi, Z., Kamarudin, N., Ismail, T. H. T., & Aris, A. Z. (2018). Pharmaceuticals residues in selected tropical surface water bodies from Selangor (Malaysia): Occurrence and potential risk assessments. *Science of The Total Environment*, 642, 230–240. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.058>

241. Provenza, F., Rampih, D., Pignattelli, S., Pastorino, P., Barceló, D., Prearo, M., Specchiulli, A., & Renzi, M. (2022). Mussel watch program for microplastics in the Mediterranean sea: identification of biomarkers of exposure using *Mytilus galloprovincialis*. *Ecol. Indic.* 142, 109212. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2022.109212>.

242. Qiang, L., & Cheng, J. (2021). Exposure to polystyrene microplastics

impairs gonads of zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 263, 128161.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128161>

243. Ransy, C., Vaz, C., Lombès, A., & Bouillaud, F. (2020). Use of H₂O₂ to cause oxidative stress, the catalase issue. *International journal of molecular sciences*, 21(23), 9149. <https://doi.org/10.3390/ijms21239149>

244. Ratajczak, A. E., Szymczak-Tomczak, A., Zawada, A., Rychter, A. M., Dobrowolska, A., & Krela-Kaźmierczak, I. (2021). Does drinking coffee and tea affect bone metabolism in patients with inflammatory bowel diseases?. *Nutrients*, 13(1), 216. <https://doi.org/10.3390/nu13010216>

245. Razanajatovo, R. M., Ding, J., Zhang, S., Jiang, H., & Zou, H. (2018). Sorption and desorption of selected pharmaceuticals by polyethylene microplastics. *Marine pollution bulletin*, 136, 516–523.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.09.048>

246. 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>

247. Regoli, F., & Principato, G. (1995). Glutathione, glutathione-dependant and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis* exposed to metals in different field and laboratory condition. implications for a proper use of biochemical markers. *Aquat. Toxicol.* 31, 143–164.
[https://doi.org/10.1016/0166-445X\(94\)00064-W](https://doi.org/10.1016/0166-445X(94)00064-W).

248. Regoli, F., Benedetti, M., & Giuliani, M.E. (2011). Antioxidant defenses and acquisition of tolerance to chemical stress. *Tol. Environ. Cont*, 1, 153–173.

249. Reichert, J. F., Souza, D. M., & Martins, A. F. (2019). Antipsychotic drugs in hospital wastewater and a preliminary risk assessment. *Ecotoxicology and environmental safety*, 170, 559–567. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.12.021>

250. Repnik, U., & Turk, B. (2010). Lysosomal-mitochondrial cross-talk during cell death. *Mitochondrion*, 10(6), 662–669.
<https://doi.org/10.1016/j.mito.2010.07.008>

251. Revel, M., Châtel, A., Perrein-Ettajani, H., Bruneau, M., Akcha, F., Sussarellu, R., Rouxel, J., Costil, K., Decottignies, P., Cognie, B., Lagarde, F., & Mouneyrac, C. (2020). Realistic environmental exposure to microplastics does not induce biological effects in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine pollution bulletin*, 150, 110627. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110627>

252. Revel, M., Lagarde, F., Perrein-Ettajani, H., Bruneau, M., Akcha, F., Sussarellu, R., Rouxel, J., Costil, K., Decottignies, P., Cognie, B., Châtel, A., & Mouneyrac, C. (2019) Tissue-specific biomarker responses in the blue mussel *Mytilus spp.* exposed to a mixture of microplastics at environmentally relevant concentrations. *Front. Environ. Sci.*, 7, 33. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2019.00033>

253. 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)

254. Riguetto, C. V. T., Nazari, M. T., De Souza, C. F., Cadore, J. S., Brião, V. B., & Piccin, J. S. (2020). Alternative techniques for caffeine removal from wastewater: An overview of opportunities and challenges. *Journal of Water Process Engineering*, 35, 101231. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101231>

255. Rizzi, C., Seveso, D., Galli, P., & Villa, S. (2020). First record of emerging contaminants in sponges of an inhabited island in the Maldives. *Marine pollution bulletin*, 156, 111273. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111273>

