

АНОТАЦІЯ

Горин О. І. Фізіолого-біохімічні реакції коропових риб на вплив новітніх біоризиків. Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія. – Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка, Тернопіль, 2021.

Протягом останніх десятиліть спостерігається зміщення акцентів у дослідженні характеру забруднення водного середовища, оскільки на зміну забруднювачам, що надходять із визначених джерел у відносно великих кількостях (мілімолярні концентрації) приходять спонтанне забруднення з розсіяних невизначених джерел, яке характеризується різноманітністю складу і мінливістю у часі та токсичним ефектом складових вже у мінімальних, наномолярних, концентраціях. Такі забруднювачі не піддаються ефективному видаленню традиційними методами очистки стічних вод і включають фармацевтичні препарати, засоби побутової хімії (косметичні, миючі засоби та ін.), пестициди та ціанотоксини.

У наш час все актуальнішою стає проблема поширення ціанобактерій, насамперед представників ряду *Nostocales*, в поверхневих водах Європи і збільшення кількості випадків цвітіння води за їх участі (Taranu et al. 2015). Як було недавно показано, очікується експансія цієї групи організмів в нові місця проживання із наступною інтеграцією їх в екосистеми, а відтак – порушення стійкості останніх. Це підтверджується, наприклад, збільшенням частоти поширення *Raphidiopsis raciborskii* за останні десятиліття, особливо в зонах з помірним кліматом (Rzymiski et al. 2018). Таке явище можна пояснити високою фенотиповою пластичністю, зміною клімату та антропогенною евтрофікацією (Cirés and Ballot 2016).

Опираючись на дані про те, що експансія потенційно токсичних ціанобактерій почалася з широт з тропічним та субтропічним кліматом, для дослідження ми обрали водойми, які характеризуються підвищеним температурним режимом через особливості географічного розташування

(Касперівське водосховище та р. Серет нижче його дамби) чи умови експлуатації (Нетішинське водосховище). Аналіз фітопланктону показав, що ціанобактерії були домінуючою фракцією у всіх випадках з чіткіше вираженим переважанням у літні місяці. Зокрема було виявлено кілька потенційних виробників сильнодіючих токсинів: *Raphidiopsis raciborskii*, *Aphanizomenon gracile*, *Dolichospermum flos-aquae*. Проте скринінги на наявність розчинених чи часткових циліндропермопсину, мікроцистинів (-LR, -YR та -RR), та анатоксину дали негативні результати.

Цито- та генотоксичні властивості циліндропермопсину – алкалоїду біосинтезованого певними видами ціанобактерій – широко вивчені на експериментальних моделях *in vitro* та *in vivo*. За допомогою кількох незалежних досліджень було по окремо встановлено роль урацилу, гуанідину та гідроксильної групи у його токсичності (Evans and Murphy 2011; Cartmell et al. 2017). У ході пропонованого дослідження з використанням нормальних гепатоцитів коропа в умовах *in vitro* було перевірено токсичність п'яти синтетичних аналогів циліндропермопсину, усі з яких містили у своїй структурі урациловий компонент, але віднізнялися комбінаціями інших притаманних йому компонентів та функціональних груп. Усі тестовані аналоги викликали генерацію активних форм оксигену, окиснення ліпідів та фрагментацію ДНК. Найбільше зростання вмісту ТБК-АП та активності каспази-3 (маркера апоптозу) було продемонстровано аналогом, який, подібно до циліндропермопсину, містить групи гуанідину, гідроксилу та урацилу, але не має його складної трициклічної структури. Зроблені в процесі роботи спостереження підтверджують гіпотезу, що токсичність циліндропермопсину є результатом взаємодії компонентів урацилу, гуанідину та гідроксильної групи.

