

**REDUCTIVE AND ENDOCRINE EFFECTS OF ZINC OXIDE
NANOPARTICLES IN MARSH FROG *PELOPHYLAX RIDIBUNDUS*
AND THEIR MODULATION IN COMBINE EXPOSURES**

H. Falfushynska^{1,2}, L. Gnatyshyna^{1,2}, V. Myhalska¹, L. Romanchuk¹, O. Stoliar¹

¹*Ternopil National Pedagogical University
2, Kryvonis St., Ternopil 46027, Ukraine*

²*Ternopil State Medical University
1, Maidan Voli, Ternopil 46001, Ukraine
e-mail: Oksana.Stolyar@gmail.com*

Particular feature of novel environmental impact is its complexity. Therefore the certain responses to the separate constituents could be distorted. We studied the effects of nanoparticles nZnO (3.1 μM), combinations of nZnO and thiocarbamate fungicide Tattoo (Ta, 91 μg L⁻¹) at 18°C, and nZnO at 25°C (nZnO+to) on male marsh frog *Pelophylax ridibundus* after 14 days of exposure. Several enzymes involved in free radical scavenging and in the endoplasmic reticulum (ER)-related transformation as well as the products of oxidative lesions were determined in the liver. The levels of thyrotropin and cortisol were determined in the blood serum. Nuclear abnormalities (NA) in erythrocytes and cholinesterase (ChE) activity in brain were assessed as a signs of toxicity. The reductive stress in the liver was caused by all exposures, especially at 18 °C according to decreased oxyradical and protein carbonyl levels and down-regulation of tyrosinase without the changes in superoxide dismutase activity, but elevated rate of concentrations Lactate/Pyruvate. The products of lipid peroxidation and lipofuscin, deiodinase and ER-related transformation activities were up-regulated in most cases. The combine exposure with Tattoo caused the reduction in the thyrotropin and cortisol concentrations, whereas nZnO+to provoked the elevation of thyrotropin level. The increased number of the cells with NA and depletion of ChE activity was caused by nZnO and nZnO+Ta. To summarize, reductive stress more likely than oxidative stress was caused by nZnO in frog. The stimulation of the changes in the oxygen demands by heating could dramatically change the molecular responses of frog to nZnO.

Keywords: nanoparticles, Zinc oxide, reductive stress, endocrine activity, *Pelophylax ridibundus*.

To continue the list of so called ‘inconvenient’ animals studied for long years by prof. B. F. Syhomlinov and his collaborators, we initiate the study of oxygen-related responses in anurans [2,3,4]. These model organisms possess particular adaptations to the changes in respiratory regimes [1]. This study aims to elucidate the sensitivity of the organism of frog to complex exposure to nanof orm of zinc oxide (nZnO) in the environmentally relevant level.

Materials and Methods

Adult males of marsh frog *Pelophylax ridibundus* (8-10 cm long) out of the breeding season were subjected to the effects of nanoparticles nZnO (3.1 μM), combinations of nZnO and thiocarbamate Tattoo (Ta, 91 μg L⁻¹) at 18°C, and nZnO at 25°C (nZnO+to) during 14 days. Experiments were performed in accordance with permission of the Ministry of Ecology and Natural Resources of Ukraine, No 466/17.04.2013). Ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) as an indicator of the activity of biotransformation of xenobiotics and deiodinase (EC 1.97.1.10) activities; oxyradical formation in the liver, thyrotropin (TSH) and cortisol levels in the blood serum and Cholinesterase (ChE, EC 3.1.1.7) activity in the brain were detected as in [3]. The methods ap-

plied for the Superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) activity, lipofuscin, lactate and pyruvate concentrations in the liver are described in [4]; the level of Lipid peroxidation by the production of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), and Protein carbonyl concentration, as index of protein oxidation, were measured according to [5]. Nuclear lesions were assessed by the frequency of the erythrocytes with micronuclei (MN) and nuclear abnormalities (NA) [5]. The phenoloxidase-like activity of tyrosinase (EC 1.14.18.1) was determined as in [7]. All statistical calculations were performed with Statistica v. 10.0 and Excel for Windows-2010.