256. 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)

257. Romano, N., Ashikin, M., Teh, J. C., Syukri, F., & Karami, A. (2018). Effects of pristine polyvinyl chloride fragments on whole body histology and protease activity in silver barb *Barbodes gonionotus* fry. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 237, 1106–1111. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.040>

258. Romero, A., Novoa, B., & Figueras, A. (2015). The complexity of

apoptotic cell death in mollusks: An update. *Fish & shellfish immunology*, 46(1), 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.03.038>

259. Rossowska, M. J., & Nakamoto, T. (1992). Caffeine decreases zinc and metallothionein levels in heart of newborn and adult rats. *Pediatric research*, 32(3), 330–332. <https://doi.org/10.1203/00006450-199209000-00017>

260. Röth, E., Marczin, N., Balatonyi, B., Ghosh, S., Kovács, V., Alotti, N., Borsiczky, B., & Gasz, B. (2011). Effect of a glutathione S-transferase inhibitor on oxidative stress and ischemia-reperfusion-induced apoptotic signalling of cultured cardiomyocytes. *Experimental and clinical cardiology*, 16(3), 92–96.

261. Roveri, V., Guimarães, L. L., Toma, W., & Correia, A. T. (2020). Occurrence and ecological risk assessment of pharmaceuticals and cocaine in a beach area of Guarujá, São Paulo State, Brazil, under the influence of urban surface runoff. *Environmental science and pollution research international*, 27(36), 45063–45075. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10316-y>

262. Roy, D., Pathak, D. N., & Singh, R. (1984). Effects of chlorpromazine on the activities of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in the various regions of aging rat brain. *Journal of neurochemistry*, 42(3), 628–633. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1984.tb02728.x>

263. Ruiz-Oliveira, J., Silva, P. F., & Luchiari, A. C. (2019). Coffee time: Low caffeine dose promotes attention and focus in zebrafish. *Learning & behavior*, 47(3), 227–233. <https://doi.org/10.3758/s13420-018-0369-3>

264. Ruttkay-Nedecky, B., Nejdil, L., Gumulec, J., Zitka, O., Masarik, M., Eckschlager, T., Stiborova, M., Adam, V., & Kizek, R. (2013). The role of metallothionein in oxidative stress. *Int. J. Mol. Sci.*, 14 (3), 6044–6066. <https://doi.org/10.3390/ijms14036044>.

265. Samal, K., Mahapatra, S., & Ali, M. (2022). Pharmaceutical wastewater as emerging contaminants (EC): treatment technologies, impact on environment and human health. *Energy Nexus*, 6, 100076. <https://doi.org/10.1016/j.nexus.2022.100076>

266. Sánchez-Vázquez, F. J., López-Olmeda, J. F., Vera, L. M., Migaud, H.,

López-Patiño, M. A., & Míguez, J. M. (2019). Environmental cycles, melatonin, and circadian control of stress response in fish. *Frontiers in endocrinology*, *10*, 279. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00279>

267. Santos, J. L., Aparicio, I., & Alonso, E. (2007). Occurrence and risk assessment of pharmaceutically active compounds in wastewater treatment plants. A case study: Seville city (Spain). *Environment international*, *33*(4), 596–601. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.09.014>

268. Santos, L., Rodríguez-Mozaz, S., & Barcelo, D. (2021). Microplastics as vectors of pharmaceuticals in aquatic organisms – An overview of their environmental implications. *Case Stud Chem Environ Eng*, *3*, 100079. <https://doi.org/10.1016/j.cscee.2021.100079>

269. Santos-Silva, T. G., Montagner, C. C., & Martinez, C. B. R. (2018). Evaluation of caffeine effects on biochemical and genotoxic biomarkers in the neotropical freshwater teleost *Prochilodus lineatus*. *Environmental toxicology and pharmacology*, *58*, 237–242. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.02.002>

270. Santovito, G., Trentin, E., Gobbi, I., Bisaccia, P., Tallandini, L., & Irato, P. (2021). Non-enzymatic antioxidant responses of *Mytilus galloprovincialis*: Insights into the physiological role against metal-induced oxidative stress. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*, *240*, 108909. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108909>

271. 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>

272. Scherer, C., Weber, A., Lambert, S., & Wagner, M. (2018). Interactions of microplastics with freshwater biota. In: Wagner, M., Lambert, S. (eds) *Freshwater Microplastics. The Handbook of Environmental Chemistry*, *58*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-61615-5_8

273. Seidensticker, S., Grathwohl, P., Lamprecht, J., & Zarfl, C. (2018). A combined experimental and modeling study to evaluate pH-dependent sorption of polar and non-polar compounds to polyethylene and polystyrene microplastics.