Подальші дослідження були спрямовані на визначення фізіолого-біохімічних показників риб дослідних водойм, зокрема карася сріблястого *Carassius auratus gibelio (in vivo)*, з метою ідентифікації негативних впливів інших метаболітів ціанобактерій. Порівняння результатів аналізів біохімічних показників тварин Касперівського водосховища, р. Серет та контрольної ділянки дозволило зробити висновок, що риби, які населяють водойми поблизу дамб, виявляють

тенденцію до порушень антиоксидантної системи та проявів цитотоксичності порівняно з рибами з контрольної ділянки. Більше того, у групи з р. Серет нижче дамби спостерігався значний окисний стрес, пов'язаний з дисбалансом систем антиоксидантів та прооксидантів, низьким рівнем металотіонеїнів, аутофагією та ендокринними порушеннями.

Відмінності фізіолого-біохімічних показників риб *Carassius auratus gibelio* з водойм нижче та вище дамби Касперівської гідроелектростанції та контрольної ділянки вказують на зниження життєвого статусу тварин нижче дамби через більшу швидкість течії та вищий вміст купруму і плюмбуму. Відмінності показників риб з водойми вище дамби Касперівської гідроелектростанції та контрольної ділянки, які характеризуються схожими умовами, свідчать про присутність у дослідних водоймах й інших пошкоджуючих чинників, зокрема, метаболітів ціанобактерій.

Для перевірки цієї гіпотези було проаналізовано вплив екстрактів культур *Raphidiopsis raciborskii*, виділених із досліджуваних водойм Західної України на ізольовані клітини коропа звичайного (*Cyprinus carpio*) в умовах експозиції *in vitro*. Разом з цим досліджувалися 4 екстракти з культур, одержаних із озер Західної Польщі, для перевірки впливу географічного чинника на токсичні ефекти продуктових сполук. Усі досліджені екстракти викликали підвищене продукування активних форм кисню та, у більшості випадків, зростання активності каспази-3. Активність каталази в гепатоцитах суттєво варіювала – як за низьких (1 мкл/мл), так і за високих (10 мкл/мл) концентрацій спостерігалось і збільшення, і зменшення цього показника. Більшість екстрактів також впливали на пул клітинних тіолів, зокрема знижували активність глутатіон-S-трансферази, підвищували рівень глутатіону та зменшували вміст металотіонеїнів (штами з українських водойм). Цитотоксичний ефект, визначений як порушення стабільності лізосомальних мембран у еритроцитах коропа, викликав тільки штам *R. raciborskii*, який походив з Касперівського водосховища (серпень, 2017 р.). Нейротоксичність спричиняли усі досліджувані зразки.

Відомо, що окремі види ціанобактерій та зелених водоростей виробляють ліпофільні поліметокси-1-алкени, які можуть викликати тератогенні прояви *in*

vivo. Зважаючи на недостатній рівень інформації щодо ПМА у *Arthospira sp.* (комерційно відома як спіруліна) та *Chlorella sp.*, які культивуються для виробництва харчових біодобавок, ми проаналізували рівень біобезпеки харчових добавок на основі хлорели (n = 10) та спіруліни (n = 13), зареєстрованих у ЄС з використанням реакцій молекулярних маркерів *Danio rerio* (*in vivo*). Мас-спектрометричний аналіз фракціонованих екстрактів досліджуваних матеріалів не виявив жодних сполук, споріднених з ПМА. Аналізовані зразки не проявляли тератогенної дії, за винятком викривлення хорди, викликаного фракціями двох препаратів на основі хлорели. Разом з тим, проаналізовані біодобавки викликали прояви окисного стресу та цитотоксичності у тканинах печінки данію, на що вказує підвищений рівень активних форм кисню, активність каталази, пероксидне окиснення ліпідів та збільшення рівня фрагментації ДНК. Більшість (60 %) фракцій з препаратів на основі хлорели викликали активацію холінестерази у мозку данію, тоді як вплив 61,5 % фракцій з препаратів на основі спіруліни викликав протилежну реакцію – її пригнічення. Наслідки впливу ліпофільних екстрактів, особливо з препаратів на основі хлорели, на *D. rerio* були схожими на реакцію у відповідь на вплив екстрактів ціанобактерій, що може свідчити про схожість токсичних метаболітів, продукованих обома групами організмів, чи забруднення біодобавок ціанобактеріями. Застосування до досліджуваних зразків розробленого на основі описаних вище досліджень способу виявлення потенційно токсичних синьо-зелених водоростей (Фальфушинська та Горин, 2019) показало, що при впливі C15,7 та Sp 12 відповідь ізольованих клітин тканин коропа *Cyprinus carpio* можна оцінити як «стрес», а для C16 та Sp2, 6 – «передстресовий стан» (адаптивна реакція на пошкоджуючий вплив). Відтак, незважаючи на те, що проведені нами дослідження підтверджують відсутність у проаналізованих препаратах на основі хлорели та спіруліни тератогенних сполук класу поліметокси-1-алкенів, їх цитотоксичний ефект свідчить про необхідність подальших досліджень з даного напрямку.