Results and Discussion

The activity of SOD was not changed in the comparison to control by any exposures, however, the levels of oxyradical and protein carbonyls (in combine exposures only) were decreased, demonstrating the suppression of oxidative stress response. This effect was different from the elevation of oxidative stress by the exposure to Tattoo alone [2]. Interestingly, tyrosinase was inactivated (by 30.6-63.6%) in all exposures indicating the suicidal effect of its phenolic products that could be elevated by the decrease in the oxyradical depending autooxidation [7]. However, the increase in the TBARS and lipofuscin production in the liver was detected. The ratio of Lactate/Pyruvate concentrations increased from 15.5 in control till 26.8 (nZnO) and 41.5 (nZnO+Ta) demonstrating reductive stress. Upregulation of deiodinase and EROD activities in most cases (with the exception of nZnO-group for EROD) was detected. The heating caused the decisive opposite effect in the exposure to nZnO. TSH and cortisol levels were decreased by the exposure to nZnO+Ta witnessing the suppression of the hypothalamic-dependent activities [6], whereas nZnO+ t° led to the increase in TSH level. The signs of toxicity (elevated level of cells with nuclear abnormalities and decreased ChE activity) were detected in the nZnO and nZnO+Ta groups. Unexpectedly, these manifestations were absent in the nZnO+ t° group. To summarize, reductive stress more likely than oxidative stress was caused by nZnO in frog. The stimulation of the changes in the oxygen demands by heating could dramatically change the molecular responses of frog to nZnO.

This work has been granted by the Ministry of Education and Science of Ukraine (Projects # 125B; 131B).

Effect of nZnO alone and in combine exposures on the redox-dependent processes, endocrine activity and signs of toxicity in the tissues of *P. ridibundus* (M \pm S.D., n=8)

Parameters	Groups			
	Control	nZnO	nZnO+Ta	nZnO+ t°
Liver				
SOD, RU \cdot mg ⁻¹ proteins	6.0 \pm 1.1	6.2 \pm 0.8	6.4 \pm 0.8	7.1 \pm 0.7
Tyrosinase, nmole min ⁻¹ mg ⁻¹ proteins	43.8 \pm 5.8	15.9 \pm 1.4*	30.4 \pm 5.8*	17.1 \pm 2.4*
Oxyradicals, RFU g ⁻¹ tissue	161.7 \pm 17.1	145.5 \pm 5.6*	120.1 \pm 7.7*	144.7 \pm 5.0*
TBARS, nmol \cdot g ⁻¹ of tissue	35.4 \pm 3.7	32.4 \pm 4.3	48.3 \pm 4.5*	55.3 \pm 6.1*
Protein carbonyls, μ mol \cdot g ⁻¹ tissue	0.86 \pm 0.09	0.89 \pm 0.05	0.72 \pm 0.05*	0.55 \pm 0.08*
Lipofuscin, RFU/g tissue	142.6 \pm 4.9	188.6 \pm 19.3*	218.4 \pm 6.7*	175.4 \pm 9.2*
Lactate, μ mol \cdot g ⁻¹ tissue	23.3 \pm 1.3	26.8 \pm 1.1*	24.9 \pm 1.3	23.3 \pm 1.4
Pyruvate, μ mol \cdot g ⁻¹ tissue	1.5 \pm 0.2	1.0 \pm 0.2*	0.6 \pm 0.1*	1.9 \pm 0.2*
EROD, pmol min ⁻¹ mg ⁻¹ proteins	20.5 \pm 0.5	21.6 \pm 1.0	24.0 \pm 2.4*	34.5 \pm 4.8*
Deiodinase, nmole T3 min ⁻¹ g FW ⁻¹	7.7 \pm 0.2	10.9 \pm 1.3*	9.6 \pm 0.5*	8.4 \pm 0.5*
Brain				
ChE, nmol \cdot min ⁻¹ mg ⁻¹ proteins	29.0 \pm 5.7	20.7 \pm 3.3*	16.8 \pm 1.8*	24.1 \pm 2.0
Blood				
MN, per 1000 erythrocytes	2.0 \pm 0.3	2.2 \pm 0.4	1.5 \pm 0.3	1.5 \pm 0.3
NA, per 1000 erythrocytes	7.0 \pm 0.8	10.5 \pm 1.3*	11.0 \pm 1.4*	7.0 \pm 0.9
TSH, mMU/L serum	1.1 \pm 0.2	1.1 \pm 0.2	0.6 \pm 0.04*	2.1 \pm 0.2*
Cortisol, nmol/L serum	75,1 \pm 11,0	74,2 \pm 7,3	67,3 \pm 10,4*	75,4 \pm 13,4

Note: the asterisks indicate that the values are significantly different from the respective control values (p<0.05).