<https://doi.org/10.1186/s12302-018-0155-z>

274. Sfriso, A. A., Tomio, Y., Rosso, B., Gambaro, A., Sfriso, A., Corami, F., Rastelli, E., Corinaldesi, C., Mistri, M., & Munari, C. (2020). Microplastic accumulation in benthic invertebrates in Terra Nova Bay (Ross Sea, Antarctica).

Environment international, 137, 105587.

<https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105587>

275. Shaik, A. N., Bohnert, T., Williams, D. A., Gan, L. L., & LeDuc, B. W. (2016). Mechanism of drug-drug interactions between warfarin and statins. *Journal of pharmaceutical sciences*, 105(6), 1976–1986.

<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.03.011>

276. Shaik, A. N., Grater, R., Lulla, M., Williams, D. A., Gan, L. L., Bohnert, T., & LeDuc, B. W. (2016). Comparison of enzyme kinetics of warfarin analyzed by LC-MS/MS QTrap and differential mobility spectrometry. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 1008, 164–173. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.11.036>

277. Shang, Y., Wang, X., Chang, X., Sokolova, I.M., Wei, S., Liu, W., Fang, J.K.H., Hu, M., Huang, W., & Wang, Y. (2021). The effect of microplastics on the bioenergetics of the mussel *Mytilus coruscus* assessed by cellular energy allocation approach. *Front. Mar. Sci.* 8, 754789. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.754789>.

278. Sharma, S., Bhardwaj, A., Thakur, M., & Saini, A. (2024). Understanding microplastic pollution of marine ecosystem: a review. *Environmental science and pollution research international*, 31(29), 41402–41445.

<https://doi.org/10.1007/s11356-023-28314-1>

279. Sheetz, M.P., & Singer, S.J. (1974). Biological membranes as bilayer couples: A molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71(11), 4457-4461.

280. Sies, H., Berndt, C., & Jones, D. P. (2017). Oxidative Stress. *Annual review of biochemistry*, 86, 715–748.

<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>

281. Sies H. (2017). Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox biology*, *11*, 613–619. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.035>
282. Silva, A. R. R., Gonçalves, S. F., Pavlaki, M. D., Morgado, R. G., Soares, A. M. V. M., & Loureiro, S. (2022). Mixture toxicity prediction of substances from different origin sources in *Daphnia magna*. *Chemosphere*, *292*, 133432. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133432>
283. Silva, C. P., Lima, D. L., Schneider, R. J., Otero, M., & Esteves, V. I. (2014). Evaluation of the anthropogenic input of caffeine in surface waters of the north and center of Portugal by ELISA. *The Science of the total environment*, *479-480*, 227–232. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.01.120>
284. Silvestre F. (2020). Signaling pathways of oxidative stress in aquatic organisms exposed to xenobiotics. *Journal of experimental zoology. Part A, Ecological and integrative physiology*, *333(6)*, 436–448. <https://doi.org/10.1002/jez.2356>
285. Sleight, V. A., Bakir, A., Thompson, R. C., & Henry, T. B. (2017). Assessment of microplastic-sorbed contaminant bioavailability through analysis of biomarker gene expression in larval zebrafish. *Marine pollution bulletin*, *116(1-2)*, 291–297. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.12.055>
286. Smith, A. J., McGowan, T., Devlin, M. J., Massoud, M. S., Al-Enezi, M., Al-Zaidan, A. S., Al-Sarawi, H. A., & Lyons, B. P. (2015). Screening for contaminant hotspots in the marine environment of Kuwait using ecotoxicological and chemical screening techniques. *Marine pollution bulletin*, *100(2)*, 681–688. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.08.043>
287. Smith, C. E., Soti, S., Jones, T. A., Nakagawa, A., Xue, D., & Yin, H. (2017). Non-steroidal anti-inflammatory drugs are caspase inhibitors. *Cell chemical biology*, *24(3)*, 281–292. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.02.003>
288. Snyder M. J. (2000). Cytochrome P450 enzymes in aquatic invertebrates: recent advances and future directions. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, *48(4)*, 529–547.