Ключові слова: ціанобактерії, ціанотоксини, коропові риби, біомаркери, окисний стрес, цитотоксичність, генотоксичність, нейротоксичність.

ABSTRACT

Horyn O. I. Physiological and Biochemical Reactions of Cyprinid Fish to the Novel Biorisks Effects. Qualifying scientific work on the rights of a manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in specialty 091 Biology. – Ternopil Volodymyr Hnatyuk National Pedagogical University, Ternopil, 2021.

In recent decades, the structure of biohazards in the aquatic environment has undergone a radical change: pollutants coming from known sources in relatively large volumes (millimolar concentrations) have been replaced by spontaneous pollution from scattered sources. The latter is characterized by composition variability, temporal diversity, and toxic effects in minimal, nanomolar concentrations. Such contaminants cannot be effectively removed with traditional wastewater treatment methods and include pharmaceuticals, household chemicals (cosmetics, detergents, etc.), pesticides and cyanotoxins.

Nowadays, there is an active spread of cyanobacteria, primarily of the *Nostocales* order, in the surface waters of Europe and an increase in the number of cases of water blooms with their involvement (Taranu et al. 2015). As recently shown, the *Nostocales* are expected to expand into new habitats and then integrate into ecosystems, thus disrupting their resilience. This is proven, for example, by the increase in the prevalence of *Raphidiopsis raciborskii* in recent decades, especially in temperate climates (Rzymiski et al. 2018). This phenomenon can be explained by high phenotypic plasticity, climate change and anthropogenic eutrophication (Cirés and Ballot 2016). It is obvious that freshwater reservoirs with a steadily elevated temperature regime provide a favorable environment for the expansion of toxic species of cyanobacteria to new areas with their subsequent spread.

Based on the data that the expansion of potentially toxic cyanobacteria began in latitudes with tropical and subtropical climates, we chose for the study reservoirs characterized by elevated temperatures due to geographical location (Kasperivtsi Reservoir and the Seret River below its dam) or operating conditions (Netishyn Reservoir). Phytoplankton analysis showed that cyanobacteria were the dominant

fraction in all cases with a more visible predominance in summer . In particular, several potential producers of potent toxins were identified: *Raphidiopsis raciborskii*, *Aphanizomenon gracile*, *Dolichospermum flos-aquae*. However, screenings for dissolved or partial cylindrospermopsin, microcystins (-LR, -YR, and -RR), and toxoid were negative.

The cyto- and genotoxic properties of cylindrospermopsin, an alkaloid biosynthesized by certain species of cyanobacteria, have been extensively studied in experimental *in vitro* and *in vivo* models. Several independent studies have separately identified the role of uracil, guanidine, and the hydroxyl group in CYN toxicity (Evans and Murphy 2011; Cartmell et al. 2017). In the proposed study on a model of normal carp hepatocytes *in vitro*, the toxicity of five synthetic simplified analogues was tested, all of which contained a uracil component in their structure, but differed in combinations of other components and functional groups inherent in CYN. All tested analogues caused the reactive oxygen species, lipid peroxidation and increased levels of DNA fragmentation/ The greatest increase in TBARS content and activity of caspase-3 (a marker of apoptosis) was demonstrated by an analogue that, like CYN, contains functional groups of guanidine, hydroxyl and uracil, but does not have its complex tricyclic structure. Observations made in the course of this work confirm the hypothesis that the toxicity of CYN is the result of the interaction of the components of uracil, guanidine and the hydroxyl group.