REFERENCES

1. Dawson N.J., Katzenback B.A., Storey K.B. Free-radical first responders: the characterization of CuZnSOD and MnSOD regulation during freezing of the freeze-tolerant North American wood frog, *Rana sylvatica* // *Biochim. Biophys. Acta*. 2015. Vol. 1850. P. 97–106.
2. Falfushynska H.I., Romanchuk L.D., Stolyar O.B. Different responses of biochemical markers in frogs (*Rana ridibunda*) from urban and rural wetlands to the effect of carbamate fungicide // *Compar. Biochem Physiol.* 2008. Vol. 148C. № 3. P. 223–229.
3. Falfushynska H., Gnatyshyna L., Fedoruk O. et al. Endocrine activities and cellular stress responses in the marsh frog *Pelophylax ridibundus* exposed to cobalt, zinc and their organic nanocomplexes // *Aquat. Toxicol.* 2016. Vol. 170. P. 62–71.
4. Falfushynska H., Gnatyshyna L., Fedoruk O. et al. Hepatic metallothioneins in molecular responses to cobalt, zinc, and their nanoscale polymeric composites in frog *Rana ridibunda* // *Comp. Biochem. Physiol.* 2015. Vol. 172–173 C. P. 45–56.
5. Falfushynska H., Gnatyshyna L., Yurchak I. et al. Habitat pollution and thermal regime modify molecular stress responses to elevated temperature in freshwater mussels (*Anodonta anatina*: Unionidae) // *Sci. Total. Environ.* 2014. Vol. 500–501. P. 339–350.
6. Gravel A., Campbell P.G.C., Hontela A. Disruption of the hypothalamo-pituitary-interrenal axis in 1+ yellow perch (*Perca flavescens*) chronically exposed to metals in the environment // *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 2005. Vol. 62 P. 982–990.
7. Mucoz-Mucoz J.L., Garcia-Molina F., Varon R. et al. Suicide inactivation of the diphenolase and monophenolase activities of tyrosinase // *IUBMB Life*. 2010. Vol. 62. P. 539–547.

Стаття: надійшла до редакції 20.07.16
доопрацьована 26.08.16
прийнята до друку 29.08.16

РЕДУКТИВНИЙ ТА ЕНДОКРИННИЙ ЕФЕКТИ НАНОЧАСТИНОК ОКСИДУ ЦИНКУ НА ЖАБУ ОЗЕРНУ *PELOPHYLAX RIDIBUNDUS* ТА ЇХ МОДУЛЯЦІЯ У КОМБІНОВАНИХ ЕКСПОЗИЦІЯХ

Г. Фальфушинська^{1,2}, Л. Гнатишина^{1,2}, В. Михальська¹, Л. Романчук¹, О. Столяр¹

¹Тернопільський національний педагогічний університет
вул. М. Кривоноса, 2, Тернопіль 46027, Україна

²Тернопільський державний медичний університет
Майдан Волі, 1, Тернопіль 46001, Україна
e-mail: Oksana.Stolyar@gmail.com

Особливістю сучасних викликів довкілля є їх комплексна дія. Тому визначені реакції на вплив окремих складових можуть спотворюватись. Вивчали вплив наночастинок nZnO (3.1 мкМ), поєднання nZnO та тіокарбаматного фунгіциду Татту (Та, 91 мкМ) за 18 °С та nZnO за 25 °С (nZnO+r^o) на самців жаби озерної *Pelophylax ridibundus* після 14 діб експозиції. Визначали активність низки ензимів, залучених у знешкодження вільних радикалів та реакції трансформації, пов'язані з ендоплазматичним ретикулоюмом (ЕР), а також утворення продуктів окисної деструкції у печінці. У сироватці крові вимірювали рівень тиреотропіну та кортизолу. Для оцінки токсичності визначали вміст еритроцитів з ядерними аномаліями (ЯА) та холінестеразну активність (ХЕ) у головному мозку. Всі експозиції, особливо за 18 °С, викликали редуктивний стрес у печінці, що проявлялося як зменшення рівня