[https://doi.org/10.1016/s0166-445x\(00\)00085-0](https://doi.org/10.1016/s0166-445x(00)00085-0)

289. Sokolova, I. M. (2023). Energy metabolism and the costs of adaptation to environmental stressors in aquatic invertebrates. *Marine Pollution Bulletin*, 186, 114423. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.114423>

290. Steele, W. B., Mole, R. A., & Brooks, B. W. (2018). Experimental protocol for examining behavioral response profiles in larval fish: application to the neuro-stimulant caffeine. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (137), 57938. <https://doi.org/10.3791/57938>

291. Stip, E., Rizvi, T. A., Mustafa, F., Javaid, S., Aburuz, S., Ahmed, N. N., Abdel Aziz, K., Arnone, D., Subbarayan, A., Al Mugaddam, F., & Khan, G. (2020). The large action of chlorpromazine: translational and transdisciplinary considerations in the face of COVID-19. *Frontiers in pharmacology*, 11, 577678. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.577678>

292. Stoliar, O.B. & Lushchak, V.I. (2012) Environmental pollution and oxidative stress in fish. *Oxidative Stress-Environmental Induction and Dietary Antioxidants*, 7, 131-166.

293. Storey K. B. (2015). Regulation of hypometabolism: insights into epigenetic controls. *The Journal of experimental biology*, 218(Pt 1), 150–159. <https://doi.org/10.1242/jeb.106369>

294. Syberg, K., Nielsen, A., Khan, F. R., Banta, G. T., Palmqvist, A., & Jepsen, P. M. (2017). Microplastic potentiates triclosan toxicity to the marine copepod *Acartia tonsa* (Dana). *Journal of toxicology and environmental health. Part A*, 80(23-24), 1369–1371. <https://doi.org/10.1080/15287394.2017.1385046>

295. Szymczycha, B., Borecka, M., Białk-Bielińska, A., Siedlewicz, G., & Pazdro, K. (2020). Submarine groundwater discharge as a source of pharmaceutical and caffeine residues in coastal ecosystem: Bay of Puck, southern Baltic Sea case study. *The Science of the total environment*, 713, 136522. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136522>

296. Tamai, T. K., Young, L. C., Cox, C. A., & Whitmore, D. (2012). Light acts on the zebrafish circadian clock to suppress rhythmic mitosis and cell

proliferation. *Journal of biological rhythms*, 27(3), 226–236.
<https://doi.org/10.1177/0748730412440861>

297. Tamba, M., & O'Neill, P. (1991). Redox reactions of thiol free radicals with the antioxidants ascorbate and chlorpromazine: role in radioprotection. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 2*, 1681–1685. <https://doi.org/10.1039/P29910001681>

298. Tanoue, R., Nozaki, K., Nomiya, K., Kunisue, T., & Tanabe, S. (2020). Rapid analysis of 65 pharmaceuticals and 7 personal care products in plasma and whole-body tissue samples of fish using acidic extraction, zirconia-coated silica cleanup, and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography. A*, 1631, 461586. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461586>

299. Teixeira, C., Rodrigues, S., Amorim, J., Diogo, B. S., Pinto, I., Carvalho, A. P., Antunes, S. C., & Teles, L. O. (2025). Comprehensive machine learning assessment of zebrafish behaviour and biochemical markers in response to caffeine exposure. *Ecotoxicology (London, England)*, 34(5), 746–759. <https://doi.org/10.1007/s10646-025-02873-0>