Further studies were aimed at determining the vital status of aquatic organisms of the experimental reservoirs, in particular the silver crucian *Carassius auratus gibelio*, in order to identify the negative effects of other metabolites of cyanobacteria. A comparison of the results of analyzes of biochemical parameters of animals of Kasperivtsi Reservoir, Seret River and the control area allowed us to conclude that fish inhabiting reservoirs near dams tend to have antioxidant system disorders and cytotoxicity compared to fish from the reference site. Moreover, groups from the Seret River below the dam experienced significant oxidative stress associated with an imbalance of antioxidant and prooxidant systems, low metallothionein levels, autophagy, and endocrine disruption.

Differences in physiological and biochemical parameters in *Carassius auratus gibelio* from reservoirs below and above the Kasperivtsi dam and the control site indicate the decrease in animals health status below the dam due to the higher flow velocity and bigger contents of cuprum and plumbum. Differences in fish indicators from the reservoir above the Kasperivtsi dam and control site which have similar conditions serve as evidence that the analyzed reservoirs contain other damaging factors, particularly, metabolites of blue-green algae.

To test this hypothesis, the effect of extracts of *Raphidiopsis raciborskii* cultures isolated from the studied reservoirs of Western Ukraine on isolated cells of *Common carp* (*Cyprinus carpio*) under invitro exposure was analyzed. At the same time, 4 extracts from crops obtained from the lakes of Western Poland were studied to test the influence of a geographical factor on the toxic effects of food compounds. All studied extracts caused increased production of reactive oxygen species and, in most cases, increased activity of caspase-3. Catalase activity in hepatocytes varied significantly - both at low (1 μ l / ml) and at high (10 μ l / ml) concentrations, there was an increase and decrease in this indicator. Most extracts also affected the pool of cellular thiols, in particular, reduced glutathione-S-transferase activity, increased glutathione levels and decreased metallothionein content (strains from Ukrainian reservoirs). The cytotoxic effect, defined as a violation of the stability of lysosomal membranes in carp erythrocytes, was caused only by the strain *R. raciborskii*, which originated from the Kasperivtsi Reservoir (August, 2017). Neurotoxicity was caused by all tested samples.

Certain species of cyanobacteria and green algae are known to produce lipophilic polymethoxy-1-alkenes, which can cause teratogenicity invivo. Due to the insufficient level of information on PMA in *Arthospira sp.* (commercially known as spirulina) and *Chlorella sp.*, which are cultivated for the production of food additives, we analyzed the level of biosafety of food additives Chlorella (n = 10) and Spirulina (n = 13) registered in the EU. Mass spectrometric analysis of the fractionated extracts did not reveal any potentially related chemical compounds in the studied materials. The analyzed samples did not show teratogenic effects, except for curvature of the spine caused by fractions of two chlorella drugs. However, the analyzed supplements caused oxidative stress and cytotoxicity in zebrafish liver tissue, as indicated by increased

levels of reactive oxygen species, catalase activity, lipid peroxidation and increased levels of DNA fragmentation. The majority (60%) of chlorella fractions caused cholinesterase activation in zebrafish brain, while the effect of 61.5% of spirulina fractions caused the opposite reaction - its suppression. The effects of lipophilic extracts, especially Chlorella, on *Danio rerio* were similar to the response to cyanobacterial extracts, which may indicate the similarity of toxic metabolites produced by both groups or contamination of bioadditives with blue-green algae. Application to the studied samples of the method of detection of potentially toxic blue-green algae developed on the basis of the studies described above (Falfushynska and Horyn, 2019) showed that for Ch5,7 and Sp 12 the level of biosafety corresponds to the indicator “stress” (acute stress response), and for Ch6 and Sp2, 6 – “pre-stress state” (adaptive response to damage).

Therefore, although our studies confirm the absence of teratogenic compounds belonging to the class of polymethoxy-1-alkenes in the Chlorella and Spirulina preparations, their cytotoxic effect attests the necessity of further research.