оксирадикалів та карбонілів протеїнів, пригнічення тирозиназної активності без змін у супероксиддисмутазній активності та збільшення рівня співвідношення концентрацій Лактат/Піруват. У більшості випадків спостерігалось збільшення утворення продуктів перекисного окиснення ліпідів, ліпофусцину, активності дейодинази та реакцій ЕР-залежної трансформації. У спільній експозиції з Татту зменшувалися концентрації тиреотропіну та кортизолу, тоді як дія $nZnO+r^o$ призводила до збільшення рівня тиреотропіну. Дія $nZnO$ та $nZnO+Ta$ викликала збільшення кількості клітин з ЯА та пригнічення ХЕ активності. Відтак, результати свідчать, що дія $nZnO$ викликала у жаби не оксидативний, а редуктивний стрес. Стимуляція змін у кисневих потребах за теплової дії може різко змінити молекулярні реакції жаби на вплив $nZnO$.

Ключові слова: наночастинки, Цинк оксид, редуктивний стрес, ендокринна активність, *Pelophylax ridibundus*.

РЕДУКЦИОННЫЙ И ЭНДОКРИННЫЙ ЭФФЕКТЫ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЦИНКА НА ЛЯГУШКУ ОЗЕРНУЮ *PELOPHYLAX RIDIBUNDUS* И ИХ МОДУЛЯЦИЯ В КОМБИНИРОВАННЫХ ЭКСПОЗИЦИЯХ

Г. Фальфушинская^{1,2}, Л. Гнатишина^{1,2}, В. Михальская¹, Л. Романчук¹, О. Столяр¹

¹Тернопольский национальный педагогический университет
ул. М. Кривоноса, 2, Тернополь 46027, Украина

²Тернопольский государственный медицинский университет
Майдан Воли, 1, Тернополь 46001, Украина

Особенностью современных экологических вызовов является их комплексное воздействие. Поэтому определенные реакции на влияние отдельных составляющих могут искажаться. Изучали влияние наночастиц $nZnO$ (3.1 мкМ), сочетания $nZnO$ и тиокарбаматного фунгицида Татту (Та, 91 $\mu\text{g L}^{-1}$) при 18° С та $nZnO$ за 25 °С ($nZnO+r^o$) на самцов лягушки озерной *Pelophylax ridibundus* после 14 дней экспозиции. Определяли активность ряда энзимов, задействованных в уничтожении свободных радикалов, и реакции трансформации, связанные с эндоплазматическим ретикуломом (ЭР), а также образование продуктов окислительной деструкции в печени. В сыворотке крови измеряли уровень тиреотропина и кортизола. Для оценки токсичности определяли содержание эритроцитов с ядерными аномалиями (ЯА) и холинэстеразную активность (ХЭ) в головном мозге. Все экспозиции, особенно при 18 °С, вызывали редукционный стресс в печени, что проявлялось как уменьшение уровня оксирадикалов и карбониллов протеинов, угнетение тирозиназной активности без изменения супероксиддисмутазной активности и увеличение уровня соотношения концентраций Лактат/Піруват. В большинстве случаев наблюдалось увеличение образования продуктов перекисного окисления липидов, липофусцина, активности дейодиназы и ЭР-зависимой трансформации. В совместной экспозиции с Татту уменьшались концентрации тиреотропина и кортизола, тогда как действие $nZnO+r^o$ приводило к увеличению уровня тиреотропина. Действие $nZnO$ и $nZnO+Ta$ вызывало увеличение количества клеток с ЯА и угнетение ХЭ активности. Тепловое воздействие на потребление организмом кислорода критически влияет на молекулярные реакции лягушки на действие $nZnO$.

Ключевые слова: наночастицы, Цинк оксид, редукционный стресс, эндокринная активность, *Pelophylax ridibundus*.