300. Telek, A., Molnár, Z., Vértessy, B. G., & Tasnádi, G. (2023). Opine dehydrogenases, an underexplored enzyme family for the enzymatic synthesis of chiral amines. *Biotechnology and bioengineering*, 120(10), 2793–2808. <https://doi.org/10.1002/bit.28469>

301. Ternes, T. A., Stumpf, M., Mueller, J., Haberer, K., Wilken, R. D., & Servos, M. (1999). Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants--I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *The Science of the total environment*, 225(1-2), 81–90. [https://doi.org/10.1016/s0048-9697\(98\)00334-9](https://doi.org/10.1016/s0048-9697(98)00334-9)

302. Thorn, C. F., Aklillu, E., McDonagh, E. M., Klein, T. E., & Altman, R. B. (2012). PharmGKB summary: Caffeine pathway. *Pharmacogenetics and Genomics*, 22, 389–395. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e3283505d5e>

303. Tran, T. K., MacFarlane, G. R., Kong, R. Y., O'Connor, W. A., & Yu, R. M. (2016). Mechanistic insights into induction of vitellogenin gene expression by

estrogens in Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata*. *Aquatic toxicology* (Amsterdam, Netherlands), 174, 146–158.

<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.02.023>

304. Trautwein, C., & Kümmerer, K. (2012). Degradation of the tricyclic antipsychotic drug chlorpromazine under environmental conditions, identification of its main aquatic biotic and abiotic transformation products by LC-MSn and their effects on environmental bacteria. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 889-890, 24–38.

<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.01.022>

305. Trestrail, C., Nugegoda, D., & Shimeta, J. (2020). Invertebrate responses to microplastic ingestion: Reviewing the role of the antioxidant system. *The Science of the total environment*, 734, 138559.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138559>

306. Trombini, C., Kazakova, J., Villar-Navarro, M., Hampel, M., Fernández-Torres, R., Bello-López, M. Á., & Blasco, J. (2022). Bioaccumulation and biochemical responses in the peppery furrow shell *Scrobicularia plana* exposed to a pharmaceutical cocktail at sub-lethal concentrations. *Ecotoxicology and environmental safety*, 242, 113845.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113845>

307. Turani, B., Aliko, V., & Faggio, C. (2019). Amphibian embryos as an alternative model to study the pharmaceutical toxicity of cyclophosphamide and ibuprofen. *J. Biol. Res.* 92, 72–76. <https://doi.org/10.4081/jbr.2019.8370>

308. Turesky, R. J., Richoz, J., Constable, A., Curtis, K. D., Dingley, K. H., & Turteltaub, K. W. (2003). The effects of coffee on enzymes involved in metabolism of the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in rats. *Chemico-biological interactions*, 145(3), 251–265.

[https://doi.org/10.1016/s0009-2797\(03\)00022-x](https://doi.org/10.1016/s0009-2797(03)00022-x)

309. Turk, V., Stoka, V., Vasiljeva, O., Renko, M., Sun, T., Turk, B., & Turk, D. (2012). Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochimica et biophysica acta*, 1824(1), 68–88.

<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.10.002>

310. Türkan, F., Calimli, M. H., Kanberoğlu, G. S., & Karaman, M. (2021). Inhibition effects of isoproterenol, chlorpromazine, carbamazepine, tamoxifen drugs on glutathione S-transferase, cholinesterases enzymes and molecular docking studies. *Journal of biomolecular structure & dynamics*, 39(9), 3277–3284.

<https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1763200>

311. Ulvi, A., Aydın, S., & Aydın, M. E. (2022). Fate of selected pharmaceuticals in hospital and municipal wastewater effluent: occurrence, removal, and environmental risk assessment. *Environmental science and pollution research international*, 29(50), 75609–75625.