Key words: cyanobacteria, cyanotoxins, carp fish, biomarkers, oxidative stress, cytotoxicity, genotoxicity, neurotoxicity.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, у яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Rzymiski P., **Horyn O.**, Budzyńska A., Jurczak T., Kokociński M., Niedzielski P., Klimaszyk P., Falfushynska H. A report of *Cylindrospermopsis raciborskii* and other cyanobacteria in the water reservoirs of power plants in Ukraine. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2018 May;25(15):15245-15252. doi: 10.1007/s11356-018-2010-6 **(Scopus/WoS) IF 3.056**

2. Falfushynska H., **Horyn O.**, Brygider A., Fedoruk O., Buyak B., Poznansky D., Poniedziałek B., Kokociński M., Rzymiski P. Is the presence of Central European strains of *Raphidiopsis (Cylindrospermopsis) raciborskii* a threat to a freshwater fish? An in vitro toxicological study in common carp cells. *Aquatic Toxicology. Vol 206*, Jan 2019, P. 105-113. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.11.012> **(Scopus/WoS) IF 4.344.**

3. Falfushynska, H., **Horyn, O.**, Fedoruk, O., Khoma, V., & Rzymiski, P. Difference in biochemical markers in the gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) upstream and downstream of the hydropower plant. *Environmental Pollution*, 2019, 255, 113213. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113213> **(Scopus) IF: 6.792**

4. Evans D. M., Hughes J., Jones L. F., Murphy P. J., Falfushynska H., **Horyn O.**, Sokolova I. M., Christensen J., Coles S. J., Rzymiski P. Elucidating cylindrospermopsin toxicity via synthetic analogues: An in vitro approach. *Chemosphere.* 2019. Vol. 234. P. 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.021> **(Scopus) IF 5.778**

5. Henaio E., Murphy P. J., Falfushynska H., **Horyn O.**, Evans D. M., Klimaszyk P., Rzymiski P. Polymethoxy-1-Alkenes Screening of Chlorella and Spirulina Food Supplements Coupled with In Vivo Toxicity Studies. *Toxins*, 2020, 12 (2). 111. doi: [10.3390/toxins12020111](https://doi.org/10.3390/toxins12020111) **(Scopus) IF 3.531**

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

1. Rzymiski P., **Horyn O.**, Kokociński M., Budzyńska A., Jurczak T., Poznanskyi D., Rusnak N., Gnatyshyna L., Stoliar O., Falfushynska H. Occurrence and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* in the water reservoirs of power plants in Ukraine // *Молодь і поступ біології: програма та тези доповідей XIV Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів, присвяченої 185 річниці від дня народження Б. Дибовського* (м. Львів, 10–12 квітня 2018 р.). – Львів, 2018. – 320 с. 160-161ст.
2. Falfushynska H., Gnatyshyna L., **Horyn O.**, Mykhalska V., Fedoruk O., Rusnak N., Mischuk N., Martyniuk V., Kharchuk A., Soltys I., Tovaryanska V., Rarok Y., Tsaryk L., Rzymiski P., Sprinĝe G., Stoliar O. The evaluation of environmental impact of hydroelectric power plants in the middle streams of river Dniester by multi-marker approach. *Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції, присвяченої 20-річчю заснування Голицького біостаніонару Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка «Тернопільські біологічні читання 2018»* — Тернопіль: Вектор, 2018. — 204 с. 139-141ст.
3. **Horyn O. I.**, Khoma V. V., Gnatyshyna L. L., 2, Fedoruk O. O., Bachynsky A. I., Shkilniak M. F., Falfushynska H. I. The adverse effects of hydropower plant on molecular systems of cyprinidae fish. *“Youth and Progress of Biology”*: XV International Scientific Conference for Students and PhD Students, dedicated to the 135th anniversary of J. Parnas (Lviv, April 9–11, 2019): abstracts. – Lviv, 2019. – 220 p. P. 186-187.
4. **Horyn O.**, Khoma V., Fedoruk O., Rzymiski P., Falfushynska H. Prooxidant and cytotoxic effects of *Raphidiopsis raciborski* extracts on the *Cyprinus carpio* isolated cells. *Фізіол. журн.* 2019. Т. 65, № 3 (Матеріали XX-го з'їзду Українського фізіологічного товариства ім.П.Г. Костюка з міжнародною участю, присвяченого 95-річчю від дня народження академіка П.Г. Костюка). С. 17.
5. **Горин О.І.**, Федорук О.О., Хома В.В., Касянчук Н.М., Жимські П., Фальфушинська Г.І. Особливості відповіді молекулярних стресорних систем гепатоцитів коропа на вплив синтетичних аналогів циліндроспермопсину. *Медична та клінічна хімія.* 2019. Т. 21. № 3 (додаток), С. 25. **ї**
6. Falfushynska H., Wejnerowski Ł., Horyn O., Sokolova I., Rzymiski P. The