<https://doi.org/10.1007/s11356-022-21131-y>

312. Umemoto, S., Tanaka, M., Kawahara, S., Kubo, M., Umeji, K., Hashimoto, R., & Matsuzaki, M. (2004). Calcium antagonist reduces oxidative stress by upregulating Cu/Zn superoxide dismutase in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*, 27(11), 877–885. <https://doi.org/10.1291/hypres.27.877>

313. UniProt. <https://www.uniprot.org/uniprot/A4UHT8>

314. Varga, B., Csonka, Á., Csonka, A., Molnár, J., Amaral, L., & Spengler, G. (2017). Possible Biological and Clinical Applications of Phenothiazines. *Anticancer research*, 37(11), 5983–5993. <https://doi.org/10.21873/anticanres.12045>

315. Vercauteren K., & Blust R. (1999). Uptake of cadmium and zinc by the mussel *Mytilus edulis* and inhibition by calcium channel and metabolic blockers. *Marine Biology*, 135, 615–626. <https://doi.org/10.1007/s002270050662>.

316. Verster, J. C., & Koenig, J. (2018). Caffeine intake and its sources: A review of national representative studies. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58(8), 1250–1259. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1247252>

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

318. 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, 131675.

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

319. Vieno, N., Hallgren, P., Wallberg, P., Pyhala, M., Zandaryaa, S., Baltic Marine Environment Protection Commission. (2017). Pharmaceuticals in the aquatic environment of the Baltic Sea region: a status report. *Unesco Publishing*. <https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000247889>

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

321. Wang, F., Gao, J., Zhai, W., Liu, D., Zhou, Z., & Wang, P. (2020). The influence of polyethylene microplastics on pesticide residue and degradation in the aquatic environment. *Journal of hazardous materials*, 394, 122517. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122517>

322. 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>

323. Wang, R., Mou, H., Lin, X., Zhu, H., Li, B., Wang, J., Junaid, M., & Wang, J. (2021). Microplastics in mollusks: research progress, current contamination status, analysis approaches, and future perspectives. *Front. Mar. Sci.*, 8, 759919. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.759919>.

324. Watson, E. J., Coates, A. M., Kohler, M., & Banks, S. (2016). Caffeine consumption and sleep quality in Australian adults. *Nutrients*, 8, Article 8. <https://doi.org/10.3390/nu8080479>

325. Weigel, S., Berger, U., Jensen, E., Kallenborn, R., Thoresen, H., & Hühnerfuss, H. (2004). Determination of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage and seawater from Tromsø/Norway with emphasis on ibuprofen and its metabolites. *Chemosphere*, 56(6), 583–592.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.04.015>

326. Weigel, S., Kuhlmann, J., & Hühnerfuss, H. (2002). Drugs and personal care products as ubiquitous pollutants: occurrence and distribution of clofibric acid, caffeine and DEET in the North Sea. *The Science of the total environment*, 295(1-3), 131–141. [https://doi.org/10.1016/s0048-9697\(02\)00064-5](https://doi.org/10.1016/s0048-9697(02)00064-5)

327. Wijesinghe, S., Karunarathna, B., Kumarawansa, W... & Ratnayake, A. (2026). Marine pollution: the global challenge of ocean contaminants and mitigation efforts. *Anthropocene Coasts*, 9, 5. <https://doi.org/10.1007/s44218-025-00107-8>

328. Wilkinson, J. L., Boxall, A. B. A., Kolpin, D. W., ... Teta, C. (2022). Pharmaceutical pollution of the world's rivers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(8), e2113947119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2113947119>

329. Wojcikowski, J., Haduch, A., & Daniel, W. A. (2012). Effect of classic and atypical neuroleptics on cytochrome P450 3A (CYP3A) in rat liver. *Pharmacological Reports*, 64(6), 1411-1418. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(12\)70804-4](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(12)70804-4)

330. Wright, S. L., & Kelly, F. J. (2017). Plastic and Human Health: A Micro Issue?. *Environmental science & technology*, 51(12), 6634–6647. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b00423>

331. Wronski, A. R., & Brooks, B. W. (2023). Global occurrence and aquatic hazards of antipsychotics in sewage influents, effluent discharges and surface waters. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 320, 121042. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121042>

332. Xiao, W., & Loscalzo, J. (2020). Metabolic responses to reductive stress. *Antioxidants & redox signaling*, 32(18), 1330–1347. <https://doi.org/10.1089/ars.2019.7803>

333. Xie, M., Xu, P., Zhou, W., Xu, X., Li, H., He, W., Yue, W., Zhang, L., Ding, D., & Suo, A. (2022). Impacts of conventional and biodegradable microplastics on juvenile *Lates calcarifer*: Bioaccumulation, antioxidant response,

microbiome, and proteome alteration. *Marine pollution bulletin*, 179, 113744. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.113744>

334. Xu, B., Xu, Z. F., Deng, Y., & Yang, J. H. (2010). Protective effects of Chlorpromazine and Verapamil against cadmium-induced kidney damage *in vivo*. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie*, 62(1), 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2008.12.009>

335. Xu, F., Xi, H., Liao, M., Zhang, Y., Ma, H., Wu, M., Xue, Q., Sun, H., Zhang, Y., & Xia, Y. (2022). Repurposed antipsychotic chlorpromazine inhibits colorectal cancer and pulmonary metastasis by inducing G2/M cell cycle arrest, apoptosis, and autophagy. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 89(3), 331–346. <https://doi.org/10.1007/s00280-021-04386-z>

336. Xue, Z., Zhang, Y., Tao, J., Kang, Y., Chen, Z., & Xue, Y. (2016). Theoretical elucidation of the metabolic mechanisms of phenothiazine neuroleptic chlorpromazine catalyzed by cytochrome P450 isoenzyme 1A2. *Theor. Chem. Acc.*, 135, 218. <https://doi.org/10.1007/s00214-016-1943-4>.

337. Yang, H., Xing, H., Chen, Z., Kong, L., Jiang, H., & Zhu, T. (2025). Comparative toxicokinetics and biomarker responses of typical psychiatric pharmaceuticals in *Daphnia magna*. *Toxics*, 13(6), 481. <https://doi.org/10.3390/toxics13060481>

338. Yang, H., Yumeng, Y., Yu, Y., Yinglin, H., Fu, B., & Wang, J. (2022). Distribution, sources, migration, influence and analytical methods of microplastics in soil ecosystems. *Ecotoxicology and environmental safety*, 243, 114009. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114009>

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

340. Yang, J. L., Li, Y. F., Bao, W. Y., Satuito, C. G., & Kitamura, H. (2011). Larval metamorphosis of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 in response to neurotransmitter blockers and tetraethylammonium. *Biofouling*, 27(2),

193–199. <https://doi.org/10.1080/08927014.2011.553717>

341. Yartsev, A., & Peisah, C. (2021). Caffeine-clozapine interaction associated with severe toxicity and multiorgan system failure: a case report. *BMC psychiatry*, 21(1), 192. <https://doi.org/10.1186/s12888-021-03199-x>

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

343. Yuan, S., Jiang, X., Xia, X., Zhang, H., & Zheng, S. (2013). Detection, occurrence and fate of 22 psychiatric pharmaceuticals in psychiatric hospital and municipal wastewater treatment plants in Beijing, China. *Chemosphere*, 90(10), 2520–2525. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.10.089>

344. Yunko, K., Impellitteri, F., Martyniuk, V., Multisanti, C. R., Zabolotna, M., Khoma, V., Matskiv, T. (2024a). The biochemical responses of bivalve molluscs to neuroleptic chlorpromazine are comparable with the responses of higher vertebrates. *Biotechnologia Acta*, 17 (2), 90-92. <https://doi.org/10.15407/biotech17.02.090>

345. Yunko, K., Martyniuk, V., Gnatyshyna, L., Khoma, V., Matskiv, T., Tulaidan, H., Mykhalyuk, O., Karitonas, R., Gylyte, B., Manusadžianas, L., & Stoliar, O. (2025). Alleviation of specific responses in the combined exposure of freshwater mussel *Unio tumidus* to psychoactive substances and microplastics. *Environmental toxicology and pharmacology*, 116, 104682. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2025.104682>

346. Yunko, K., Martyniuk, V., Khoma, V., Gnatyshyna, L., Mykhalyuk, O., Baranovskii, V., Gladiuk, M., Tulaidan, H., Mudra, A., Stoliar, O. (2024b). Vulnerability of freshwater mussel *Unio tumidus* to waterborne mixture of psychoactive substances and microplastic. *Scientific Issues Ternopil Volodymyr Hnatiuk National Pedagogical University Series: Biology*, 84 (3-4), 29. <https://doi.org/10.25128/2078-2357.24.3-4.4>