Effects of Cyanobacteria Extracts and Pure Cyanotoxins on Transcriptional and Biochemical Responses of Fish *Danio rerio*. International Conference „*Lakes & Reservoirs: Hot Spot and Topics in Limnology*” 17-20 September 2019 – Mikorzyn, Poland. P. 26.

7. **Horyn O.**, Osypenko I., Poznanskyi D., Kasianchuk N., Rzymiski P., Falfuskynska H. Biohazard identification and risk assessment of cyanotoxins based on the set of molecular markers of *European Carp*. “*Youth and Progress of Biology*”: *XVI International Scientific Conference For Students And Phd Students* (LVIV, APRIL27-29, 2020). P. 110-111.

8. **Horyn O.**, Osypenko I., Poznanskyi D., Rzymiski P., Falfuskynska H. Biorisk assessment of Chlorella and Spirulina food supplements based on the set of molecular markers of Cyprinidae fish. “*The Problems Of Functioning And Bioproductivity Impruvment Of Water Ecosystems*” *III International Scientific And Practacal Conference* (Ukraine, 25-27 March, Dnipro). P. 97-98.

9. Касянчук Н.М., Осипенко І.О., Сенько С.В., **Горин О.І.**, Фальфушинська Г.І. Дослідження токсичності харчових добавок на основі CHLORELLA і SPIRULINA на моделях *Danio rerio* in vivo. ХІВ Всеукраїнська конференція «*Молоді вчені 2021 – від теорії до практики*» (25 березня 2021 р.), Національна металургійна академія України, м. Дніпро (Україна). С. 185-189.

10. **Horyn O.**, Osypenko I., Kasianchuk N., Nimko Kh., Kovalska H. Multibiomarker assessment in *Danio rerio* exposure to cyanobacteria crude extracts. Збірник тез конференції-конкурсу молодих вчених «*Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2021*». С. 35.

Охоронні документи на об'єкти інтелектуальної власності

1. Патент України на корисну модель UA 123524 U, G01N 21/78, G01N 33/18. Спосіб експрес-оцінки вмісту нітритів у воді спектрофотометричним методом. / Г.І. Фальфушинська, О.Б. Столяр, **О.І. Горин**, Л.Л. Гнатишина, Н.І. Руснак. – № u201710246; заявл. 23.10.2017; опубл. 26.02.2018. – Бюл. № 4/2018.

2. Деклараційний патент на корисну модель UA 139060 U, C12Q3/00 C12R1/89 G01N33/00 Спосіб виявлення потенційно токсичних синьо-зелених

водоростей у водних екосистемах / Фальфушинська Г. І., Горин О. І. – №u201903561; заявл 08.04.2019, опубл. 26.12.2019. – Бюл.№ 24

Наукові праці, які додатково відображають зміст дисертації

1. Falfushynska H., **Horyn O.** Molecular mechanisms of aquatic animals adaptation to toxic environment: a review // section of the collective monograph "The Potential of Modern Science" – London : "Sciencce Publishing", 2019. – 198 p. P. 85-99. ISBN 978-1-9993071-3-4