347. Yılmaz, S., Kılıç, N., Kaya, Ş., & Taşcı, G. (2023). A potential

biomarker for predicting schizophrenia: Metallothionein-1. *Biomedicines*, *11*(2), 590. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11020590>

348. Zhan, Z., Wang, J., Peng, J., Xie, Q., Huang, Y., & Gao, Y. (2016). Sorption of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl by microplastics: A case study of polypropylene. *Marine pollution bulletin*, *110*(1), 559–563. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.05.036>

349. Zhang, X., Jin, Z., Shen, M., Chang, Z., Yu, G., Wang, L., & Xia, X. (2022). Accumulation of polyethylene microplastics induces oxidative stress, microbiome dysbiosis and immunoregulation in crayfish. *Fish & shellfish immunology*, *125*, 276–284. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.05.005>

350. Zhang, Z., Peng, Q., Huo, D., Jiang, S., Ma, C., Chang, H., Chen, K., Li, C., Pan, Y., & Zhang, J. (2021). Melatonin regulates the neurotransmitter secretion disorder induced by caffeine through the microbiota-gut-brain axis in zebrafish (*Danio rerio*). *Frontiers in cell and developmental biology*, *9*, 678190. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.678190>

351. Zhelev, Z., Ohba, H., Bakalova, R., Hadjimitova, V., Ishikawa, M., Shinohara, Y., & Baba, Y. (2004). Phenothiazines suppress proliferation and induce apoptosis in cultured leukemic cells without any influence on the viability of normal lymphocytes. Phenothiazines and leukemia. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, *53*(3), 267–275. <https://doi.org/10.1007/s00280-003-0738-1>

352. Zhou, S., Chen, Q., Di Paolo, C., Shao, Y., Hollert, H., & Seiler, T. B. (2019). Behavioral profile alterations in zebrafish larvae exposed to environmentally relevant concentrations of eight priority pharmaceuticals. *The Science of the total environment*, *664*, 89–98. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.300>

353. Zhou, Y., Ashokkumar, V., Amobonye, A., Bhattacharjee, G., Sirohi, R., Singh, V., Flora, G., Kumar, V., Pillai, S., Zhang, Z., & Awasthi, M. K. (2023). Current research trends on cosmetic microplastic pollution and its impacts on the ecosystem: A review. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, *320*, 121106. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121106>

354. Zhu, C. T., & Rand, D. M. (2012). A hydrazine coupled cycling assay validates the decrease in redox ratio under starvation in *Drosophila*. *PloS one*, 7(10), e47584. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047584>
355. Zhu, S., Chen, H., & Li, J. (2013). Sources, distribution and potential risks of pharmaceuticals and personal care products in Qingshan Lake basin, Eastern China. *Ecotoxicology and environmental safety*, 96, 154–159. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.06.033>
356. Zorita, I., Strogyloudi, E., Buxens, A., Mazón, L. I., Papathanassiou, E., Soto, M., & Cajaraville, M. P. (2005). Application of two SH-based methods for metallothionein determination in mussels and intercalibration of the spectrophotometric method: laboratory and field studies in the Mediterranean Sea. *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals*, 10(5), 342–359. <https://doi.org/10.1080/13547500500264645>
357. Zuccato, E., Castiglioni, S., Bagnati, R., Melis, M., & Fanelli, R. (2010). Source, occurrence and fate of antibiotics in the Italian aquatic environment. *Journal of hazardous materials*, 179(1-3), 1042–1048. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.03.110>
358. Zyśk, M., Gapys, B., Ronowska, A., Gul-Hinc, S., Erlandsson, A., Iwanicki, A., Sakowicz-Burkiewicz, M., Szutowicz, A., & Bielarczyk, H. (2018). Protective effects of voltage-gated calcium channel antagonists against zinc toxicity in SN56 neuroblastoma cholinergic cells. *PloS one*, 13(12), e0209363. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209363>